



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İNTRASEREBROVENTRİKÜLER
UYGULANAN NESFATİN-1'İN AMİGDALA VE
HİPOTALAMO-HİPOFİZER ADRENAL AKSA
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Osman AKTAŞ

DOKTORA TEZİ

Doç. Dr. Zafer ŞAHİN

TRABZON-2025

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak yapıldığını ve yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

23.05.2025
Osman AKTAŞ

İthaf

*Bu doktora tezimi, benim bu günlere gelmem için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan
ve her zaman yanımda olan sevgili aileme ve kızım Mihra'ya ithaf ediyorum.*



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince, beni projesine dahil ederek danışmanlığını üstlenen, her aşamada bilgi ve deneyimlerini cömertçe paylaşan Doç. Dr. Zafer ŞAHİN'e şükranlarımı sunarım. Akademik gelişimim boyunca gösterdiği değerli katkıları ve desteği için kendisine minnettarım.

Doktora sürecimin başından itibaren beni samimiyetle karşılayan, bilimsel gelişimime büyük katkılar sağlayan ve her türlü yardımı esirgemeyen Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ahmet AYAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimimde değerli katkıları bulunan, sohbetleriyle bizleri neşelendiren Doç. Dr. Mukadder OKUYAN'a, mesai arkadaşlığı ve tecrübeleriyle bana her daim destek olan Dr. Öğr. Üyesi Ömer Faruk KALKAN'a içten teşekkürlerimi iletirim. Ayrıca, çalışmalarımda bana yardımlarını esirgemeyen Araş. Gör. Esra ÖZTÜRK ve Araş. Gör. Burak ÖZGÖREN başta olmak üzere, tüm mesai arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu süreçte en büyük desteği veren aileme; her zaman yanımda olan annem Fatma AKTAŞ, babam İsa AKTAŞ, kardeşlerim Muhammet Emin AKTAŞ ve Betül AKTAŞ'a, ayrıca her daim yanımda olan ve manevi desteğiyle bana güç veren sevgili eşim, hayat arkadaşım Mürşide AKTAŞ'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmamıza 116S480 numaralı proje kapsamında destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Osman AKTAŞ

Bu tez çalışması 116S480 numaralı proje kapsamında TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK SAYFASI	
ONAY	
BEYAN	
İthaf	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	x
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. İnsanlarda Stres Yanıtında Nöroendokrin Sistem	4
2.2. HHA Aksın Fizyolojisi	4
2.2.1. HHA Aks ve Amigdala İlişkisi	7
2.3. Nesfatin-1	12
2.3.1. Nesfatin-1'in Üretildiği Vücut Bölümleri	12
2.3.2. Nesfatin-1 ve Stres Yanıtı	13
3. GEREÇ ve YÖNTEM	16
3.1. Deney Grupları	16
3.2. Erişkin Erkek Hayvanların Seçimi ve Deney Gruplarında Yapılan Uygulamalar	16
3.2.1. Gruplara Uygulanan İşlemler	16
3.2.2. Beyin Bölgelerinin Diseksiyonu	17
3.3. HPLC ve ELISA Analizleri	18
3.4. İmmünohistokimyasal Analizler	19
3.5. Beyin Kesitlerinin Hazırlanması	19
3.6. Floresan İmmünohistokimya	20
3.7. İstatistiksel Analizler	21
4. BULGULAR	22
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	32

5.1. HHA Aks Aktivasyonuna Nesfatin-1'in Etkileri	32
5.2. Amigdala Nörotransmitter ve Katekolamin Düzeylerine Nesfatin-1'in Etkileri	34
5.3. Hipofiz Oksitosin Düzeyine Nesfatin-1'in Etkileri	41
5.4. Sonuçlar	43
6. KAYNAKLAR	44
EKLER	61
Ek 1. Etik Kurul Karar Formu 1	62
Ek 2. Etik Kurul Karar Formu 2	63
Ek 3. Figürlerin Kullanım İzni	64
ÖZGEÇMİŞ	65



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1. PVN’de CRH immünreaktivite bulguları	22
Tablo 2. Serum ACTH düzeyleri	24
Tablo 3. Serum kortikosteron düzeyleri	25
Tablo 4. Amigdala glutamat düzeyleri	26
Tablo 5. Amigdala GABA düzeyleri	27
Tablo 6. Amigdala serotonin düzeyleri	28
Tablo 7. Amigdala noradrenalin düzeyleri	29
Tablo 8. Amigdala dopamin düzeyleri	30
Tablo 9. Hipofiz oksitosin düzeyleri	31

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.	HHA aksın fonksiyonel yapısı	5
Şekil 2.	Akut stres döneminde amigdalada aktivasyon ve inhibisyon sinyallerinin ilerleyişi ve amigdala nükleuslarında aktivasyon ve inhibisyon durumları	8
Şekil 3.	Amigdalada stres uyararı ile nöronal ateşleme düzeyindeki değişikliklerin işleyişi	9
Şekil 4.	NUCB2/Nesfatin geni ile kodlanan proteinin Nesfatin-1'e dönüşmesi	12
Şekil 5.	PVN'de CRH immunreaktivite bulguları	22
Şekil 6.	PVN'de CRH immunreaktivite görüntüleri	23
Şekil 7.	Serum ACTH düzeyleri	24
Şekil 8.	Serum kortikosteron düzeyleri	25
Şekil 9.	Amigdala glutamat düzeyleri	26
Şekil 10.	Amigdala GABA düzeyleri	27
Şekil 11.	Amigdala serotonin düzeyleri	28
Şekil 12.	Amigdala noradrenalin düzeyleri	29
Şekil 13.	Amigdala dopamin düzeyleri	30
Şekil 14.	Hipofiz oksitosin düzeyleri	31

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

5-HT	5-Hidroksitriptofan
ACTH	Adrenokortikotropik hormon
ADH	Antidiüretik hormon
AMPA	A-amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolpro-pionik asit
ARC	Arkuat nukleus
AVP	Arjinin vazopressin
AVPV	Anteroventral periventriküler nukleus
BL	Bazolateral amigdalanın bazolateral bölümü
BLA	Bazolateral amigdala
CeA	Amigdala merkez nukleusu
CeLC	Amigdala merkez nukleusunun lateral/kapsüler bölgesi
CeM	Amigdala merkez nukleusunun medial bölümü
CART	Kokain-amfetamin ile düzenlenen transkript
CRF	Kortikotropin salgılatıcı faktör
CRH	Kortikotropin salgılatıcı hormon
CRHR	Kortikotropin salgılatıcı hormon reseptörü
DRN	Dorsal rafe nukleusu
GABA	Gama-aminobütirik asit
HHA	Hipotalamo-hipofizer-adrenal
HPA	Hypothalamic-pituitary-adrenal
ICM	İnterkalat hücre kütleleri
ICV	İntraserebroventriküler
LAT	Bazolateral amigdalanın lateral bölümü
MeA	Medial amigdala
MSS	Merkezi sinir sistemi
NMDA	N-metil-D-aspartik asit
NTS	Nukleus traktus solitarius
OSS	Otonom sinir sistemi
POMC	Pro-opiomelanokortin
PSS	Perifer sinir sistemi
PVN	Paraventriküler nukleus
VTA	Ventral tegmental alan

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
$>$	Büyük
$<$	Küçük
$\%$	Yüzde
μ	Mikro
$^{\circ}\text{C}$	Santigrad derece

Formüller

Ca^{2+}	Kalsiyum
K^{+}	Potasyum
KCa	Kalsiyumla aktive olan potasyum kanalları

ÖZET

İntraserebroventriküler Uygulanan Nesfatin-1'in Amigdala ve Hipotalamo-Hipofizer Adrenal Aksa Etkilerinin Araştırılması

Nesfatin-1, hipotalamusun iştah kontrolü ile ilişkili nöronlarında eksprese edilen ve iştahı azaltıcı (anoreksijenik) etkiye sahip endojen bir peptiddir. Ayrıca, Nesfatin-1'in stresle ilişkili davranışları düzenleyebileceği son dönemlerde tartışılan hususlar arasında yer almaktadır. Stres yanıtı sırasında Nesfatin-1, serotonerjik ve noradrenerjik nöronları aktive ederek hipotalamo-hipofizer adrenal (HHA) aksının etkinliğini artırmaktadır. Nesfatin-1'in kisspeptin, kortikotropin salgılatıcı hormon (CRH) ve oksitosin reseptörleriyle etkileşimi söz konusudur.

Bu çalışmada, erişkin Wistar albino erkek sıçanlar altı gruba ayrıldı. Deney grupları kontrol, Nesfatin-1, Nesfatin-1+p234, Nesfatin-1+Antalarmin, Nesfatin-1+Astressin2B ve Nesfatin-1+Atosiban olacak şekilde planlandı. Sıçanlar anestezi altında lateral ventriküle enjeksiyon yapıldıktan 30 dakika sonra sakrifiye edildi. HPLC ile amigdala noradrenalin ve dopamin düzeyleri, ELISA ile glutamat, gamma-aminobütirik asit (GABA), serotonin düzeyleri ve serum kortikosteron seviyeleri ölçüldü. Beyinlerden immünohistokimyasal analizler için kesitler alındı. Sonuçlar one-way ANOVA ve Tukey testiyle analiz edildi.

Nesfatin-1 ve Nesfatin-1+p234 gruplarında, paraventriküler nükleustaki CRH immünreaktivitesi, amigdala noradrenalin düzeyleri, serum adrenokortikotropik hormon ve kortikosteron seviyeleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p<0.05$). Aynı zamanda bu grupların amigdala GABA ve dopamin düzeyleri Nesfatin-1+Atosiban grubuyla birlikte kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde düşük bulundu ($p<0.05$). Amigdala glutamat ve hipofiz oksitosin düzeylerinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$). Serotonin düzeyleri ise sadece Nesfatin-1+p234 grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.05$).

Sonuçlarımız, Nesfatin-1'in HHA aksını aktive ettiğini ve amigdalayı uyardığını göstermektedir. Ayrıca Nesfatin-1, kisspeptin sinyalleşmesinin bozulduğu durumlarda da HHA aks aktivitesini artırmaktadır. Nesfatin-1'e bağlı bu etkilerde amigdalada serotonin ve GABA düzeylerinin azalmasının rolü olduğu söylenebilir.

Anahtar Sözcükler: Adrenal Bez, Amigdala, Hipofiz, Hipotalamus, Nesfatin-1

ABSTRACT

Investigation of the Effects of Intracerebroventricularly Administered Nesfatin-1 on the Amygdala and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis

Nesfatin-1 is expressed in neurons related to appetite control in the hypothalamus and is known for its anorexigenic (appetite-suppressing) effect. Additionally, it has been suggested that Nesfatin-1 may regulate stress-related behaviors. During the stress response, Nesfatin-1 activates serotonergic and noradrenergic neurons, enhancing the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. Nesfatin-1 interacts with kisspeptin, corticotropin-releasing hormone (CRH), and oxytocin receptors.

In this study, adult male Wistar albino rats were divided into six groups. The experimental groups were planned as control, Nesfatin-1, Nesfatin-1+p234, Nesfatin-1+Antalarmin, Nesfatin-1+Astressin2B and Nesfatin-1+Atosiban. Thirty minutes after the injection into the lateral ventricle under anesthesia, the rats were sacrificed. Amygdala norepinephrine and dopamine levels were measured using HPLC, while glutamate, gamma-aminobutyric acid (GABA), serotonin levels and serum corticosterone were measured using ELISA. Brain sections were taken for immunohistochemical analysis. The results were evaluated using one-way ANOVA and Tukey's test.

In the Nesfatin-1 and Nesfatin-1+p234 groups, CRH immunoreactivity in the paraventricular nucleus, amygdala norepinephrine levels, serum adrenocorticotrophic hormone and corticosterone levels were found to be significantly higher compared to the control group ($p<0.05$). Additionally, the GABA and dopamine levels in the amygdala of these groups, along with the Nesfatin-1+Atosiban group, were significantly lower than in the control group ($p<0.05$). No statistically significant differences were found in amygdala glutamate and pituitary oxytocin levels ($p>0.05$). Serotonin levels was significantly lower only in the Nesfatin-1+p234 group compared to the control group ($p<0.05$).

Our results indicate that Nesfatin-1 activates the HPA axis and stimulates the amygdala. Additionally, Nesfatin-1 enhances HPA axis activity even when kisspeptin signaling is impaired. It was also found that the reduction of serotonin and GABA levels in the amygdala plays a role in these Nesfatin-1-induced effects.

Keywords: Adrenal Gland, Amygdala, Hypothalamus, Nesfatin-1, Pituitary Gland

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Nesfatin-1, Oh-I ve ekibi tarafından 2006 yılında keşfedilen, 82 aminoasitten oluşan bir peptid hormondur (1). Bu hormon, *Nucb2* geni tarafından kodlanmaktadır (Gene ID: 59295, NCBI, 2024). Nesfatin/NUCB2, hipotalamusun iştah kontrolü ile ilişkili bölümlerinden paraventriküler nükleusta (PVN), arkuat nükleusta, lateral hipotalamik alanda ve zona insertada yer alan nöronlarda eksprese edilir (1). Beyinde hipotalamus dışında, Edinger Wesfal (EW) nükleusu, amigdalanın merkezi nükleusunda, nükleus traktus solitarius (NTS), vagusun dorsal nükleusu, kaudal rafe nükleusu, supraoptik nükleus (SON), lokus seruleus, periakvaduktal gri cevher gibi bölgelerde de Nesfatin-1 immünreaktivitesi gözlemlenmiştir (2).

Beslenmenin uyarılması veya devam ettirilmesiyle ilişkili davranışlar, genellikle savunma veya korunma davranışlarıyla negatif bir ilişkiye sahiptir (3). Bu nedenle, iştahı azaltıcı etkilere sahip faktörler, doğrudan veya dolaylı olarak stres yanıtının tetiklenmesiyle ilişkilendirilebilir (4). Dolayısıyla, iştahı azaltarak beslenme davranışını etkileyen Nesfatin-1'in, savunma veya stresle ilişkili davranışların düzenlenmesinde bir rol oynaması muhtemeldir. Stres altında iştahın değiştiği bilinmektedir (5). Benzer şekilde, iştahı artıran faktörlerin kortizol salınımını etkileyerek stres yanıtına katkıda bulunabildiği bilinmektedir (6). Ayrıca, midenin doluluk derecesi ve tüketilen yemeğin içeriği gibi faktörlerin stres yanıtını etkileyebileceği öne sürülmektedir (7). Bu bağlamda, birçok nöropeptid, hem beslenme hem de stresle ilişkili durumlarda etkili olabilir. Nesfatin-1'in bu peptidlerle yakın bir etkileşim içinde olduğu görülmektedir. Örneğin, Nesfatin-1 ürokortin-1 ile yaklaşık %90 (8), melanin konsantr edici hormon ile %80 (9), pro-opiomelanokortin (POMC) ve kokain-amfetamin düzenleyici transkript (CART) nöronları ile %70 (10), melanosit uyarıcı hormon ile %60, vazopressin nöronları ile %50, oksitosinle %40, nöropeptid Y nöronları ile %40, büyüme hormonu salgılatıcı hormon (GHRH) ile %30, kortikotropin salgılatıcı hormon (CRH veya kortikotropin salgılatıcı faktör (CRF)) ile %20 oranında birlikte yerleşim göstermektedir (10). Ayrıca bu ilişkiye serotonin ve noradrenalin nöronları da dahildir (11).

Nesfatin-1'in ruhsal durum değişiklikleriyle olan ilişkisi intraserebroventriküler (ICV) enjeksiyon sonrası sıçanlarda gözlenen anksiyete benzeri davranış ile gün yüzüne çıkmıştır (12). Nitekim Nesfatin-1 ile ilgili yapılan bir çalışmada puberte ve üreme ile ilgili endokrin değerlerin kisspeptin reseptör antagonisti p234 tarafından modülasyonu söz konusuken aynı etkinin beslenme davranışında kısmen geçerli olduğu görülmüştür (13).

Nesfatin-1 grubu dâhil olmak üzere özellikle Nesfatin-1+p234 grubundaki hayvanlarda gözlemlenen sinirlilik ve çevreden gelen uyarılara aşırı reaksiyon nedeniyle, bu durumun irdelenmesi gerektiği kanısına varılmıştır.

Akut kısıtlama testi sonrası, PVN, SON, NTS ve EW nükleuslarında bulunan Nesfatin-1 nöronlarında aktivasyon gözlemlenebilmektedir (14, 15). Nesfatin-1, rafe nükleusundaki serotonerjik nöronları ve lokus seruleusdaki noradrenerjik nöronları uyabilir ve bu durum, PVN'deki CRH nöronlarını aktive ederek HHA aksının etkinliğini artırır (11). Damar içi Nesfatin-1 enjeksiyonu, plazma adrenokortikotropik hormon (ACTH) ve kortizol düzeylerinde artışa neden olur (16). Ayrıca, lateral ventriküle Nesfatin-1 enjeksiyonu kan basıncını yükseltir (17). Bu etkinin, melanokortin reseptörleri aracılığıyla renal sempatik sinirlerin aktivasyonu ile gerçekleştiği düşünülmektedir (18). Periferik Nesfatin-1 enjeksiyonu da kan basıncında artışa yol açtığı rapor edilmiştir (19).

Nesfatin-1'in primer işlendiği alan ve reseptörü/reseptörleri henüz bilinmemektedir. Konuyla ilgili olarak, 2016 yılında, ¹²⁵I-Nesfatin-1 otoradiyografi tekniği kullanılarak yapılan bir çalışmada, Nesfatin-1'in muhtemel reseptör dağılımının beyinde PVN başta olmak üzere area postrema, serebral korteks, hipofiz ve cerebelluma uzanan alanlarda yoğunlaştığı ileri sürülmüştür (20). Aynı çalışmada, Nesfatin-1 ilişkili reseptörlerin beyin dışında, periferik alanlarda özellikle gastrointestinal kanal ve pankreas, adrenal bezler, üreme organları ve yağ doku gibi endokrin yapılar ile kalp, karaciğer, böbrekler, iskelet kası ve akciğerlerde tespit edildiği rapor edilmiştir. Bu veriler, amigdala ve HHA aks aktivasyonunda, santral nesfatin-1 etkisinin olduğuna dair önemli kanıtlardır.

Her ne kadar Nesfatin-1'in kendine ait reseptörü tam olarak tanımlanmamış olsa da etkileşime girebileceği muhtemel reseptörler bulunmaktadır. 2010 yılında, hipotalamusun farklı alanlarında, NUCB2 ve fosforillenmiş-mammalian target of rapamycin'in (mTOR) komşuluğu bildirilmiştir (21). mTOR'un, Kiss1 gen ekspresyonunda düzenleyici aktörlerden biri olabileceği düşünülmektedir (22). Nesfatin-1 ile ortaya çıkan etkilerin kisspeptin reseptör antagonisti ile ortadan kalkması, kisspeptin reseptörünün bulunduğu bölgelerde Nesfatin-1'in de rol oynayabileceğini göstermektedir. Konuyla ilgili yapılan bir çalışmada, kisspeptin reseptör antagonisti ile Nesfatin-1'in etkilerinin azaltılabildiği belirlenmiş ve arkuat nükleus (ARC) kisspeptin nöronlarının immünreaktivitesinin Nesfatin-1 grubunda, Nesfatin-1+p234 grubuna kıyasla daha yoğun olduğu tespit edilmiştir (13). Bu bulgular,

Nesfatin-1 ile Kiss1 reseptörü arasında doğrudan veya dolaylı bir ilişki ve aynı zamanda kisspeptin nöron aktivitesinin düzenlenmesinde bir birliktelik olabileceğini göstermektedir.

Nesfatin-1, beslenme davranışı ve puberte sürecinde görev almanın yanı sıra, erişkin dönemde gonadotropin uyarıcı potansiyele de sahiptir (23). Bu işleyişte, beslenme davranışı ve vücut ağırlığı değişimi üzerine kisspeptin reseptör blokeri ile kısmen değişiklik oluşturmaya rağmen, puberte yaşı, gonadotropin sekresyonu ve ARC immünreaktivitesinin kisspeptin reseptör blokeri ile baskılanabilmesi, kisspeptin nöronları ile iş birliğini düşündürmektedir. Burada dikkat çekici husus, endokrin parametrelerin dışındaki gıda alımı gibi duygu durumla sıkı iş birliği içinde olan fonksiyonların yanıtında farklılıklar olmasıdır. Nitekim yukarıda bahsi geçen çalışmada Nesfatin-1 ve özellikle Nesfatin-1+p234 grubunda gözlemlediğimiz anksiyete ile ilişkili davranışlar, mevcut araştırma projemize farklı araştırmacılar tarafından elde edilen bulgulara da dayanarak temel oluşturmuştur (13). Bu nedenle stres veya HHA aktivasyonu gibi durumlarda Nesfatin-1 ve kisspeptin reseptör aktivitesinin değişebileceği muhtemeldir. Nesfatin-1'in amigdala ile etkileşme potansiyeline sahip olması nedeniyle de, santral uygulama sonrası amigdaladaki nörotransmitter ile nöropeptid aktivitesinin ve HHA aksa ait hormonların değişiminin belirlenmesi önem arz etmektedir.

Tüm bu bilgiler doğrultusunda Nesfatin-1'in stres fizyolojisinde/patofizyolojisinde merkezi ve periferik etki mekanizmasına dair veri elde etmek, tez çalışmamızın temel amacıdır. Bu gerekçeyle, ana hipotezimiz Nesfatin-1'in HHA aks üzerine uyarıcı etkisi olabileceği yönündedir. Nesfatin-1'in muhtemel uyarıcı etkisinde CRH, kisspeptin ve oksitosin ile etkileşimlerinin söz konusu olabileceği ikincil hipotezlerimiz olarak belirlenmiştir. Bu sebeple çalışmamızda, Nesfatin-1'in etkilerini daha iyi değerlendirebilmek için çeşitli reseptör antagonistleri kullanılmıştır. Kisspeptin reseptörlerini bloke etmek amacıyla p234, CRH1 reseptör antagonisti olarak antalarmin, CRH2 reseptör antagonisti olarak astressin2B ve oksitosin reseptörlerini bloke etmek için atosiban tercih edilmiştir. Bu antagonistler sayesinde, Nesfatin-1'in farklı reseptör yolları üzerinden gösterdiği etkiler incelenmiş ve HHA aks üzerindeki rollerine dair daha kapsamlı bir anlayış elde edilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçlara ulaşmak için hipotalamusun PVN alanında CRH immünreaktivitesi, serumda ACTH ve kortikosteron analizlerinin yanı sıra amigdalada glutamat, GABA, serotonin, noradrenalin ve dopamin ile hipofizde oksitosin seviyelerindeki değişiklikler değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnsanlarda Stres Yanıtında Nöroendokrin Sistem

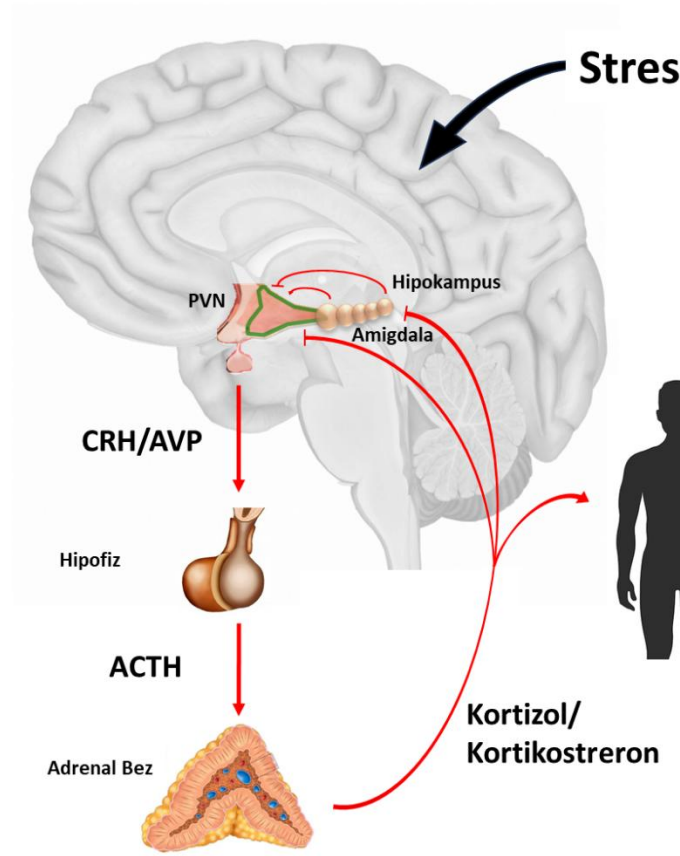
Vücut, iç veya dış kaynaklı stresle karşı karşıya kaldığında, nöronal ve endokrin sistemlerin bir arada hareket etmesiyle nöroendokrin bir cevap oluşur (24). Bu cevabın en temel bileşeni HHA aksıdır (24). Aksın yanı sıra, limbik sistem de bu düzenlemeye katkıda bulunur (25). Limbik sistemin bir bölümü olan amigdala, hipokampus ve prefrontal korteks, stres yanıtında önemli roller üstlenir (25, 26). Ayrıca, dış kaynaklı stres durumlarında serebral korteksin yanıtın başlamasındaki rolü de büyüktür (26).

2.2. HHA Aksın Fizyolojisi

Vücut, stresle başa çıkmak için HHA aksiyonunu harekete geçirerek temel bir yanıt verir (27). Bu süreç, hipotalamusun CRH tarafından uyarılmasıyla başlar. CRH, PVN'den salınarak, genellikle arjinin vazopressin (AVP veya Antidiüretik Hormon (ADH)) hormonu ile birlikte hipotalamo-hipofizer portal dolaşıma geçer. Bu, ön hipofizden adrenokortikotropin salgılatıcı hormonunun (ACTH) kan dolaşımına verilmesine neden olur. ACTH da adrenal bezin korteksinden glukokortikoid hormonlarının salıverilmesine (insanlarda kortizol, kemirgenlerde ise kortikosteron gibi) yol açar (Şekil 1)(27).

Stres dışında, HHA aksı sirkadiyen ritme sahiptir ve bu ritim, hipotalamik suprakiazmatik nükleus tarafından kontrol edilir (28). CRH'nın üretimi ve salgılanması, PVN üzerindeki noradrenerjik uyarılar tarafından da etkilenir (29). Bu uyarıların kaynağı, NTS ve ventrolateral oblongatanın medullar alanları olarak belirtilir (29). Vücuttaki glukokortikoid seviyeleri, hipotalamus ve hipofizde hormonal olarak negatif geri bildirim sistemi aracılığıyla kontrol edilir (30, 31).

Stres cevabında, medulladan salınan katekolaminler -özellikle adrenalin ve noradrenalin- vücuttaki otonomik etkilerden sorumludur (32). Stres yanıtına uyum sağlamak için bu geri bildirim sisteminin iyi çalışması önemlidir (32).



Şekil 1. HHA aksın fonksiyonel yapısı.

Kısaltmalar: PVN: Hipotalamik paraventriküler nükleus, CRH: Kortikotropin salgılatıcı hormon, AVP: Arjinin vazopressin, ACTH: Adrenokortikotropik hormon.

CRH'in etkinliği, stres cevabının yanı sıra dikkat ve endişe davranışlarıyla ilişkilidir. Lokus seruleus bölgesindeki nöronların ateşleme hızını artırarak noradrenalin salınımını artırır (33, 34). Aynı etki, rafe nükleuslarındaki serotonin salınımında da gözlemlenir. Amigdalanın merkez nükleuslarında (CeA) bulunan CRH içeren nöronlar, lokus seruleus ile rafe nükleuslarındaki noradrenerjik ve serotonerjik nöronlarla iletişim kurar (35). Bu iletişim sayesinde, CeA'da artan CRH, lokus seruleus ve rafe nükleusları bölgelerinde de görülebilir (36). HHA aksının kontrolünde, amigdalanın prefrontal korteksle olan bağlantıları önemli rol oynar (37). Prefrontal korteks, önceki deneyimlerden kaynaklanan duygusal yanıtın oluşmasında kritik bir rol oynar (37). Bu alan, gama-aminobütirik asit (GABA) aracılığıyla CRH seviyelerini amigdala ve hipotalamus düzeyinde değiştirerek aksının düzenlenmesine katkıda bulunur (37).

Bir nöropeptid hormon olan CRH, vücutta, endokrin, otonom ve immün sistemle ilişkili hücrelerde önemli görevleri bulunur. Bunların yanı sıra, davranışın düzenlenmesinde - özellikle duygu-durum, endişe/korku ve öğrenme ile ilişkili beyin bölgelerinde - fonksiyonlara sahiptir (38). CRH, nöronlara öncelikle CRH reseptörü 1 (CRHR1) aracılığıyla bağlanarak etkisini gösterir (39). Ayrıca, diğer etkilerini ortaya çıkarmak için CRH reseptörü 2 (CRHR2) kullanır (39). CRHR1'lerin yoğunluğu genellikle limbik sistem yapılarında fazladır. Strese karşı oluşan nöroendokrin yanıtı ve davranışsal yanıtı düzenleyen PVN, bazolateral amigdala (BLA), hipokampus ve prefrontal korteks gibi alanlarda bulunur (40). CRHR2 ise daha çok ventromedial hipotalamus, dorsal rafe nükleusu (DRN) ve medial amigdalada (MeA) gibi bölgelerde bulunur (40). CRH, CRHR1 ile stres cevabının başlatılmasını sağlarken, CRHR2 ile cevabın düzenlenmesinde ve sonlandırılmasında rol oynadığı düşünülmektedir (41).

Strese verilen yanıtta CRH'nın temel görevi, HHA aksının harekete geçirilmesini sağlamaktır. Ayrıca, HHA aksının temel aktivitesinin sürdürülmesinde de önemli bir rol oynar. CRH seviyesindeki artış, insanlarda kortizol ve kemirgenlerde kortikosteron gibi glukokortikoid hormonların salgılanmasını artırarak vücudun enerji metabolizmasında, büyüme süreçlerinde, bağışıklık fonksiyonunda ve beyin fonksiyonlarında etkili olur (42).

CRH, stres cevabında aktive olan otonom sinir sistemi (OSS) sayesinde "savaş ya da kaç" yanıtının ortaya çıkmasını sağlar. Bu durum, vücuttaki enerjinin depolardan kana doğru mobilize olmasıyla kan şekeri seviyelerinin yükselmesi, kalp hızının artması, sindirim fonksiyonlarının azalması gibi etkilere neden olur (43). Deneysel olarak CRH enjeksiyonuyla, vücutta periferik katekolamin salgılanmasında artış, taşikardi, kan basıncında yükselme, iştah azalması, uyku bozuklukları, cinsel davranışta azalma, yeni çevreye uyum becerisinde düşme gibi otonomik ve davranışsal değişikliklerle karakterize psikopatofizyolojik belirtiler ortaya çıkabilir (44).

HHA aksındaki negatif geri bildirim sistemi genellikle glukokortikoidler aracılığıyla sağlanır (45). Bu sistemde, hipotalamik PVN, hipofiz, limbik sistem ve beyin sapı gibi beyin alanları görev alır (45). Özellikle limbik sistemin bir parçası olan hipokampus, PVN'deki CRH nöronları üzerindeki inhibitör etkisiyle önem kazanır (45). Bu sayede hipokampal inhibitör sinyallerin artması ile glukokortikoidler üzerinden gerçekleşen negatif geri bildirimin gerçekleştiği düşünülür (46).

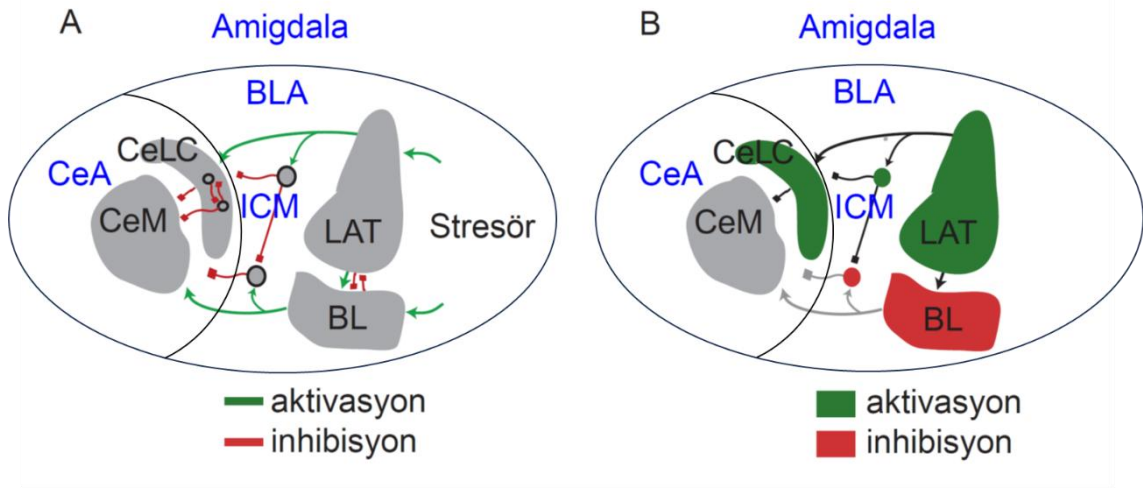
Hipotalamustaki PVN'den CRH'nın salınması, çeşitli nörotransmitterlerin etkileşimiyle düzenlenir (47). Medullar nükleuslardaki noradrenerjik uyarılar, NTS ve ventrolateral oblongata bölümünden gelen sinyaller CRH salgılanmasını artırır (48). Strese karşı gelişen otonomik cevabın düzenlenmesindeki CRH sinyallerinin, amigdalanın CeA nükleusundan lokus seruleus'a uzanan bir alanda etkili olduğu belirtilir (49). Bu etkiyle lokus seruleus aktive olur ve noradrenalin/adrenalin salgılar, böylece adrenal medulla devreye girerek sempatik sinir sistemi aktive olur (49).

Oksitosin, HHA aksının düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan nöropeptitlerden biridir (50). Bu peptit, PVN'deki CRH salgısını azaltır, anterior hipofizden ACTH salınımını baskılar ve hatta adrenal kortekste kortizol salınımını doğrudan inhibe edebilir (50). Ayrıca, oksitosin, PVN dışındaki GABAerjik interneuronları aktive ederek CRH nöronlarını inhibe eder (50). Bu mekanizmalar, oksitosinin HPA aksı üzerinde güçlü bir baskılayıcı etki gösterdiğini ortaya koymaktadır (50).

2.2.1. HHA Aks ve Amigdala İlişkisi

Limbik sistemin bir parçası olan amigdala; CeA, BLA kompleksi ve medial amigdala olmak üzere üç bölümden oluşur. CeA nükleusu; medial (CeM), lateral ve lateral/kapsüler bölge (CeLC) olmak üzere üç alt bölümünden oluşur (51). BLA parçası ise lateral (LAT), bazolateral (BL) ve bazomedial nükleusların birleşiminden oluşur (52). Burada bulunan bazomedial nükleus aksesuar bazal nükleus olarak da adlandırılır (52). Amigdaladaki glutaminerjik regülasyon BLA'dan CeA'ya doğru uzanır (53). Bu yolak, ikisi arasında kalan medial interkalat hücre kütleleri (ICM) olarak adlandırılan inhibitör nöronlar tarafından sıkı bir denetime tabidir (53). Bu alanlar aynı zamanda korteks, talamus, hipokampus ve diğer beyin bölgelerinden de aktive edici impulslar alır (54). Bu impulslar, amigdalanın nöronal aktivitesinin düzenlenmesine yardımcı olur ve stres cevabının oluşumunda görev alır (54).

Amigdala, stres cevabının yanı sıra otonomik, hormonal ve davranışsal yanıtlarla da ilişkilidir (55). Stres ile ilgili cevapları BLA'dan prefrontal korteks, bed nükleusun stria terminalisi ve hipokampusa uzanan bağlantılar sağlarken, diğer otonomik, hormonal ve davranışsal cevapları da CeA'dan çıkan ve hipotalamus PVN, bed nükleusun stria terminalisi ve beyin sapına uzanan bağlantılar sağlamaktadır (55).



Şekil 2. Akut stres döneminde amigdala aktivasyon ve inhibisyon sinyallerinin ilerleyişi (A) ve amigdala nükleuslarında aktivasyon ve inhibisyon durumları (B) (Ferrara ve ark.nın makalesinden değiştirilerek alınmıştır, 56)

Kısaltmalar: CeA: Central amigdala nükleusu, BLA: Bazolateral amigdala nükleusu, LAT: BLA'nın lateral bölümü, BL: BLA'nın bazolateral bölümü, CeM: CeA'nın medial bölümü, CeLC: CeA nükleusunun lateral, lateral kapsüler ve intermediate bölümlerini içeren lateral/kapsüler bölge, ICM: BLA ve CeA arasındaki medial interkalat hücre kütleleri.

Stresin akut döneminde amigdala farklı düzenlemeler meydana gelmektedir (Şekil 2, A ve B). Amigdala devresinde stresle beraber oluşan aktive edici impulslar (yeşil çizgiler) ve inhibe edici impulslar (kırmızı çizgiler) Şekil 2A'da gösterilmektedir. Amigdala nükleuslarının stres yanıtında aktive olmasını (yeşil renk) veya inhibe olmasını (kırmızı renk) Şekil 2B'de gösterilmektedir. Stres uyarınının gelmesiyle BLA'nın LAT bölümünde aktivasyon meydana gelirken BL'de inhibisyon oluşur (56). ICM'deki işleyiş değişken olmakla beraber dorsal ICM'de aktivasyon gerçekleşirken, ventral ICM'de hem dorsal ICM'nin aktivasyonu hem de BL'deki baskılanmanın etkisiyle inhibisyon meydana gelmektedir (56). LAT aktivasyonu CeA'nın CeLC bölümünde aktivasyona neden olur (56). CeLC'deki aktivasyon ve BL'deki inhibisyona bağlı olarak CeA'daki aktivasyon ve inhibisyon düzenlenir (56). CeA'daki bu iki yönlü durum, yaşanan stresin niteliği ve emosyonel hafızanın kortikal alanlar ile limbik sistemde değerlendirildikten sonra cevabın artırılıp azaltılmasında etkilidir (56).

Amigdala, HHA aksının düzenlenmesinde önemli bir yapı olmakla birlikte, bu süreçte hipokampus da kritik bir role sahiptir (57). Hipokampus, hem doğrudan hem de dolaylı yolla amigdalanın stres yanıtını baskılayarak, duygusal hafıza ve stres cevabında dengeleyici bir etki oluşturur (57). Özellikle, hipokampustan CeA'ya giden sinyaller, CRH sentezini inhibe ederek stres yanıtını azaltır (57). Amigdalanın yanı sıra PVN ve lokus seruleus ile olan bağlantıları da stres yanıtını baskılar ve bunların hepsi için GABA aracılık etmektedir (58).

Vücuttaki CRH seviyelerinin değişiminde amigdala'daki GABA'nın önemli bir rolü vardır (58). Özellikle prefrontal korteksin medial ve orbital alanlarının, hipotalamusa doğrudan sinapslarıyla birlikte amigdala ile olan karşılıklı sinapsları bu süreçte önemli bir işlev üstlenir (58). Bu bölgelerin aktive olmasıyla stres cevabının kontrol edilmesi ve negatif geri bildirim sisteminin kolaylaştırılması sağlanır (58). Prefrontal korteksin, amigdala, hipotalamus ve PVN'deki CRH aktivitesini baskılayıcı etkisinde GABA'nın önemli bir rolü olduğu öne sürülmüştür (58).

GABA'nın stres cevabındaki regülatör rolü, akut stresin ötesinde kronik stresle uyum sağlamak için de önemlidir. Travmaya yanıt olarak, akut dönemde glukokortikoid seviyelerinde artış görülürken (59, 60), travma sonrası dönemde bu seviyeler düşük düzeylerde seyredebilir (61). Bu durum, stresle başa çıkmanın ve yanıtın düzenlenmesinin önemini vurgular (61).

Glutamat, merkezi sinir sisteminde (MSS) en yaygın uyarıcı nörotransmitterlerden biri olup stres fizyolojisinde önemli rol oynar (62). Stres altında ya da glukokortikoid uygulaması sonrasında glutamat aktivitesinde artış gözlenmektedir (62). Glutamatın bu artışı özellikle korku koşullanması, öğrenme ve hafıza gibi süreçlerle ilişkilidir (62). Glutamat etkilerini iyonotropik (özellikle NMDA ve AMPA) ve metabotropik reseptörler aracılığıyla gerçekleştirir (62). Stres yanıtında, BLA ile medial prefrontal korteks gibi bölgelerdeki NMDA reseptörlerinin aktivasyonu dikkat çeker (62). Özellikle glutamaterjik yollar, BLA'dan başlayarak CeA bölgesine kadar uzanır ve bu devre, arada bulunan inhibitör ICM tarafından sıkı biçimde düzenlenir (63). Bu düzenleme, amigdalanın stres uyarısına karşı verdiği yanıtın hassasiyetini ve yönünü belirlemede kritik bir öneme sahiptir (63).

Serotonin, stres yanıtının düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan inhibitör bir nörotransmitterdir (64). Beyindeki birçok bölgeye yayılan serotonerjik projeksiyonlar, özellikle amigdala, prefrontal korteks ve hipotalamus gibi stresle ilişkili alanlarda

yoğunlaşır (64). Rafe nükleusundaki serotoninin, PVN, hipokampus ve amigdala ile olan bağlantıları, stres yanıtının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (64). Bunlardan amigdala ile olan bağlantıları korku, kaygı ve duygusal öğrenme süreçlerini modüle eder (65). Serotoninin PVN’de artışı stres cevabının aktivasyonu yönünde etkiler oluşturduğu gözlenmektedir (65).

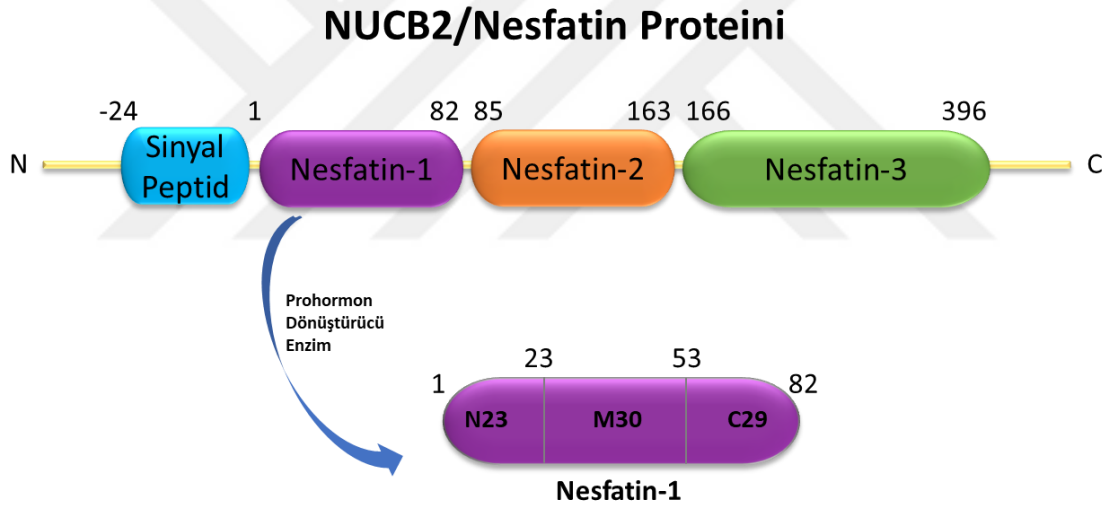
Noradrenalin, stres yanıtının başlatılması ve sürdürülmesinde kilit rol oynayan bir nörotransmitterdir (66). Lokus seruleus, merkezi noradrenerjik sistemin ana kaynağıdır ve stres durumlarında hızla aktive olur (66). Lokus seruleusden salınan noradrenalin, amigdala, hipotalamus, prefrontal korteks ve hipokampus gibi stresle ilişkili beyin bölgelerine yayılır (66). Bu yayılım sayesinde, hem bilişsel hem de duygusal stres yanıtları düzenlenir (66). Özellikle amigdala üzerinde uyarıcı etkileri olan noradrenalin, korku koşullanması ve tehdit algısında önemli rol oynar (67). Ayrıca noradrenalin, hipotalamusta CRH salınımını artırarak HHA aksının aktivasyonunu kolaylaştırır (67). Bu etkileriyle noradrenalin, stresin hem nörokimyasal hem de davranışsal bileşenlerini şekillendiren temel bir araçtır (67).

Dopamin, stres yanıtı ve ödül-motivasyon sistemleri arasında köprü kuran bir nörotransmitterdir (68). Mezőlimbik dopaminerjik yolak, özellikle ventral tegmental alan (VTA) ve nükleus akümbens arasında yer alır ve stresin motivasyonel ve duygusal bileşenlerinin düzenlenmesinde rol oynar (68). Stresörlere maruz kalındığında, VTA’daki dopaminerjik nöronların aktivitesi artar ve nükleus akümbensde dopamin salınımı meydana gelir (69). Bu artış, bireyin stresörle başa çıkma davranışlarını ve ödül beklentisini etkileyebilir (69). Ayrıca dopamin, prefrontal korteks üzerinden bilişsel kontrol ve dikkat süreçlerini modüle ederek stres karşısında esnek yanıtların geliştirilmesine katkıda bulunur (70). Ancak kronik stres, dopaminerjik sistemin duyarlılığını azaltabilir ve depresyon, zevk alamama (anhedoni) gibi psikopatolojilere zemin hazırlayabilir (70).

Özetle, amigdala ve HHA aksı arasındaki etkileşim, stres yanıtı ve anksiyete düzeyi gibi durumların düzenlenmesinde önemli bir rol oynar ve bu sürecin işleyişi, limbik sistemin ve nörotransmitterlerin etkileşimiyle sağlanır.

2.3. Nesfatin-1

NUCB2 proteininin kesilmesiyle ortaya çıkan bir hormon olan Nesfatin-1, 82 aminoasitten oluşan bir peptiddir. NUCB2/Nesfatin proteini ise 396 aminoasitten oluşan ve 24 amino asitlik bir sinyal peptidi dizisine sahip bir protein yapısıdır (71, 72). Bu sinyal peptidi, proteinin endoplazmik retikulumla yönlendirilmesine yardımcı olur. NUCB2 proteini, Prohormon Convertase ile proteolitik işlem geçirir. İşlem sonrasında Nesfatin-1 (1-82 aminoasit), Nesfatin-2 (85-163 aminoasit) ve Nesfatin-3 (166-396 aminoasit) olmak üzere üç ürün ortaya çıkar (1). Nesfatin-1 ise N-terminal (N-23), orta bölüm (M-30) ve C-terminal (C-29) olmak üzere üç parçaya sahiptir. Özellikle M-30 olarak da adlandırılan bu orta bölüm, peptidin aktif kısmı olarak kabul edilir ve Nesfatin-1'e atfedilen fizyolojik etkilerden sorumlu kısım olduğu düşünülmektedir (Şekil 6) (23).



Şekil 4. *NUCB2* geni ile kodlanan proteinin Nesfatin-1'e dönüşmesi (García-Galiano ve ark.nın makalesinden değiştirilerek alınmıştır, 23)

2.3.1. Nesfatin-1'in Üretildiği Vücut Bölümleri

Nesfatin-1 hem öncül proteini hem de kendisi, MSS'de hipotalamusun PVN, arkuat nükleus, supraoptik nükleus ve lateral hipotalamik alanda bulunmaktadır. Ayrıca hipofiz bezinde, NTS gibi beyin sapı bölgelerinde de yer alır. Önbeyin ve ortabeyin nükleusları, CeA, beyin sapının ventrolateral medulla alanı ve serebellum gibi MSS yapıları ile birlikte torakolumbal sempatik ve sakral parasempatik spinal kord pregangliyonik sinirleri gibi perifer sinir sistemi (PSS) yapılarında da bulunabilir (15, 73).

PVN, arkuat nükleus, lateral hipotalamik alan ve supraoptik nükleusta Nesfatin-1'in CRH, oksitosin, POMC ve CART nöronlarıyla kolokalizasyonu vardır (10, 74, 75). Sinir sisteminin dışında da yağ doku, mide mukozası, pankreasın beta hücreleri ve testis gibi vücudun perifer alanlarında Nesfatin-1 sekresyonu söz konusudur (1, 15, 23, 73, 76, 77). Üstelik vücudun periferinde üretilen Nesfatin-1 düzeyi sinir sisteminden çok daha fazladır. Bu peptidin midenin oksintik mukozasındaki düzeyinin beyindeki 10 kat daha fazla olduğu belirtilmiştir (77).

Nesfatin-1'in fizyolojik rolü ile ilgili olarak, 2006 yılında anoreksijenik bir peptid olarak keşfedildikten sonra sinir sistemi, kardiyovasküler sistem, endokrin sistem ve immun sistemi kapsayan birçok alanda etkileri olduğu belirlenmiştir. Bu peptidin güçlü bir anoreksijenik etkiye sahip olduğu bilinmesine rağmen diğer fizyolojik etkileri ve etki mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Özellikle son dönemlerde Nesfatin-1'in stres fizyolojisi, anksiyete ve depresyon gibi nöropsikiyatrik bozuklukların patofizyolojisinde rol aldığına dair çalışmalar artış göstermektedir (78).

Nesfatin-1'in iyi bilinen anoreksijenik etkisinde ve gastrik motiliteyi düzenleyici rolünde CeA nükleusunun da dahil olduğu melanokortin yolağının rol aldığı rapor edilmiştir (79). Ayrıca PVN ve lateral hipotalamik alan üzerinden gastrik motilitenin inhibe edici bir sinyal tarafından düzenlendiği bildirilmiştir (80). Bu veriler, Nesfatin-1'in PVN ve CeA gibi bölgeler arasında etkileşim göstererek HHA aksın aktivasyonunda ve stres fizyolojisinde önemli roller üstlendiğini göstermektedir.

2.3.2. Nesfatin-1 ve Stres Yanıtı

Stres unsurlarının etkisi altında oluşan yanıtlarının düzenlenmesinde Nesfatin-1'in de etkili olduğu düşünülmektedir. Özellikle strese bağlı anoreksi ile ilgili olarak, Nesfatin-1'in bu etkiyi muhtemelen parvoselüler PVN'deki NUCB2 ekspresyon gösteren nöronları aktive ederek gösterdiği belirtilmektedir (81). Bu nedenle, Nesfatin-1'e bağlı anoreksijenik etkinin stres yolağının aktive olmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Erkek sıçanlarda 30 dakikalık akut kısıtlama stresine maruz kalmanın ardından farklı beyin alanlarındaki nükleusların c-Fos immünreaktivitesinde artış görülmüştür (82). C-Fos ve Nesfatin-1'in ikili immünohistokimyasal boyaması sonucunda supraoptik nükleusta %95, ventrolateral medullanın %90, lokus serulusunda %80, rostral rafe pallidusta %57, NTS'nin kaudal nükleusunda %48, PVN'nin anterior parvoselüler kısmında %48 ve bu alanın dışındaki PVN nükleuslarında %10-20 oranında NUCB2/Nesfatin-1

immünreaktivitesi tespit edilmiştir (82). Hipotalamus ve stresle ilişkili diğer beyin bölgelerinde, akut psikolojik stres sonrasında NUCB2/Nesfatin-1 immünreaktivitesindeki artışın, bu peptidin stres yanıtında beyinde rol aldığını gösterdiği belirtilmektedir (82).

Benzer şekilde, başka bir çalışmada, akut kısıtlama stresini takiben PVN, supraoptik nükleus, lokus serulous, DRN ve NTS'de NUCB2/Nesfatin-1 immünreaktivitesinde artış olduğu rapor edilmiştir (11). Santral alanlarda Nesfatin-1 immünreaktivitesinde artış olmasına karşın stresi takiben 15 dakika sonrasında plazma Nesfatin-1 düzeyinde bir değişiklik olmadığı belirtilmiştir (11). Oysaki ICV olarak uygulanan Nesfatin-1'in belirtilen nöronların yanı sıra PVN'deki CRH nöronlarında, lokus serulousdaki noradrenalin pozitif nöronlarında ve DRN'deki serotonin pozitif nöronlarında c-Fos protein ekspresyonunu artırdığı gözlenmiştir (11). Bahsi geçen alanlarda NUCB2/Nesfatin-1 ekspresyonunun varlığından dolayı (10), Nesfatin-1'in bu nöronlarda parakrin etkisi olabileceği düşünülmektedir (83).

PVN'deki CRH nöronlarında in vitro Nesfatin-1 uygulamasının Ca^{2+} aktivitesini artırdığı bilinmektedir (11). Ayrıca ICV Nesfatin-1 uygulaması sonrası plazma ACTH ve kortikosteron düzeyleri artış göstermektedir (11, 16). Benzer bir etki periferik Nesfatin-1 enjeksiyonları için de geçerlidir. Nesfatin-1'in tekli veya tekrarlı şekilde intraperitoneal enjeksiyonları hipotalamik CRH mRNA'sını ve serum kortikosteron düzeyini önemli ölçüde artırmaktadır (84). Bu veriler, Nesfatin-1'in PVN'deki CRH nöronlarına direkt etkisi olduğunu ve hem santral hem de periferik olarak stres yanıtını etkilediğini göstermektedir (83).

Strese yanıtta otonomik regülasyon bakımından, NUCB2/Nesfatin-1 düzeylerinin kalp hızı (85) ve kan basıncıyla pozitif ilişkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (86). Bütüncül bir bakış açısıyla, strese yanıtta HHA aks aktivasyonunun yanı sıra Nesfatin-1'in enerji harcanması ve glukoz kullanımının değişimi gibi metabolik etkilerle de bir regülatör molekül olarak iş gördüğü düşünülmektedir (83).

Bir başka kısıtlama stresi olan uzun süreli kısıtlama stresinin ardından hipotalamik PVN'nin parvoselüler bölümünde ve kaudal ventrolateral medullada NUCB2 mRNA ekspresyonu ile NUCB2/Nesfatin-1 immünreaktivitesinde artış olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, kısıtlama stresi sonrasında PVN'deki NUCB2 mRNA ekspresyonu artışıyla birlikte, bilateral adrenalectomi sonrası Nesfatin-1 mRNA ekspresyonunun parvoselüler PVN'de

artış gösterdiği bildirilmiştir (16). Bu bulgular, endojen NUCB2/Nesfatin-1 düzeyinin adrenal steroidler tarafından negatif geri bildirim ile kontrol edildiğini göstermektedir (83).

Nesfatin-1'in hem metabolik hem de stresle ilişkili fonksiyonuyla ilgili olarak, deneysel aktivite temelli anoreksi modelinde PVN, arkuat nükleus, dorsomedial hipotalamus, lokus seruleus ve NTS'de NUCB2/Nesfatin-1 immunreaktif nöronların artış gösterdiği belirlenmiştir (87). Bu bulgular, Nesfatin-1'in metabolik etkilerinin yanı sıra stres fizyolojisinde de önemli bir rol oynadığını göstermektedir (87). Özellikle stres durumlarında, Nesfatin-1'in organizmanın uygun stres yanıtını sağlamasına katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (87).



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney Grupları

Deneylerimizde erişkin Wistar albino soyu erkek sıçanlar kullanıldı. Karadeniz Teknik Üniversitesi Cerrahi Araştırmalar Merkezi'nden temin edildi. Deneysel uygulamalar Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Fizyoloji Anabilim Dalı Davranış Fizyolojisi Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Çalışmada 6 grup olmak üzere toplam 60 hayvan kullanıldı.

Deney Grupları

- Grup 1: Sham
- Grup 2: Nesfatin-1
- Grup 3: Nesfatin-1 + p234 (Kisspeptin reseptör antagonisti)
- Grup 4: Nesfatin-1 + Antalarmin (CRH1 reseptör antagonisti)
- Grup 5: Nesfatin-1 + Astressin2B (CRH2 reseptör antagonisti)
- Grup 6: Nesfatin-1 + Atosiban (Oksitosin reseptör antagonisti)

3.2. Erişkin Erkek Hayvanların Seçimi ve Deney Gruplarında Yapılan Uygulamalar

Çalışma, 250-300 gram ağırlığında erişkin 3 aylık erkek sıçanlar üzerinde yapıldı. Uygulama sabahı aç karnına olacak şekilde 12 saat öncesinde yem alımı durdurulan ve suya erişimi serbest bırakılan hayvanlara sabah 8.30-9.00 saatleri arasında üretan (1.25 g/kg periton içi) ile anestezi uygulandı. Ardından hayvanlar sterotaksik cihaza (Stoelting Co, ABD) yerleştirildi. Kafa derileri açılarak, kemik doku diğer yumuşak dokulardan arındırıldı. Bregma noktası gözetilerek, sterotaksik koordinatlar (lateral ve anteroposterior) belirlendi. Rat beyin atlasından (88) yararlanılarak sağ lateral ventrikül koordinatları hesaplandı ve kafatasındaki iz düşüm noktası işaretlendi. Ardından kafatası dişçi turu yardımıyla delindi. Hamilton enjektörü ile sham grubuna yapay beyin omurilik sıvısı (BOS) ve diğer gruplara da aşağıda belirtilen dozlar yapay BOS içerisinde çözülerek uygulandı. Enjeksiyon sonrası 30. dakikada numuneleri toplamak için deney sonlandırıldı.

3.2.1. Gruplara Uygulanan İşlemler

Sham (vehicle) grubu: Uygulama sabahı aç olacak şekilde, 12 saat öncesinde yem alımı durdurulan ve suya erişimi serbest bırakılan hayvanlara anestezi altında lateral

ventrikül içerisine 2 µl/dakika (dk.) hızında toplam 2 dakika (4 µl hacimde) yapay beyin omurilik sıvısı (BOS) enjekte edildi. Enjeksiyon sonrası 30. dakikada hayvanlar servikal dislokasyonla sakrifiye edilerek deney sonlandırıldı. Kafatası açılarak, hızlı bir şekilde sağ ve sol amigdala diseke edilerek çıkarıldı ve kuru buz içinde hızla dondurulduktan sonra analizler için derin dondurucuda (-20°C) saklandı.

Nesfatin-1 grubu: 25 pmol dozda Nesfatin-1 yapay BOS içerisinde çözülerek, 4 µl hacimde, Grup 1'deki gibi aynı işlem uygulandı (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Lot No: 430590, Catalog No: 003-22A). Enjeksiyon sonrası 30. dakikada deney sonlandırıldı. Sağ ve sol amigdala çıkarılarak kuru buz ortamında hemen dondurulduktan sonra analizler için derin dondurucuya konuldu.

Nesfatin-1 + p234 grubu: Nesfatin-1 25 pmol dozda 2 µl yapay BOS içerisinde enjekte edildikten 5 dakika sonra 1 nmol dozda 2 µl hacimde p234 enjekte edildi (Sigma-Aldrich Co., Lot No: 054M4732V). 30 dakika sonra servikal dislokasyonla sakrifikasyonu takiben önceki gruplarda uygulanan aynı işlemler gerçekleştirildi.

Nesfatin-1 + Antalarmin grubu: Nesfatin-1 enjeksiyonundan 5 dakika önce 0.1 µg dozda Antalarmin (89) enjekte edildi ve sonrasında Nesfatin-1 enjeksiyonu gerçekleştirildi (Axon Medchem, CAS No: 220953-69-5). Bundan önceki gruplarda olduğu gibi aynı işlemler uygulanarak örnekler alındı.

Nesfatin-1 + Astressin2B grubu: Nesfatin-1 enjeksiyonundan 5 dakika önce Astressin 2B 1 µg (89) dozda şekilde uygulandı ve ardından Nesfatin-1 uygulandı (Tocris Bioscience, CAS No: 681260-70-8). 30 dakika sonrasında aynı işlemler gerçekleştirilerek örnekler alındı.

Nesfatin-1 + Atosiban grubu: 300 ng/sıçan dozda Atosiban (90) verilmesinden 5 dakika sonra 50 pmol Nesfatin-1 uygulandı ve 30 dakika sonra aynı işlemler gerçekleştirildi (Tocris Bioscience, CAS No: 90779-69-4).

3.2.2. Beyin Bölgelerinin Diseksiyonu

Servikal dislokasyonla sakrifikasyondan sonra batin açılarak sol ventrikülden kan alınmasını takiben, kafatasının açılması işlemine geçildi. İmmünohistokimyasal analizler için hayvanlara yapılacak işlemler ilgili bölümde yer almaktadır. Diğer hayvanların ilk olarak kafatasları açılacak ve ardından beyin dikkatlice çıkarılarak, hipotalamus, hipofiz ve amigdala diseke edildi.

3.3. HPLC ve ELISA Analizleri

Amigdala doku süpernatantlarında yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ve elektrokimyasal detektör sistemi (ECD) ile noradrenalin ile dopamin konsantrasyonları pg amin olarak, Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Nöroendokrinoloji Laboratuvarı'nda HPLC-ECD cihazları kullanılarak (HPLC, Agilent Technologies 1260 marka; 250x4.6 mm'lik Oktadesilsilan (C18 ODS) analitik HPLC kolonu), gerçekleştirildi (91, 92). Diseke edildikten sonra, derin dondurucuda saklanan, amigdala dokuları tartıldıktan sonra 1 ml 0.1 M hidroklorik asit ile karıştırılarak cam homojenizatör ile homojenize edildi. Homojenizatör tüpü içindeki homojenat plastik ependorf tüplere alınarak +4°C sıcaklıktaki soğutmalı santrifüjde 15 dk süreyle 14000 RPM hızda santrifüj edildi. Üstteki supernatant enjektöre çekilerek 0.45 µm por çaplı mikrofiltreden ve sonrasında da 0.2 µm por çaplı mikrofiltreden geçirildi. Sistemde monoamin analizi için 150x4.6 mm'lik C18 ODS analitik HPLC kolonu kullanıldı. HPLC analiz range değeri 5 olarak ayarlandı. Kolon fırınının sıcaklığı +35°C olarak sabitlendi. Enjeksiyonlar 20 µl hacimde gerçekleştirildi. Monoamin mobil faz içeriği; sitrik asit 32 mM, sodyum sitrat 16 mM, heptanosülfonik asit 0.9 mM, Etilendiamintetraasetik Asit (EDTA) 0.16 mM, tetrahidrofuran 36 mM, glasiyal asetik asit 0.02 M ve metanol 0.616 M konsantrasyonlarında çift distile su (ddH₂O) içinde hazırlandı ve pH'ı 4.20 olarak ayarlandı. Mobil faz çözeltisi por çapı 0.20 µ'luk mikrofiltrelerden süzülecek ve minimal hava kabarcıklarını elimine etmek için 20 dakika süreyle ultrasonik su banyosunda sonikasyon uygulandı.

Monoamin standartları tek tek enjekte edilerek pik geliş süreleri (retention time) belirlendi. Noradrenalin ile dopaminin pik geliş süreleri sırasıyla kaydedildi. Her bir standart için kalibrasyon eğrisi ve formülü oluşturuldu. Ayrıca her gün numunelerden önce ve sonra, belirlenen monoaminlerin standart çözelti konsantrasyonlarının birlikte enjekte edilerek piklerin geliş sürelerindeki değişiklikler takip edildi. Numunelerin analizlerindeki monoamin pik geliş süreleriyle, standart monoamin pik geliş sürelerinin senkronizasyonu sağlandı. Bütün beyin örneklerinin analizi sonucu monoamin konsantrasyonları HPLC-ECD sisteminin software programında kalibrasyon eğrisi referanslarına göre otomatik olarak saptandı. Elde edilen sonuçlar doku ağırlıklarına bölünerek sonuç konsantrasyonlar µg/mg yaş doku ya da pg/mg yaş doku olarak belirlendi.

ELISA analizleri KTÜ Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Amigdalada nörotransmitter (glutamat, GABA ve serotonin) analizlerinin yanı sıra hipofiz oksitosin ve serum kortikosteron, ACTH analizleri, sensivitesi yüksek ve inter-assay/intra-assay varyasyon katsayıları %15'i geçmeyen ticari ELISA kitleri ile üretici firmanın belirlediği prosedürler ve daha önceki analizlerimizde kullandığımız metotlar esas alınarak gerçekleştirildi (93-95). Amigdalada glutamat (MBS269969, MyBioSource, Inc. San Diego, CA, USA), GABA (MBS774667, MyBioSource, Inc. San Diego, CA, USA), serotonin (MBS2611553, MyBioSource, Inc. San Diego, CA, USA), hipofiz bezinde oksitosin (MBS750178, MyBioSource, Inc. San Diego, CA, ABD) seviyeleri analiz edildi. Serum örneklerinde ACTH (MBS2502683, MyBioSource, Inc. San Diego, CA, ABD), kortikosteron (DEV9922, Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel, Almanya) seviyeleri ölçüldü. Antijen bağlanması, ilk olarak serum örnekleri ve standartların ilgili antikorlar ile kaplanmış plakalara eklenmesi ile sağlandı. Ardından, ilgili sıçan hormonuna özgü biotinle işaretlenmiş bir tespit antikoru ve Avidin Horseradish Peroxidase (HRP) konjugatı sırasıyla her mikrotitre plaka kuyusuna eklendi ve inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, standartlardan ve serum örneklerinden elde edilen optik yoğunluklar, otomatik bir ELISA plaka okuyucusunda (Thermo Scientific, ABD) 450 nm dalga boyunda ölçüldü. Analizler, kit protokollerinin rehberliğinde gerçekleştirildi.

3.4. İmmünohistokimyasal Analizler

PVN (CRH) alanında immünohistokimyasal analiz yapıldı. Trabzon'da alınan örnekler uygun koşullar altında saklandı ve yine uygun koşullar altında nakliyesi gerçekleştirilerek immünohistokimyasal analizler Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Fizyoloji Anabilim Dalı Moleküler Fizyoloji Laboratuvarı ile Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

Hayvanlar servikal dislokasyonla sakrifiye edildikten sonra batin açılarak, sol ventrikülden kan alınmasını takiben hayvanlara transkardiyal olarak Heparin + serum fizyolojik karışımı sıvı perfüze edildi. Bu işlemi takiben, %4'lük paraformaldehid solüsyonu transkardiyal yolla beyin dokusuna ulaştırıldı. Böylece beyin alanlarının boyanma veriminde artış ve dolayısıyla daha iyi görüntü elde edilmesi mümkün oldu.

3.5. Beyin Kesitlerinin Hazırlanması

Sıçanların kafatası açıldıktan sonra beyinler çıkarılıp %4 paraformaldehit içinde +4°C'de 4 saat bekletildi. Daha sonra taze %4 paraformaldehit ile solüsyon tazelandikten

sonra 16-20 saat +4°C'de beyin sabitlenmesi devam ettirildi. Ardından %4 paraformaldehit solüsyonu, %25 sükröz solüsyonu ile değiştirilip 24-48 saat +4°C'de beyinler sükrözle doygunluğa erişene kadar beklendi. Sükrözle doygunluğun belirtisi, beyin sükröz solüsyonunun dibine çökmesi olarak kabul edildi. Bu işlem, beyin alanlarının morfolojisini koruması ve daha kaliteli kesit elde edebilmek için yapıldı. Sükröz solüsyonundan çıkarılan beyinler -20°C'de muhafaza edildi. Beyinler, kesit almak için soğutmalı mikrotoma yerleştirildi ve böylece donmuş beyinlerin soğukluğu sabit tutulmuş oldu. Stereotaksik atlas yardımıyla hayvanlarda ise PVN alanından 25 µm kalınlığında koronal kesitler alındı ve bu kesitler kryoprotektif solüsyon içerisine konularak immünohistokimya analizlerinde kullanıldı. Bu işlemlerde sıçan beyin atlasından (88) yararlanılarak, PVN alanına ulaşmak için optik kiazma ve 3. ventrikül alanı esas alınarak yapılan seri dilimlemelerden sonra 3. ventrikülün belirmesi ve sonlanmasını içeren (bregma -1.80,-1.88 ve -2.12 mm) bölümlerden seri kesitler alındı. 3. ventrikülün düz çizgiden ters T şeklinde dönüşmeye başladığı alanlardan 25 µm'lik kesitler elde edildi.

3.6. Floresan İmmünohistokimya

CRH floresan immünohistokimya deneyleri, beyin bölgelerinin 25 µm kalınlığında serbest yüzen kesitlerinde gerçekleştirildi (13). Kesitlerin oda sıcaklığında 0.05 M fosfat tamponlu salinde (PBS) yıkanmasının (pH 7.3, 8x15 dakika), ardından %3 hidrojen peroksitte 30 dakika inkübe edildi ve tekrar 0.05 M PBS'de yıkandı (6x5 dakika). Kesitler +4°C'de %5 normal at serumu, %0.1 sığır serum albümini (BSA) ve %0.05 Triton X-100 içeren PBS çözeltisinde, gece boyunca, çalkalayıcı üzerinde inkübe edilerek özgün olmayan bağlanmalar elimine edildi. Bu işlemten sonra, kesitler PBS-eşek serum çözeltisinde hazırlanan primer antikor dilüsyonları (Anti-CRF antikor, ab272391, Abcam, UK) ile +4°C'de 48 saat çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi ve daha sonra oda sıcaklığında 0.05 M PBS'de yıkandı (4x5 dakika). İmmünoflorasanı tespit etmek için kesitler oda sıcaklığında, karanlıkta 1 saat PBS-at serumu çözeltisinde sekonder antikor dilüsyonları (AlexaFluorVR488, ab150077, Abcam, UK) ile inkübe edildi ve tekrar oda sıcaklığında 0.05 M PBS'de yıkandıktan (4x5 dakika) sonra kesitler lam üzerine yerleştirildi. Kesitler lam üzerinde karanlıkta kuruduktan sonra GEL/MOUNT akışkan koruyucu madde ile kaplandıktan sonra lamelle kapatıldı ve analizler yapılana kadar +4°C'de saklandı. Hipotalamusta CRH immunfloresan ekspresyonu için kesitlerden 20'lik objektifte çekilen resimler ImageJ programında açıldı. Dijital görüntülerde ImageJ programı ile yoğunluk ölçümü yapıldı. Programda açılan ilk resimde, bir alan içeren içi boş bir kutu oluşturuldu.

Daha sonra Analiz, Tools, Region of Interest (ROI) manager üzerinden, oluşturulan kutu seçilerek ROI manager bölümüne eklendi. Kutu isimlendirildi (ölçüm kutusu) ve kutunun ebatları ayarlandı. Böylece bir büyüklük ve alan standardizasyonu yapıldı. Analiz ve ölçümleri ayarla (set measure) bölümünden ortalama yoğunluk değeri (mean intensity value) seçilerek kutunun içerdiği alandaki yoğunluk ortalamasının hesaplanabilmesi mümkün hale getirildi. Daha sonra analiz ve ölçüm (measure) bölümünden ölçümler yapıldı. Kutu dijital resim üzerinden 5 farklı alanda taşınarak elde edilen yoğunlukların ortalaması alındı. Her resim için aynı ebatta ölçüm kutusu kullanılarak işlemler tekrarlandı.

3.7. İstatistiksel Analizler

Bütün sonuçlar ortalama±standart hata olarak sunuldu. Verilerin istatistiksel değerlendirmesi normal dağılım gösterdiği ve varyanslar homojen olduğundan one-way ANOVA testi ile farklılıklar ise Tukey testi kullanılarak değerlendirildi. $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Bu testler IBM SPSS Statistics 23 (KTÜ, Trabzon Lisanslı) programı kullanılarak yapıldı.

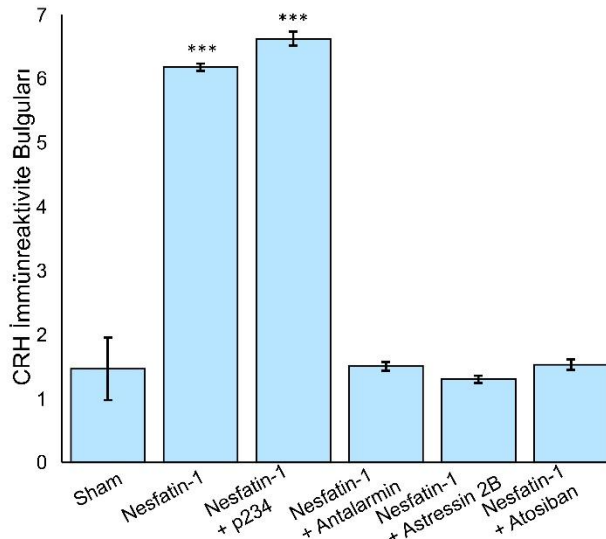
4. BULGULAR

Çalışmamızdaki grupların PVN’de CRH immünreaktivite bulguları Tablo 1 ile Şekil 5 ve 6’da sunuldu. Kontrol grubuna göre CRH immünreaktivitesi Nesfatin-1 ve Nesfatin-1+p234 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti ($p<0.001$). Diğer gruplarda istatistiksel bir fark görülmedi ($p>0.05$).

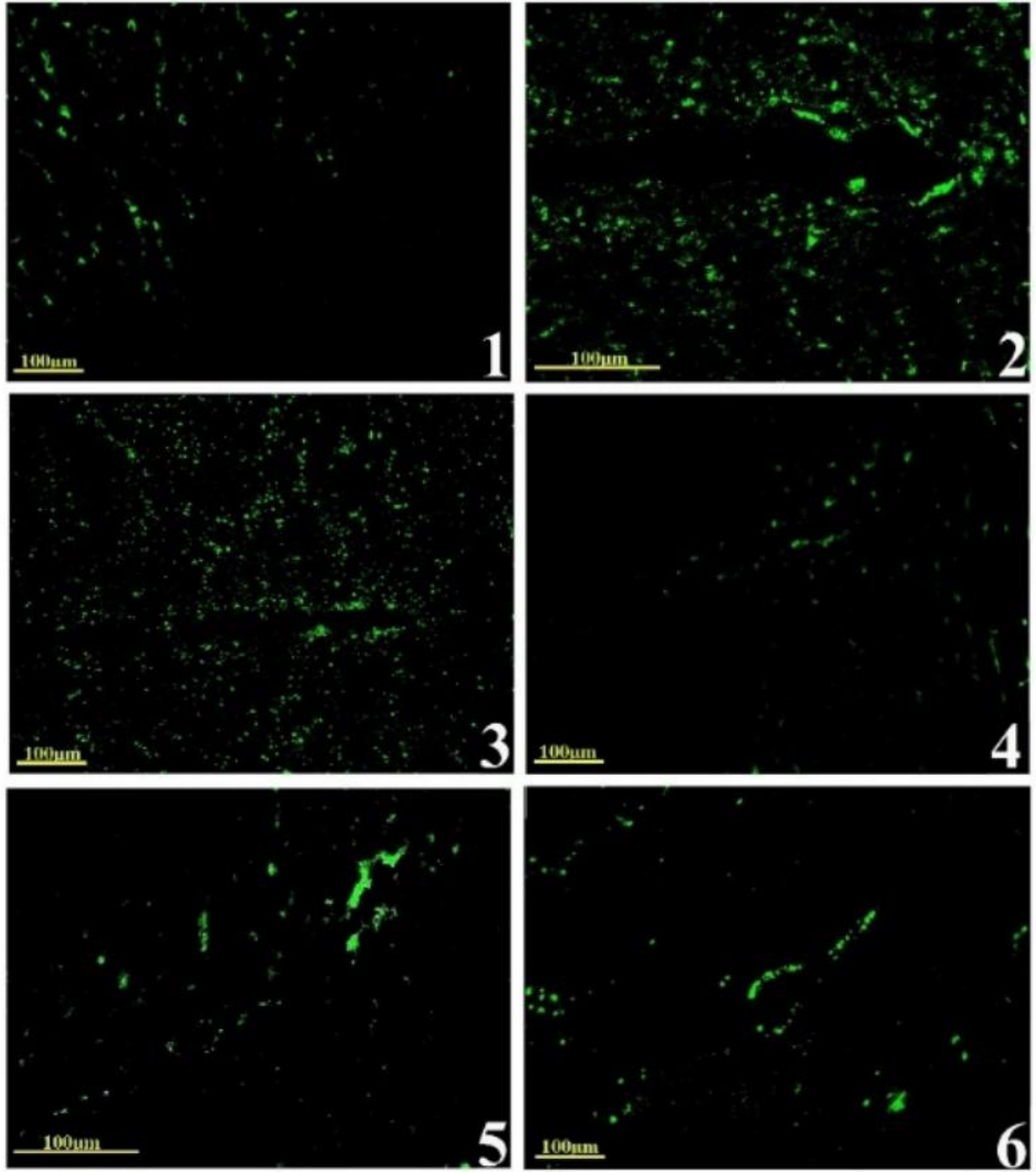
Tablo 1. PVN’de CRH immünreaktivite bulguları

Gruplar	Ortalama $\pm$ Standart Hata
Grup 1: Sham	1.46 $\pm$ 0.49
Grup 2: Nesfatin-1	6.18 $\pm$ 0.06***
Grup 3: Nesfatin-1+ p234	6.62 $\pm$ 0.1***
Grup 4: Nesfatin-1+ Antalarmin	1.5 $\pm$ 0.07
Grup 5: Nesfatin-1+ Astressin2B	1.3 $\pm$ 0.06
Grup 6: Nesfatin-1+ Atosiban	1.53 $\pm$ 0.08

***: $p<0.001$, kontrol grubuna kıyasla



Şekil 5. PVN’de CRH immünreaktivite bulguları (***: $p<0.001$ kontrol grubuna kıyasla).



Şekil 6. PVN’de CRH immunreaktivite görüntüleri,

(1) Sham Grubu,

(3) Nesfatin-1+p234 Grubu,

(5) Nesfatin-1+Astressin2B Grubu,

(2) Nesfatin-1 Grubu,

(4) Nesfatin-1+Antalarmin Grubu,

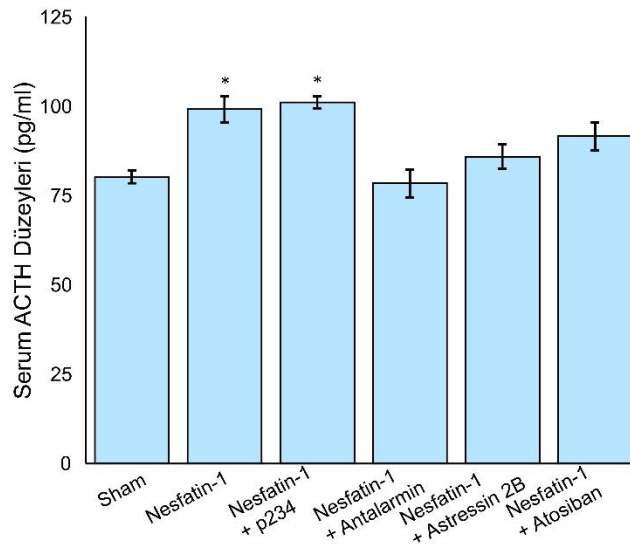
(6) Nesfatin-1+Atosiban Grubu.

Çalışmamızdaki grupların serum ACTH sonuçları Tablo 2 ve Şekil 7’da sunulmuştur. Serum ACTH seviyeleri Nesfatin-1 ve Nesfatin-1+p234 gruplarında kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti ($p<0.05$). Nesfatin-1+Antalarmin grubu serum ACTH konsantrasyonu kontrol grubuyla aynı seviyedeydi. Nesfatin-1+Astressin2B ve Nesfatin-1+Atosiban gruplarının ACTH düzeyleri kontrole göre daha yüksek olmasına karşın istatistiksel bir fark görülmedi.

Tablo 2. Serum ACTH düzeyleri (pg/mL)

Gruplar	Ortalama $\pm$ Standart Hata
Grup 1: Sham	80.09 $\pm$ 1.84
Grup 2: Nesfatin-1	99.02 $\pm$ 3.69*
Grup 3: Nesfatin-1+ p234	100.91 $\pm$ 1.62*
Grup 4: Nesfatin-1+ Antalarmin	78.25 $\pm$ 3.89
Grup 5: Nesfatin-1+ Astressin2B	85.70 $\pm$ 3.45
Grup 6: Nesfatin-1+ Atosiban	91.49 $\pm$ 3.89

*: $p<0.05$, kontrol grubuna kıyasla



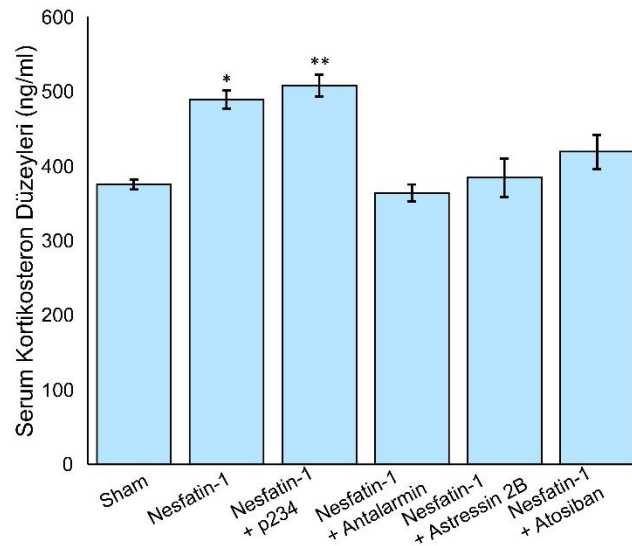
Şekil 7. Serum ACTH düzeyleri (pg/mL) (*: $p<0.05$, kontrol grubuna kıyasla).

Çalışmamızdaki grupların kortikosteron düzeyleri Tablo 3 ve Şekil 8’da sunulmuştur. Serum kortikosteron düzeyleri hem Nesfatin-1 hem de Nesfatin-1+p234 grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yükseldi (sırasıyla $p<0.05$ ve $p<0.01$). Nesfatin-1+Antalarmin grubu kortikosteron düzeyi kontrol grubuyla aynı seviyeydi. Nesfatin-1+Astressin2B ve Nesfatin-1+Atosiban gruplarında, serum kortikosteron düzeyleri kontrol grubuna nazaran yüksek olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmedi.

Tablo 3. Serum kortikosteron düzeyleri (ng/mL)

Gruplar	Ortalama $\pm$ Standart Hata
Grup 1: Sham	374.89 $\pm$ 6.75
Grup 2: Nesfatin-1	489.06 $\pm$ 11.83*
Grup 3: Nesfatin-1+ p234	507.04 $\pm$ 15.04**
Grup 4: Nesfatin-1+ Antalarmin	363.60 $\pm$ 10.86
Grup 5: Nesfatin-1+ Astressin2B	383.98 $\pm$ 26.31
Grup 6: Nesfatin-1+ Atosiban	418.38 $\pm$ 23.52

*: $p<0.05$, **: $p<0.01$ kontrol grubuna kıyasla

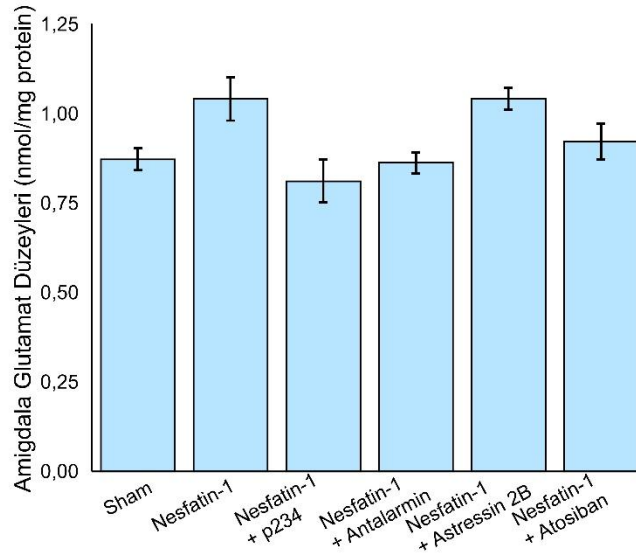


Şekil 8. Serum kortikosteron düzeyleri (*: $p<0.05$, **: $p<0.01$ kontrol grubuna kıyasla).

Çalışmamızdaki grupların amigdala glutamat sonuçları Tablo 4 ve Şekil 9'de sunulmuştur. Amigdala glutamat düzeyleri bakımından grupların hiçbirinde kontrole kıyasla anlamlı bir farklılık mevcut değildi. Bununla birlikte, Nesfatin-1 ve Nesfatin-1+Astressin2B gruplarının amigdala glutamat seviyeleri kontrol grubuna göre daha yüksek olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildi.

Tablo 4. Amigdala glutamat düzeyleri (nmol/mg protein)

Gruplar	Ortalama $\pm$ Standart Hata
Grup 1: Sham	0.87 $\pm$ 0.03
Grup 2: Nesfatin-1	1.04 $\pm$ 0.06
Grup 3: Nesfatin-1+ p234	0.81 $\pm$ 0.06
Grup 4: Nesfatin-1+ Antalarmin	0.86 $\pm$ 0.03
Grup 5: Nesfatin-1+ Astressin2B	1.04 $\pm$ 0.03
Grup 6: Nesfatin-1+ Atosiban	0.92 $\pm$ 0.05



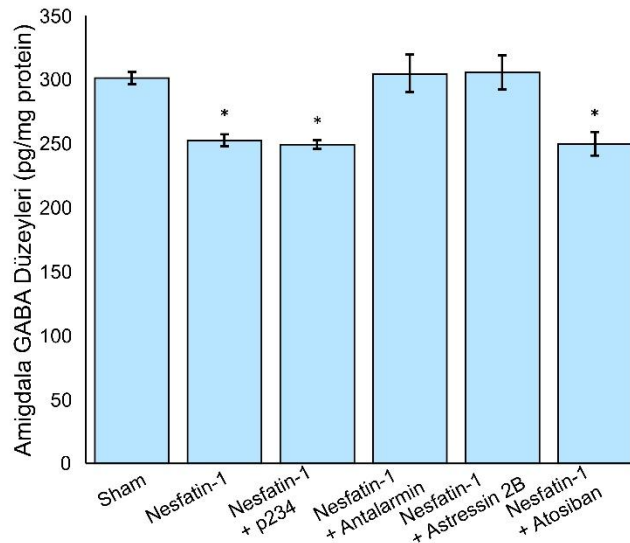
Şekil 9. Amigdala glutamat düzeyleri

Çalışmamızdaki grupların amigdala GABA sonuçları Tablo 5 ve Şekil 10'de sunulmuştur. Nesfatin-1, Nesfatin-1+p234 ve Nesfatin-1+Atosiban gruplarında, amigdala GABA düzeyleri kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktü ($p<0.05$). Diğer gruplarda GABA düzeyleri kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı bir fark belirlenmedi.

Tablo 5. Amigdala GABA düzeyleri (pg/mg protein)

Gruplar	Ortalama $\pm$ Standart Hata
Grup 1: Sham	301.08 $\pm$ 4.42
Grup 2: Nesfatin-1	252.36 $\pm$ 4.68*
Grup 3: Nesfatin-1+ p234	249.16 $\pm$ 3.16*
Grup 4: Nesfatin-1+ Antalarmin	304.54 $\pm$ 14.84
Grup 5: Nesfatin-1+ Astressin2B	305.73 $\pm$ 13.49
Grup 6: Nesfatin-1+ Atosiban	249.58 $\pm$ 9.17*

*: $p<0.05$ kontrol grubuna kıyasla



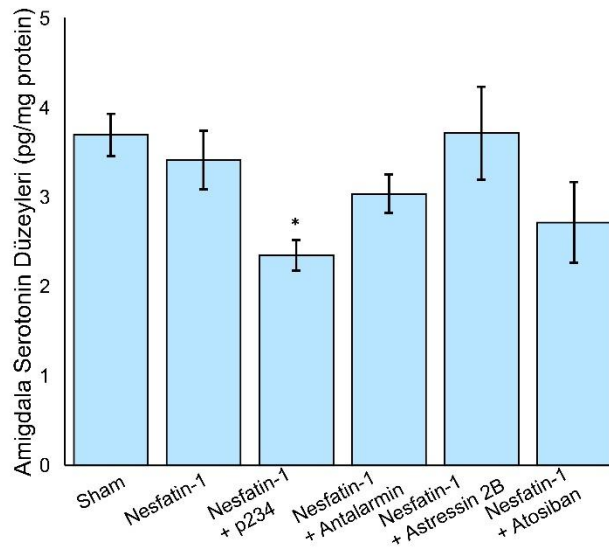
Şekil 10. Amigdala GABA düzeyleri (*: $p<0.05$ kontrol grubuna kıyasla).

Çalışmamızdaki grupların amigdala serotonin sonuçları Tablo 6 ve Şekil 11’de sunuldu. Kontrol grubuna göre Nesfatin-1+p234 grubunda amigdala serotonin düzeyi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düştü ($p<0.05$). Diğer gruplarda amigdala serotonin düzeylerinde anlamlı bir değişiklik belirlenmedi.

Tablo 6. Amigdala serotonin düzeyleri (pg/mg protein)

Gruplar	Ortalama $\pm$ Standart Hata
Grup 1: Sham	3.69 $\pm$ 0.24
Grup 2: Nesfatin-1	3.41 $\pm$ 0.33
Grup 3: Nesfatin-1+ p234	2.34 $\pm$ 0.17*
Grup 4: Nesfatin-1+ Antalarmin	3.03 $\pm$ 0.22
Grup 5: Nesfatin-1+ Astressin2B	3.71 $\pm$ 0.52
Grup 6: Nesfatin-1+ Atosiban	2.71 $\pm$ 0.45

*: $p<0.05$ kontrol grubuna kıyasla



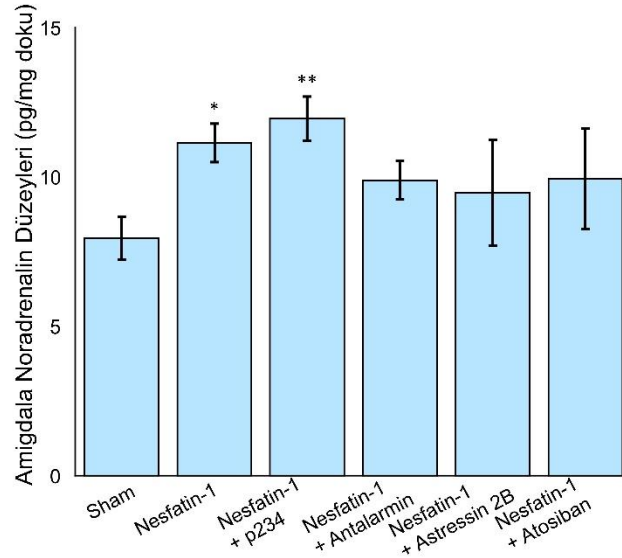
Şekil 11. Amigdala serotonin düzeyleri (*: $p<0.05$ kontrol grubuna kıyasla).

Çalışmamızdaki grupların amigdala noradrenalin sonuçları Tablo 7 ve Şekil 12’de sunuldu. Kontrol grubuna göre Nesfatin-1 ve Nesfatin-1+p234 grubunda amigdala noradrenalin düzeyi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti (sırasıyla $p<0.05$ ve $p<0.01$). Diğer gruplarda amigdala noradrenalin düzeylerinde anlamlı bir değişiklik belirlenmedi.

Tablo 7. Amigdala noradrenalin düzeyleri (pg/mg doku)

Gruplar	Ortalama $\pm$ Standart Hata
Grup 1: Sham	7.95 $\pm$ 0.72
Grup 2: Nesfatin-1	11.14 $\pm$ 0.64*
Grup 3: Nesfatin-1+ p234	11.95 $\pm$ 0.74**
Grup 4: Nesfatin-1+ Antalarmin	9.89 $\pm$ 0.65
Grup 5: Nesfatin-1+ Astressin2B	9.47 $\pm$ 1.78
Grup 6: Nesfatin-1+ Atosiban	9.94 $\pm$ 1.67

*: $p<0.05$, **: $p<0.01$ kontrol grubuna kıyasla



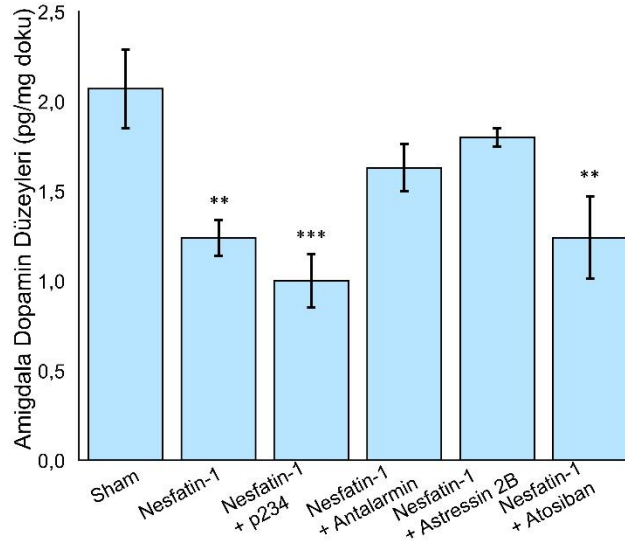
Şekil 12. Amigdala noradrenalin düzeyleri (*: $p<0.05$, **: $p<0.01$ kontrol grubuna kıyasla).

Çalışmamızdaki grupların amigdala dopamin sonuçları Tablo 8 ve Şekil 13’de sunuldu. Kontrol grubuna göre Nesfatin-1, Nesfatin-1+p234 ve Nesfatin-1+Atosiban grubunda amigdala dopamin düzeyi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düştü (sırasıyla $p<0.01$, $p<0.001$ ve $p<0.01$). Diğer gruplarda amigdala dopamin düzeylerinde anlamlı bir değişiklik belirlenmedi.

Tablo 8. Amigdala dopamin düzeyleri (pg/mg doku)

Gruplar	Ortalama $\pm$ Standart Hata
Grup 1: Sham	2.07 $\pm$ 0.22
Grup 2: Nesfatin-1	1.24 $\pm$ 0.10**
Grup 3: Nesfatin-1+ p234	1.00 $\pm$ 0.15***
Grup 4: Nesfatin-1+ Antalarmin	1.63 $\pm$ 0.13
Grup 5: Nesfatin-1+ Astressin2B	1.80 $\pm$ 0.05
Grup 6: Nesfatin-1+ Atosiban	1.24 $\pm$ 0.23**

** $p<0.01$, *** $p<0.001$ kontrol grubuna kıyasla

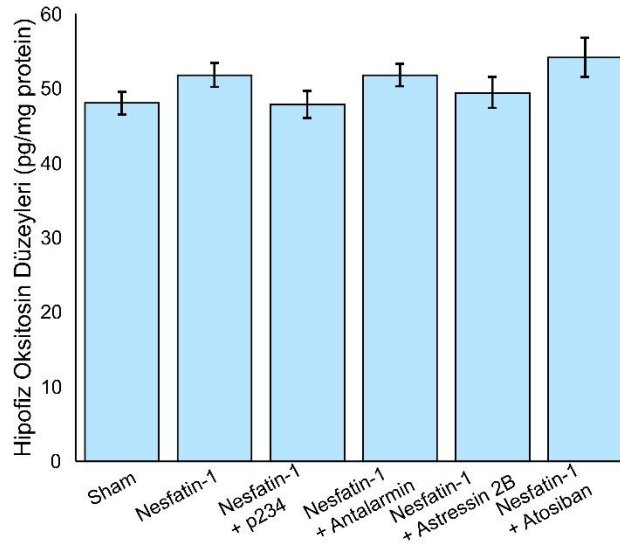


Şekil 13. Amigdala dopamin düzeyleri (** $p<0.01$, *** $p<0.001$ kontrol grubuna kıyasla).

Çalışmamızdaki grupların hipofiz oksitosin sonuçları Tablo 9 ve Şekil 14’de sunulmuştur. Hipofiz oksitosin düzeyleri bakımından grupların hiçbirinde kontrole kıyasla anlamlı bir farklılık mevcut değildi.

Tablo 9. Hipofiz oksitosin düzeyleri (pg/mg protein)

Gruplar	Ortalama $\pm$ Standart Hata
Grup 1: Sham	47.96 $\pm$ 1.56
Grup 2: Nesfatin-1	51.75 $\pm$ 1.61
Grup 3: Nesfatin-1+ p234	47.76 $\pm$ 1.79
Grup 4: Nesfatin-1+ Antalarmin	51.73 $\pm$ 1.43
Grup 5: Nesfatin-1+ Astressin2B	49.42 $\pm$ 2.10
Grup 6: Nesfatin-1+ Atosiban	54.12 $\pm$ 2.60



Şekil 14. Hipofiz oksitosin düzeyleri.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

5.1. HHA Aks Aktivasyonuna Nesfatin-1'in Etkileri

HHA aksı, stres arkı olarak da tanımlanır ve hem akut hem de kronik stres durumlarında aktif hale gelir. Bunun yanında, HHA aksı, stres dışında, hipotalamik suprakiazmatik nükleusun düzenlediği bir sirkadiyen ritme de sahiptir (28). Bu aksın aktivasyonu, öncelikle hipotalamusun PVN alanından CRH'nin hipotalamo-hipofizer portal dolaşıma salgılanmasıyla başlamaktadır. PVN'den CRH salınımına AVP hormonu da eşlik eder. CRH salınımının bir sonucu olarak, ön hipofizden ACTH genel dolaşıma salınır ve adrenal bezin korteksinden kortizol/kortikosteron gibi glukokortikoidlerin salgılanmasına yol açar (96, 97) (Şekil 1). Vücuttaki glukokortikoid düzeyi negatif geri bildirim mekanizması ile kontrol edilmektedir. Bu düzenleme sırasında, hipotalamus ve hipofizdeki hormonal etkilerle birlikte, hipokampus ve amigdala gibi limbik sistem yapılarında da nöronal aktivite değişiklikleri meydana gelir (30, 31). HHA aksın aktivasyonu sonucu adrenal medulladan salgılanan katekolaminlerden, özellikle noradrenalin ve adrenalin, stresle ilişkili otonomik etkilerden sorumludur. Amigdalanın CeA alanındaki CRH içeren nöronlar, doğrudan ve dolaylı olarak lokus seruleus ve rafe nükleusları ile bağlantılıdır (36). Ayrıca amigdala, HHA aksının aktivitesi ile prefrontal korteksle de etkileşim halindedir. Bu etkileşim kapsamında, prefrontal korteks; GABA aracılığıyla, amigdala ve hipotalamustaki CRH aktivitesini etkileyerek HHA aksın aktivasyonu modüle edebilir (47).

Çalışmamızda HHA aks aktivasyonu ile ilişkili olarak hipotalamusta CRH, serumda ise ACTH ve kortikosteron düzeylerinin Nesfatin-1 grubu ve Nesfatin-1+p234 grubunda yüksek olduğu tespit edilmiştir (Tablo 1, 2, 3 ve Şekil 5, 6, 7, 8). Nesfatin-1'in ICV olarak enjeksiyonu ile hipotalamik CRH immünreaktivitesinin artış, serum ACTH ve kortikosteron düzeylerinde yükselme olduğu rapor edilmiştir (11). Ayrıca, özellikle akut stres durumunda hipotalamik NUCB2/Nesfatin-1 mRNA'sının arttığı, bu artışa hipotalamik CRH ekspresyonunun ve serum kortikosteron düzeylerinin de eşlik ettiği belirtilmiştir (98). Bu sonuçlar, Nesfatin-1 ile ilgili elde ettiğimiz verileri destekler niteliktedir. Dolayısıyla, Tablo 1, 2 ve 3'teki bu sonuçlar Nesfatin-1 ile CRH, serum ACTH ve kortikosteron düzeyleri arasında pozitif bir korelasyon olduğu ve bu peptidin HHA aksı aktive ettiği söylenebilir.

CRH, etkilerini öncelikle CRHR1 aracılığıyla göstermektedir (39). Her iki CRH reseptörü de limbik sistemde yer alsa da limbik sistemde CRHR1 reseptörlerinin yoğunluğu

ve dağılım alanı daha fazladır. CRHR1, ön hipofiz bezinin yanı sıra PVN, BLA, hipokampus ve prefrontal korteks gibi strese nöroendokrin ve davranışsal yanıtları düzenleyen bölgelerde daha yoğun şekilde ekspresse edilmektedir. CRHR2 ise hipotalamusun ventromedial nükleusu, MeA ve beyin sapındaki DRN gibi alanlarda ekspresse edilmekte olup CRH'nin stres yanıtındaki rolüne tamamlayıcı bir şekilde aracılık etmektedir (99). CRHR1 aktivasyonu genellikle stres yanıtının başlatılmasını sağlarken, CRHR2 aktivasyonu bu yanıtın modülasyonundan sorumlu olarak değerlendirilmektedir (41). Çalışmamızda, hem Nesfatin-1+Antalarmin hem de Nesfatin-1+Astressin2B gruplarında HHA aks aktivasyonu ile ilişkili parametrelerde kontrol grubuna göre önemli bir değişiklik tespit edilmemiştir (Tablo 1, 2 ve 3). Nesfatin-1'e bağlı bu etkilerin özellikle CRHR1 reseptörü aracılığıyla meydana geldiği söylenebilir.

Glukokortikoidlere bağlı negatif geri bildirim mekanizması, hipotalamik PVN ve hipofiz ile birlikte limbik sistem ve beyin sapı gibi yapıların da dahil olduğu karmaşık bir süreçtir. Bu süreçte, hipokampus öne çıkan bir yapı olarak dikkat çeker, çünkü PVN'deki CRH nöronları üzerinde genellikle inhibitör bir etki gösterir (45). Bu nedenle glukokortikoidlere bağlı negatif geri bildirimde hipokampal inhibitör sinyallerin güçlenmesinin önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (46). PVN'den CRH salgılanması, çoklu nörotransmitter etkileşimleri ile modüle edilmektedir (47). Burada NTS ve ventrolateral oblongata bölümünün medullar nükleuslarındaki noradrenerjik impuls, PVN'den CRH sentezi ve salınmasını uyarır (100). Glukokortikoidlerin CeA nükleusuna pozitif uyarıcı etkiyle CRH sentezi ve sekresyonunu artırması söz konusudur. Strese verilen otonomik yanıtta CRH sinyallerinin başlatıcı etkisinin, amigdalanın CeA nükleusundan lokus seruleusa uzanan bir süreçle gerçekleştiği belirtilmektedir. Lokus seruleusun aktivasyonu ve noradrenalin/adrenalin sekresyonu, adrenal medullayı aktive ederek sempatik sinir sistemini devreye sokar (47).

CRH'nin aktivasyon ve inhibisyon mekanizmalarında GABA'nın rolü oldukça önemlidir (101). Prefrontal kortekste GABA nöronlarının hem amigdala ve hipotalamus ile bağlantılarında hem de direkt olarak PVN'deki CRH aktivitesini baskılamasında, GABA'nın aracı olduğu düşünülmektedir (47). Hipokampusun stres yanıtını baskılamasında, PVN, amigdala ve lokus seruleus ile doğrudan ve dolaylı bağlantıları büyük önem taşır. Bu çok yönlü bağlantılarda, GABA'nın belirleyici rolü söz konusudur (47). Stres yanıtı, rafe nükleusundaki serotonin sinyallerinin PVN, hipokampus ve amigdalaya ulaşması

ile artış yönünde modüle edilmektedir. Bu süreçte, serotonin aracılığıyla artan stres yanıtında, PVN, hipokampus ve amigdala GABA sinyalleşmesinin etkili olduğu belirtilmektedir (47).

Çalışmamızda amigdala GABA düzeylerinin Nesfatin-1, Nesfatin-1+p234, Nesfatin-1+Atosiban gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu belirlendi (Tablo 5 ve Şekil 10). Bu durum, Nesfatin-1'e bağlı HHA aks aktivasyonunda amigdala GABA düzeyinde azalmaya bağlı inhibitör sinyallerin azalmasının etkisi olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca, bu etkileşimde kisspeptin sinyalleşmesinin yanı sıra oksitosin reseptörünün de rol oynadığı söylenebilir. Nesfatin-1+p234 grubunda amigdala serotonin düzeyi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu tespit edilmiştir (Tablo 6 ve Şekil 11). HHA aks aktivasyonu göz önüne alındığında, Nesfatin-1'in serotonin aktivitesinin düzenlenmesine katıldığı ve kisspeptin sinyalleşmesinin engellendiği durumlarda amigdala serotonin düzeyini azaltıcı bir etki gösterdiği anlaşılmaktadır.

Strese yanıt olarak CRH'nin harekete geçirdiği HHA aks aktivasyonunun bir sonucu olarak, OSS devreye girmektedir. Bu mekanizma sayesinde, periferik fizyolojik düzenlemelerle enerji depolarının harekete geçirilmesi, kan şekeri ve kalp hızının artışı, sindirim fonksiyonlarının baskılanması gibi değişiklikler gerçekleşir, bu da vücudun "savaş ya da kaç" yanıtını ortaya koyar (43, 102). Deneysel olarak, CRH enjeksiyonu periferik katekolamin salgısında artışa, kalp hızı ve kan basıncında yükselmeye, iştah azalmasına, uyku bozukluğuna, cinsel davranışta azalmaya ve yeni çevreye uyum becerisinde düşüşe yol açabilen otonomik ve davranışsal değişikliklerle sonuçlanabilir (58, 59). Çalışmamızda Nesfatin-1'in CRH üzerine doğrudan etkilerinin yanı sıra, kisspeptin sinyalleşmesinin ortadan kaldırıldığı durumlarda, Nesfatin-1'in HHA aks aktivasyonunu artırdığı belirlenmiştir (Tablo 1, 2 ve 3).

5.2. Amigdala Nörotransmitter ve Katekolamin Düzeylerine Nesfatin-1'in Etkileri

Beynin birincil uyarıcı nörotransmitteri olan glutamat, stres durumunda ya da kortizol/kortikosteron uygulanmasıyla artış göstermektedir. Glutamat artışı, stresin yanı sıra korku koşullanması, öğrenme ve hafıza gibi işlevlerle de ilişkilendirilmektedir (104). Amigdalanın BLA alanında ve medial prefrontal kortekste, glutamat reseptörlerinden NMDA'nın farmakolojik olarak bloke edilmesi, uyarılara şartlanma ve korku duygusunu azaltmaktadır (105). Dolayısıyla, glutamat aktivitesindeki ve NMDA reseptör

sinyalleşmesinde artışın korku, fobi ve anksiyete gibi durumlarda rol oynadığı düşünülmektedir (106, 107).

Projemizde, amigdala glutamat düzeyleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı belirlendi (Tablo 4 ve Şekil 9). Bununla birlikte Nesfatin-1 ve Nesfatin-1+Astressin2B gruplarının glutamat seviyeleri daha yüksek değerlerde bulunmasına rağmen, bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı görüldü.

Nesfatin-1'in tek başına uygulandığı gruplarda ya da Nesfatin-1+Astressin2B ile kombine şeklinde uygulandığı gruplarda, amigdala glutamat düzeyinin artış eğiliminde olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 9). Hipotalamustaki PVN, supraoptik nükleus ve arkuat nükleusdaki Nesfatin-1 nöronlarının glutamat reseptörleri ekspresse ettiği ve glutamat uyarımı ile Nesfatin-1 nöronlarının aktif hale geldiği daha önce rapor edilmiştir (108). Başka bir çalışmada da Nesfatin-1 nöronlarının periferik metabolik sinyallerle etkileşiminde glutamatın aracı faktörlerden biri olduğu ve bu etkileşimin glutamat reseptör antagonistleri ile ortadan kalktığı ifade edilmiştir (109). Elde ettiğimiz sonuçlar, amigdala glutamat aktivitesinin Nesfatin-1 ile ilişkili olabileceğine işaret etmektedir. Bununla birlikte çalışmamızda tek doz uygulandığından dolayı glutamat artışını net bir şekilde ortaya koymak mümkün olmamıştır.

GABA'nın stres fizyolojisindeki regülatör rolü, inhibitör etkisiyle bağlantılı olarak genellikle anksiyolitik etki şeklinde ortaya çıkmaktadır (45, 104). GABAerjik sinyalleşme, ayrıca korkuya alışma veya korku hafızasının zayıflatılmasında önemli bir rol oynamaktadır (104). BLA, medial prefrontal korteks ve hipokampusta GABAerjik sinyalleşmenin bloklanması, korkuya alışmayı yani strese adaptasyonu azaltıcı bir etkiye yol açmaktadır (105). Çalışmamızda, Nesfatin-1, Nesfatin-1+p234 ve Nesfatin-1+Atosiban gruplarında amigdala GABA düzeylerinin anlamlı şekilde daha düşük olduğu belirlendi (Tablo 5 ve Şekil 10).

MTA'daki dopamin nöronlarının yanı sıra GABA nöronlarının da NUCB2/Nesfatin-1 ekspresse ettiği ve ICV Nesfatin-1 enjeksiyonunun dopamin nöronlarında hiperpolarizasyon oluşturmaya karşın, GABA nöronlarında bu etkinin görülmediği öne sürülmüştür (110). Ayrıca, substantia nigradaki dopaminerjik nöronlarında da Nesfatin-1'in hiperpolarize edici etkisinin olduğu, bu etkinin iyonotropik glutamat ve GABA antagonistleriyle değişmediği rapor edilmiştir (111). Santral Nesfatin-1 enjeksiyonu sonrası gıda alımındaki azalmanın, gastrik motilite düşüşüne bağlı olarak mide gerilmesinin

(distansiyon) artmasıyla ilişkili olduğu ve bunun sonucunda NTS'deki NUCB2/Nesfatin-1 eksprese eden nöronların aktive olduğu belirlenmiştir (112). Aynı çalışmada, söz konusu bu NUCB2/Nesfatin-1 ekspresse nöronların bir bölümünün GABAerjik aktiviteye sahip olduğu da rapor edilmiştir (112).

Yavru sıçanlarda, anneden ayırma ve gastrik irrigasyonla oluşturulan anksiyete ile ilişkili gastrik hipersensitivite modelinde hipokampusta Nesfatin-1 artışı olmasına karşın serotonin ve GABA düzeylerinde azalma tespit edilmiştir (113). Bu sonuçlar Nesfatin-1 artışının GABA aktivitesini azaltıcı bir etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Deneylerimizde ICV Nesfatin-1 enjeksiyonlarının amigdala GABA düzeyini azalttığı belirlenmiştir. Ayrıca, Nesfatin-1+p234 ve Nesfatin-1+Atosiban gruplarında da amigdala GABA düzeyindeki azalmanın geçerli olduğu görülmüştür (Tablo 5 ve Şekil 10). Dolayısıyla Nesfatin-1'e bağlı amigdala GABA düzeyindeki artışın oksitosin ve kisspeptin reseptör aktivitesi aracılığıyla gerçekleştiğini düşündürmektedir. Nitekim oksitosinin CeA'da GABA salınmasını inhibe edici bir etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (114). Mandarin tarla farelerinde yapılan bir çalışmada, oksitosinin CeA'daki GABA_A reseptörü aracılığıyla sosyal ilişkileri güçlendirici ve anksiyeteyi azaltıcı etkiler gösterdiği ifade edilmiştir (115). Aynı zamanda oksitosin ile reseptör antagonistinin birlikte uygulandığında ise oksitosine bağlı oluşan etkilerin görülmeyeceği belirtilmiştir. Bir başka çalışmada ise, uzun süreli izolasyona bağlı artış gösteren depresyon ve anksiyete ile ilişkili davranışların CeA'daki oksitosinle indüklenen GABAerjik transmisyonun azalmasıyla ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (116). Bütün bu bulgular, oksitosinin amigdalada GABA aktivitesini artırdığına işaret etmektedir.

Sonuç olarak çalışmamızda Nesfatin-1'e bağlı olarak GABA düzeyinde Nesfatin-1+Antalarmin ve Nesfatin-1+Astressin2B gruplarında herhangi bir azalma olmamasına karşın Nesfatin-1+Atosiban grubunda düşük olması, Nesfatin-1'in GABA üzerindeki etkisinin oksitosinle zıt yönde olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca, Nesfatin-1+p234 grubunda amigdala GABA düzeyinin daha düşük olması, kisspeptin reseptör sinyalleşmesinin de Nesfatin-1'e bağlı etkide rol oynayabileceğine işaret etmektedir.

Serotonin, genel olarak beyin sapındaki rafe nükleusundan beyne projekte olmaktadır. Dorsal rafe nükleusundan amigdala ve hipokampusa projekte olan serotoninin 5-HT₂ reseptörleri ile etkileşime girmesi durumunda anksiyojenik bir etki profili

oluştururken, median rafe nükleusundan projekte olan serotoninin 5-HT1a reseptörünü aktive etmesi sonucunda anksiyolitik bir etki profili ortaya çıkmaktadır (104). Kronik stresle ilişkili olarak 5-HT2 reseptörlerinde upregülasyon ve 5-HT1a reseptöründe ise down regülasyon meydana geldiği bilinmektedir. Ayrıca, 5-HT1a nakavt hayvanlarda stres yanıtında artış söz konusudur (117)

Amigdalanın CeA bölgesinde CRH içeren nöronlar doğrudan ve dolaylı olarak hem rafe nükleusları hem de lokus seruleus ile bağlantılıdır. Serotonerjik ve noradrenerjik nöronlar, birbirleriyle ve CRH içeren nöronlarla aksonal bağlantılar aracılığıyla etkileşim içindedir. Bu tür bağlantılar sayesinde, CeA'da meydana gelen CRH artışı, aynı zamanda rafe nükleusları ve lokus seruleus bölgelerinde de artışa yol açabilmektedir (36, 118, 119).

Genetik olarak rodopsin kanal modifikasyonu ile serotonin hedefli farelerin BLA kesitlerinde yapılan çalışmada (120), serotonin nöron terminallerinin optik uyarımı sağlanmış ve farmakolojik uygulamalarla glutamat ile serotonin aktivitesi değerlendirilmiştir. Bahsi geçen çalışmada, serotonin nöron terminallerinin düşük frekanslı optik uyarımının BLA'daki internöronlarda kısa süreli ve hızlı bir eksitasyona yol açtığı, ancak bu eksitasyonun daha yüksek frekanslı optik uyarımlarda zayıfladığı tespit edilmiştir. Düşük frekanslı uyarımın glutamat aracılı olduğu ve serotoninin doğrudan bir rol oynamadığı belirlenmiştir. Buna karşın, yüksek frekanslı optik uyarımın yol açtığı yavaş eksitasyon ile yavaş inhibisyonun, 5-HT2a ve 5-HT1a reseptör antagonistleriyle modüle edilerek serotonin aracılı olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca, serotonin terminallerinin optik uyarımının BLA nöronlarında glutamat salınımında artışa yol açmadığı, fakat bu hücrelerin direkt olarak 5-HT1a aktivasyonu ve dolaylı olarak da GABA salınımı ile inhibe edildiği tespit edilmiştir. Bu bulgular, amigdala aktivitesinin serotonerjik regülasyonunda 5-HT2a ve 5-HT1a reseptörlerinin önemli roller oynadığını ve uyarım tipine bağlı olarak amigdala serotonerjik aktivitesinin oldukça karmaşık bir düzenlemeye tabi olduğunu göstermesi bakımından önemlidir.

Anestezi uygulanmış sıçanlarda yapılan beyin mikrodializ çalışmaları, CeA bölgesindeki serotonin salınımının somatik afferent uyarımlarla değişebildiğini göstermiştir. Bu bulgu, psikolojik stresörlerin yanı sıra fiziksel stres unsurlarının da amigdala üzerindeki serotonin salınımını etkilediğini ortaya koyması açısından önemlidir (121). Anneden ayrılma stresine maruz bırakılan sıçanlarda, plazma Nesfatin-1 ve kortikosteron düzeylerinin arttığı, amigdalada NUCB2/Nesfatin-1 mRNA ile protein ekspresyon düzeylerinin

yükseldiği tespit edilmiştir. Aynı araştırmacılar, normal sıçanlarda yapılan deneylerde amigdala bölgesine Nesfatin-1 enjeksiyonu sonrası kortikosteron düzeylerinde de artış görüldüğünü rapor etmişlerdir (122). Bu bulgular, amigdala ve Nesfatin-1 etkileşiminde hem psikolojik hem de fiziksel stresörlerin rol oynadığını göstermektedir.

Nesfatin-1'in amigdala serotonin düzeyine etkileriyle ilgili santral veya periferik enjeksiyonlarla yapılan çalışmalar sınırlıdır. Bununla birlikte, Nesfatin-1'in beyin sapında serotonerjik nöronlarla kolokalizasyon gösterdiği bilinmektedir (75). ICV uygulanan Nesfatin-1'in dorsal rafe nükleusundaki serotonin düzeylerini artırdığı, bu artışın PVN'deki CRH aktivitesi ile ilişkili olarak plazma ACTH ve kortikosteron düzeylerinde yükselme ile eşlik ettiği bildirilmiştir (11). Projemizde ise Nesfatin-1+p234 grubunda amigdala serotonin düzeylerinin daha düşük olduğu gözlemlendi (Tablo 6 ve Şekil 11). Bu durum, Nesfatin-1'in etkisinin kisspeptin sinyalleşmesi engellendiğinde daha belirgin hale geldiğini ortaya koymaktadır. Verilerimiz göz önünde bulundurulduğunda Nesfatin-1+p234 grubunda HHA aks aktivitesinde artış söz konusuydu.

Depresyonda beyinde serotonin düzeylerinin düşmesi ve buna eşlik eden yüksek kortizol seviyeleri görülebilmektedir (123, 124). Akut citalopram tedavisi ile seçici serotonin geri alım inhibitörü alan hastalarda amigdala serotonin düzeyleri artış göstermektedir (125). İnsanlarda koşullanma öncesi citalopram uygulanması, korku koşullanmasına bağlı şaşırma tepkisini artırmaktadır (126, 127). Sıçanlarda işitsel korku koşullanması öncesinde akut citalopram tedavisinin ise donma tepkilerini artırdığı rapor edilmiştir (128, 129). Bu bulgular, serotonin düzeylerindeki artışın koşullanmış korku yanıtlarını güçlendirdiğini göstermektedir (130). Öte yandan, kronik citalopram tedavisi gören insanlarda koşullu korkuya bağlı şaşırma tepkileri değişmemekte (127), kronik tedavi gören sıçanlarda ise şaşırma/korkma tepkileri azalmaktadır (128). Bu, serotonin aktivitesindeki kronik artışın korkuya alışmayı kolaylaştırarak, korku tepkilerini azalttığını ortaya koymaktadır (130). Bu sonuçlar, amigdala serotonin düzeylerindeki azalmanın uzun vadede stres ve korku yanıtlarını olumsuz etkileyebileceğini göstermektedir. Dolayısıyla, kisspeptin sinyalleşmesindeki azalma ve Nesfatin-1 seviyesindeki artışın stresle başa çıkma ve korku yanıtlarını olumsuz etkilemesi muhtemeldir.

Noradrenalin bir nörotransmitter olarak amigdala nöronal aktivitesini modüle eder. Noradrenalinin amigdala nöronları üzerindeki etkileri reseptör spesifiktir ve reseptör türüne bağlı olarak çeşitlilik gösterir. Örneğin, CeA nöronlarında $\alpha 2$ reseptörlerinin yüksek

aktivitesi, glutamaterjik duyarlılığı azaltarak nöronal ateşleme düzeyini düşürür (131). Buna karşın, $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ reseptörlerinin birlikte aktivasyonu, ateşleme düzeyinde artışa yol açar (132). Buna ek olarak, noradrenalinin amigdalanın BLA nükleusundaki nöronlarda genellikle inhibe edici etkileri vardır (133, 134). Noradrenalinin BLA nöronlarının ateşleme seviyesinin kontrolünde, GABAerjik inhibisyonun modülasyonu da önemli rol oynar. GABA'nın inhibitör etkisi, stres faktörlerine karşı verilen fizyolojik ve davranışsal tepkilerin düzenlenmesinde kritik bir rol üstlenir. Bu süreçte, CRH ile noradrenalin etkileşiminin inhibisyonu da devreye girer (45, 104). Amigdalanın CeA bölgesinde bulunan CRH içeren nöronlar, doğrudan ve dolaylı yollarla lokus seruleus ve rafe nükleusları ile bağlantılıdır. Noradrenerjik ve serotonerjik nöronlar, birbirleriyle ve CRH içeren nöronlarla aksonal bağlantılar kurarak etkileşimde bulunur. Bu bağlantılar sayesinde CeA'da artan CRH seviyeleri, aynı zamanda lokus seruleus ve rafe nükleuslarında da gözlemlenebilir (36).

Noradrenalinin strese bağlı otonomik yanıt üzerindeki etkileri oldukça iyi bilinmektedir. Hipotalamus ve amigdala ile lokus seruleus arasındaki ileri beslemeli işleyiş; stres, korku, duygusal hafıza, uyarılma ve uyanıklık gibi süreçlerin yanı sıra, strese verilen endokrin ve otonomik yanıtların oluşumunda ve entegrasyonunda kritik bir rol oynar (135). Bu işleyişin modülasyonu glukokortikoidler tarafından düzenlenir (136). Kısıtlama stresi (137) ve ayak şoku (138) gibi stres etkenleri, akut dönemde amigdalada noradrenalin salınımını artırır. Bu etkiler hızla ortaya çıkmakta olup, birkaç dakika ile bir saate kadar değişen sürelerde azalır. Noradrenalindeki bu geçici yükselme, BLA ana nöronlarını doğrudan etkileyebilir veya diğer faktörler (örneğin GABA) aracılığıyla uzun süreli davranışsal değişikliklere yol açabilir (139, 140).

Farklı stres türleri, amigdalada noradrenalin seviyeleri ve reseptör ifadelerinde farklı değişiklikler üretebilir. Örneğin, öğrenilmiş çaresizlik modeli uygulandığında, amigdalada $\alpha 2$ reseptörlerinin artış gösterdiği bildirilmiştir (141). Buna karşılık, akut soğuk kısıtlama stresi, $\alpha 2$ reseptör yoğunluğunda bir azalmaya neden olurken, reseptör afinitesinde artış meydana gelir (142). Ayrıca, tekrarlanan kısıtlama stresi, CeA'daki bazal noradrenalin seviyelerinde ve kısıtlamaya yanıt olarak gelişen noradrenalin piki seviyesinde bir azalmaya yol açmaktadır (137).

Nesfatin-1'in amigdalada noradrenalin ile olan ilişkisine dair herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, projemiz kapsamında elde edilen veriler, bu alandaki ilk bulgular niteliğindedir. Nesfatin-1, hipotalamusun yanı sıra limbik sistem yapıları ve beyin

sapındaki lokus seruleus nükleusundaki noradrenerjik nöronlarla kolokelize durumdadır (75). Amigdalanın dışında, diğer limbik sistem yapılarında ICV yapılan Nesfatin-1 enjeksiyonu, lokus serulousta noradrenalin aktivitesini artırmaktadır. Bu artışa PVN’de CRH aktivitesinde artış, plazma ACTH ve kortikosteron seviyelerinin yükselmesi eşlik etmektedir (11). Projemizde, amigdala noradrenalin seviyeleri açısından Nesfatin-1 ve Nesfatin-1+p234 gruplarında anlamlı bir artış söz konusuydu (Tablo 7 ve Şekil 12). Bu artışların, Nesfatin-1’in anksiyojenik etkileri ile ilişkili olduğu söylenebilir. Nitekim, HHA aks ile ilgili verilerimiz Nesfatin-1’in HHA aksı aktive ederek, anksiyojenik etki oluşturabileceğine işaret etmektedir.

Stres, korku ve duygu durumuyla ilgili süreçlerde mezolimbik dopamin sisteminin önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Ancak dopaminin stres yanıtı ve stresle ilişkili durumlar üzerindeki etkisi tam olarak anlaşılmış değildir. İnsanlarda strese maruz kalındığında mezolimbik dopamin aktivitesinin arttığı bildirilmektedir (143). Öte yandan, post-travmatik stres bozukluğu (PTSB) vakalarında dopamin metabolizmasında bir değişiklik olmadığı da öne sürülmüştür. Bununla birlikte, PTSB hastalarında idrarda dopamin ve dopamin metabolitlerinin artış gösterdiğini rapor eden çalışmalar da mevcuttur (45).

Nesfatin-1 ve amigdala dopamin düzeyi hakkında henüz bir çalışma mevcut değildir. Ancak amigdala dışında, Nesfatin-1’in dopaminerjik aktivitesiyle ilişkili araştırmalar mevcuttur. Konuyla ilgili olarak, VTA’da yer alan dopamin ve GABA nöronlarının NUCB2/Nesfatin-1 ekspresse ettiği bilinmektedir (110). VTA’dan amigdala, hipokampus ve nükleus akümbens gibi limbik sistem alanlarına projekte olan bu nöronlar, mezolimbik dopamin yolağını oluşturur. Elektrofizyolojik çalışmalarda, Nesfatin-1’in VTA’daki dopamin nöronlarında hiperpolarizasyona neden olduğunu, ancak GABA nöronlarında bu etkinin görülmediğini ortaya koymuştur. Bu bulgu, Nesfatin-1’in VTA’daki dopaminerjik aktiviteyi olumsuz etkileyerek anoreksijenik etkisinde rol oynadığı ve beslenme davranışını sürdüren hedonik duyguyu azalttığı şeklinde yorumlanmıştır (110).

VTA’ya Nesfatin-1’in enjekte edildiği bir çalışmada ise farelerde karanlık periyottaki kümülatif gıda alımında önemli bir azalma gözlenmiştir (144). Ayrıca, bu çalışmada VTA’daki dopaminerjik nöronların uyarılabilirliğinin azaldığı ve nükleus akümbens bölgesinde dopamin salınımının düştüğü belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, substantia nigra’da da Nesfatin-1’in dopaminerjik aktivite üzerinde baskılayıcı bir etkisi

olduğu tespit edilmiştir (111). Bu sonuçlar, stres ve anksiyete sırasında görülen iştah değişikliklerinin ve özellikle depresyondaki hedonik iştah kaybının, Nesfatin-1'in VTA ile ödül merkezi olarak bilinen nükleus akümbens'teki dopaminerjik aktiviteyi azaltmasıyla ilişkili olabileceğini göstermesi açısından önemlidir.

Dopamin aktivitesinin artışı veya baskılanması, hangi beyin bölgesinin devrede olduğuna bağlı olarak farklı sonuçlar doğurur. Ödül merkezlerinin uyarılması sırasında dopamin düzeylerindeki artış önemlidir. Ayrıca stres durumunda da insanlarda (143) ve hayvanlarda (145) dopaminerjik aktivitenin artışı gözlemlenmiştir. Dopaminin stres ve duygu-durumla olan ilişkisini anlamada kilit noktalardan biri, HHA aksın işleyişidir. HHA aksı, vücudun strese verdiği hormonal tepkilerin düzenlenmesinde önemli rol oynar ve stresörlere bağlı olarak bu aksın aktivasyonu sonucu kortizol/kortikosteron seviyeleri yükselir (146-148). Bu faktörler dikkate alınmadan dopamin aktivitesi üzerine yapılan yorumlar eksik veya yanıltıcı olabilir.

Çalışmamızda, Nesfatin-1, Nesfatin-1+p234 ve Nesfatin-1+Atosiban gruplarında, amigdala dopamin düzeylerinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğu tespit edildi (Tablo 8 ve Şekil 13). Nesfatin-1'in dopaminerjik nöronlar üzerinde genel olarak inhibitör bir etkiye sahip olduğu ve bu etkinin amigdala üzerinde de geçerli olduğu söylenebilir. Bu bulgu, Nesfatin-1'in özellikle anoreksijenik etkisiyle ilişkilendirilebilir. Bu durum, hem hipotalamustaki açlık merkezleri üzerindeki negatif etkiden hem de bu süreçle bağlantılı olarak limbik sistemde motivasyonla ilişkili dopaminerjik aktivitenin baskılanmasından kaynaklanıyor olabilir.

5.3. Hipofiz Oksitosin Düzeyine Nesfatin-1'in Etkileri

Çalışmamızda, hipofiz bezi oksitosin verilerine baktığımızda, kontrol grubuna göre hipofizer oksitosin düzeyinde anlamlı bir farklılık bulunmadı (Tablo 9 ve Şekil 16). Ancak bazı gruplarda oksitosin düzeylerinde gözlemlenen artış eğilimlerinin farklılık göstermesi dikkate değer bir durum olarak değerlendirilmiştir. Öncelikle, santral enjeksiyonla tek doz uygulamamızın ve oksitosin düzeyini yalnızca hipofizde ölçmemizin, ilgili literatürler esas alınarak belirli bir amaca yönelik planlandığını, fakat aynı zamanda bu faktörlerin kısıtlayıcı sebepler olabileceğini düşünüyoruz. Farklı doz ve sürelerle yapılan uygulamalar ya da hipofizer oksitosin içeriğinin yanı sıra hipotalamik oksitosin düzeylerinin de ölçüldüğü bir çalışma ile daha net veriler elde edilebilir. Deneylerimizin genel olarak, oksitosin düzeyindeki artış eğiliminin Nesfatin-1+p234 ve Nesfatin-1+Astressin2B gruplarında daha

düşük seviyede kaldığı görüldü (Tablo 9 ve Şekil 14). Buna ek olarak, Nesfatin-1 grubunda kontrol grubuna kıyasla bir artış eğilimi olduğu saptandı.

Oksitosin hormonu, hipotalamusun PVN ve supraoptik nükleusundaki nöronlar tarafından üretildikten sonra, nörofizin-1 aracılı transportla, arka hipofize taşınır (149). Oksitosinin üretildiği bu alanlardan nükleus akümbens'e uzanan aksonal yapıların varlığı bilinmektedir. Oksitosin reseptörü, beyin geniş bir dağılım alanına sahiptir ve CeA da dahil olmak üzere nükleus akümbens, talamus ve hipotalamusun ventromedial nükleusu gibi limbik sistem yapılarında ekspresse edilmektedir (150, 151). Sıçanlarda yapılan çalışmalar, periferik oksitosin enjeksiyonunun lokomotor aktiviteyi azalttığını, düşük dozlarda anksiyolitik, yüksek dozlarda ise sedatif etki gösterdiğini ortaya koymuştur (152). Bu veriyi destekler nitelikte çalışmalarda, yaygın anksiyete bozukluğu olan hastalara oksitosin uygulamasının anksiyete belirtilerini azalttığı rapor edilmiştir (153, 154).

Oksitosin, duygu durumu üzerinde de önemli etkilere sahiptir. Yapılan çalışmalar, bu hormonun antidepresan benzeri bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir (155, 156). Majör depresyonlu hastalarda plazma oksitosin düzeylerinin düşük olduğu ileri sürülmüştür (157). Ayrıca deneysel çalışmalar, oksitosin infüzyonunun rafe nükleusunda serotonin üretimini artırdığını ortaya koymuştur (158).

Çalışmamızda, Nesfatin-1'e bağlı olarak GABA düzeyleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde düşüktü. Aynı durum, Nesfatin-1+Atosiban grubunda da gözlemlendi. Bu sonuç, oksitosin reseptör sinyalleşmesinin bloklanması, Nesfatin-1'e bağlı HHA aks aktivasyonunu artırdığını düşündürmektedir.

Nesfatin-1'in PVN, lateral hipotalamik alan başta olmak üzere iştahla ilişkili hipotalamus bölümlerinde oksitosinle birlikte bulunur (10, 74, 75). Nesfatin-1 gibi oksitosin de anoreksijenik yani iştahı baskılayıcı etkisi olan bir hormondur. Hem santral (159) hem de periferik (160) oksitosin enjeksiyonları iştah üzerine baskılayıcı etki oluşturduğu bilinmektedir. Hipotalamusta ve diğer iştah kontrolüyle ilgili bölgelerde, Nesfatin-1 nöronlarının oksitosinle sinerjik bir etkileşim içinde olduğu öne sürülmüştür (161). Oksitosin reseptör antagonisti kullanıldığında, Nesfatin-1'e bağlı gıda ve su alımındaki azalma büyük ölçüde değiştirilebilmektedir (162). Bu da Nesfatin-1'in anoreksijenik etkisinde oksitosin sinerjik regülasyonun önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Her iki hormonun da stres, duygu durumu, anksiyete gibi emosyonel durumlarla ilişkili etkileri,

depresyon ile anksiyete patofizyolojisini ve bu hastalıklara bağlı iştah değişikliklerini anlamak açısından önemlidir.

Nesfatin-1 grubunun oksitosin düzeyi, kontrol grubundan anlamlı şekilde farklı olmasa da daha yüksek seviyedeydi. Bu durum Nesfatin-1'in oksitosin aktivitesini uyarıcı bir etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Genel bir perspektifle, Nesfatin-1'in beslenme davranışı ve iştahın düzenlenmesinde oksitosinle sinerjik bir etkileşime sahip olduğu, emosyonel durumlarla ilişkili olarak ise oksitosinin, Nesfatin-1'in HHA aksı üzerine etkisini baskılayıcı bir rol oynadığı söylenbilir.

5.4. Sonuçlar

Nesfatin-1'in HHA aksı aktive etmektedir. Bu etkide büyük oranda CRH1 reseptörleri aracılık etmektedir.

Nesfatin-1, kisspeptin sinyalleşmesinin bozulduğu durumlarda da HHA aks aktivitesini artırmaktadır. Nesfatin-1'e bağlı bu etkilerde amigdalada serotonin ve GABA düzeylerinin azalmasının rolü olduğu anlaşılmıştır.

Bütün bu bulgular ışığında, stres fizyolojisi ve patofizyolojisinde Nesfatin-1'in HHA aks ve amigdala aktivitesi üzerine uyarıcı etkisi olduğu söylenbilir.

6. KAYNAKLAR

1. Oh-I S, Shimizu H, Satoh T, Okada S, Adachi S, Inoue K, Eguchi H, Yamamoto M, Imaki T, Hashimoto K, Tsuchiya T, Monden T, Horiguchi K, Yamada M, Mori M (2006). Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature* 443(7112): 709-712.
2. Goebel M, Stengel A, Wang L, Lambrecht NWG, Taché Y (2009). Nesfatin-1 immunoreactivity in rat brain and spinal cord autonomic nuclei. *Neurosci Lett* 452(3): 241-246.
3. Barbano MF, Zhang S, Chen E, Espinoza O, Mohammad U, Alvarez-Bagnarol Y, Liu B, Hahn S, Morales M (2024). Lateral hypothalamic glutamatergic inputs to VTA glutamatergic neurons mediate prioritization of innate defensive behavior over feeding. *Nat Commun* 15(1): 403.
4. Pecoraro N, Reyes F, Gomez F, Bhargava A, Dallman MF (2004). Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: Feedforward and feedback effects of chronic stress. *Endocrinology* 145(8): 3754-3762.
5. Tamashiro KLK, Hegeman MA, Nguyen MMN, Melhorn SJ, Ma LY, Woods SC, Sakai RR (2007). Dynamic body weight and body composition changes in response to subordination stress. *Physiol Behav* 91(4): 440-448.
6. Kmiecik AM, Dzięgiel P, Podhorska-Okołów M (2021). Nucleobindin-2/Nesfatin-1—A New Cancer Related Molecule? *Int J Mol Sci* 22(15): 8313.
7. Ulrich-Lai YM, Fulton S, Wilson M, Petrovich G, Rinaman L (2015). Stress exposure, food intake and emotional state. *Stress* 18(4): 381-99.
8. Okere B, Xu L, Roubos EW, Sonetti D, Kozicz T (2010). Restraint stress alters the secretory activity of neurons co-expressing urocortin-1, cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide and nesfatin-1 in the mouse Edinger-Westphal nucleus. *Brain Res* 1317: 92-99.
9. Fort P, Salvert D, Hanriot L, Jegu S, Shimizu H, Hashimoto K, Mori M, Luppi P-H (2008). The satiety molecule nesfatin-1 is co-expressed with melanin concentrating hormone in tuberal hypothalamic neurons of the rat. *Neuroscience* 155(1): 174-181.

10. Foo KS, Brismar H, Broberger C (2008). Distribution and neuropeptide coexistence of nucleobindin-2 mRNA/nesfatin-like immunoreactivity in the rat CNS. *Neuroscience* 156(3): 563-579.
11. Yoshida N, Maejima Y, Sedbazar U, Ando A, Kurita H, Damdindorj B, Takano E, Gantulga D, Iwasaki Y, Kurashina T, Onaka T, Dezaki K, Nakata M, Mori M, Yada T (2010). Stressor-responsive central nesfatin-1 activates corticotropin-releasing hormone, noradrenaline and serotonin neurons and evokes hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Aging (Albany NY)* 2(11): 775-784.
12. Merali Z, Cayer C, Kent P, Anisman H (2008). Nesfatin-1 increases anxiety- and fear-related behaviors in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 201(1): 115-123.
13. Şahin Z (2015). Puberte ve üremenin nöroendokrin kontrolünde Kisspeptin, RFRP-3 ve Nesfatin-1'in etkileşimi üzerine deneysel araştırmalar. Doktora tezi, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı, Elazığ.
14. Goebel M, Stengel A, Wang L, Lambrecht NWG, Taché Y (2009). Nesfatin-1 immunoreactivity in rat brain and spinal cord autonomic nuclei. *Neurosci Lett* 452(3): 241-246.
15. Stengel A, Goebel M, Wang L, Taché Y (2010). Ghrelin, des-acyl ghrelin and nesfatin-1 in gastric X/A-like cells: Role as regulators of food intake and body weight. *Peptides* 31(2): 357-369.
16. Könczöl K, Bodnár I, Zelena D, Pintér O, Papp RS, Palkovits M, Nagy GM, Tóth ZE (2010). Nesfatin-1/NUCB2 may participate in the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats. *Neurochem Int* 57(3): 189-197.
17. Yosten GLC, Samson WK (2009). Nesfatin-1 exerts cardiovascular actions in brain: Possible interaction with the central melanocortin system. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* 297(2): R330-R336.
18. Tanida M, Mori M (2011). Nesfatin-1 stimulates renal sympathetic nerve activity in rats. *Neuroreport* 22(6): 309-312.
19. Yamawaki H, Takahashi M, Mukohda M, Morita T, Okada M, Hara Y (2012). A novel adipocytokine, nesfatin-1 modulates peripheral arterial contractility and blood pressure in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 418(4): 676-681.

20. Prinz P, Goebel-Stengel M, Teuffel P, Rose M, Klapp BF, Stengel A (2016). Peripheral and central localization of the nesfatin-1 receptor using autoradiography in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 470(3): 521-527.
21. Inhoff T, Stengel A, Peter L, Goebel M, Taché Y, Bannert N, Wiedenmann B, Klapp BF, Mönnikes H, Kobelt P (2010). Novel insight in distribution of nesfatin-1 and phospho-mTOR in the arcuate nucleus of the hypothalamus of rats. *Peptides* 31(2): 257-262.
22. Roa J, Garcia-Galiano D, Varela L, Sánchez-Garrido MA, Pineda R, Castellano JM, Ruiz-Pino F, Romero M, Aguilar E, López M, Gaytan F, Diéguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M (2009). The mammalian target of rapamycin as novel central regulator of puberty onset via modulation of hypothalamic Kiss1 system. *Endocrinology* 150(11): 5016-5026.
23. García-Galiano D, Navarro VM, Gaytan F, Tena-Sempere M (2010). Expanding roles of NUCB2/nesfatin-1 in neuroendocrine regulation. *J Mol Endocrinol* 45(5): 281-290.
24. Miller DB, O'Callaghan JP (2002). Neuroendocrine aspects of the response to stress. *Metabolism* 51(6): 5-10.
25. McEwen BS, Gianaros PJ (2010). Central role of the brain in stress and adaptation: Links to socioeconomic status, health, and disease. *Ann N Y Acad Sci* 1186(1): 190-222.
26. Ulrich-Lai YM, Herman JP (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci* 10(6): 397-409.
27. Goncharova ND (2013). Stress Responsiveness of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis: Age-Related Features of the Vasopressinergic Regulation. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4.
28. Kalsbeek A, van der Spek R, Lei J, Endert E, Buijs RM, Fliers E (2012). Circadian rhythms in the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Mol Cell Endocrinol* 349(1): 20-29.
29. Herman JP (2018). Regulation of Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Responses to Stressors by the Nucleus of the Solitary Tract/Dorsal Vagal Complex. *Cell Mol Neurobiol* 38(1): 25-35.

30. Yehuda R, Brand S, Yang RK (2006). Plasma neuropeptide Y concentrations in combat exposed veterans: Relationship to trauma exposure, recovery from PTSD, and coping. *Biol Psychiatry* 59(7): 660-663.
31. Martin EI, Ressler KJ, Binder E, Nemeroff CB (2009). The Neurobiology of Anxiety Disorders: Brain Imaging, Genetics, and Psychoneuroendocrinology. *Psychiatr Clin North Am* 32(3): 549-575.
32. Mravec B (2011). Role of catecholamine-induced activation of vagal afferent pathways in regulation of sympathoadrenal system activity: negative feedback loop of stress response. *Endocr Regul* 45(1): 37-41.
33. Habib KE, Gold PW, Chrousos GP (2001). Neuroendocrinology of stress. *Endocrinol Metab Clin North Am* 30(3): 695-728.
34. Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* 21(1): 55-89.
35. Retson TA, Van Bockstaele EJ (2013). Coordinate regulation of noradrenergic and serotonergic brain regions by amygdalar neurons. *J Chem Neuroanat* 52: 9-19.
36. Valentino RJ, Lucki I, Van Bockstaele E (2010). Corticotropin-releasing factor in the dorsal raphe nucleus: Linking stress coping and addiction. *Brain Res* 1314: 29-37.
37. Herman JP, Mueller NK, Figueiredo H (2004). Role of GABA and glutamate circuitry in hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress integration. *Ann N Y Acad Sci* 1018: 35-45.
38. Dedic N, Chen A, Deussing JM (2018). The CRF Family of Neuropeptides and their Receptors - Mediators of the Central Stress Response. *Curr Mol Pharmacol* 11(1): 4-31.
39. Refojo D, Holsboer F (2009). CRH signaling: Molecular specificity for drug targeting in the CNS. *Ann N Y Acad Sci* 1179(1): 106-119.
40. Laryea G, Arnett MG, Muglia LJ (2012). Behavioral Studies and Genetic Alterations in Corticotropin-Releasing Hormone (CRH) Neurocircuitry: Insights into Human Psychiatric Disorders. *Behav Sci (Basel)* 2(2): 135-171.

41. Henckens MJAG, Deussing JM, Chen A (2016). Region-specific roles of the corticotropin-releasing factor-urocortin system in stress. *Nat Rev Neurosci* 17(10): 636-651.
42. Tang M, Joseph A, Chen Q, Jiao J, Tang Y-P (2012). CCKergic System, Hypothalamus-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis, and Early-Life Stress (ELS). *Glucocorticoids - New Recognit Our Fam Friend InTech*. doi:10.5772/52042.
43. Pecoraro N, Gomez F, Dallman MF (2005). Glucocorticoids dose-dependently remodel energy stores and amplify incentive relativity effects. *Psychoneuroendocrinology* 30(9): 815-825.
44. Karolyi IJ, Burrows HL, Ramesh TM, Nakajima M, Lesh JS, Seong E, Camper SA, Seasholtz AF (1999). Altered anxiety and weight gain in corticotropin-releasing hormone-binding protein-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci* 96(20): 11595-11600.
45. Sherin JE, Nemeroff CB (2011). Post-traumatic stress disorder: The neurobiological impact of psychological trauma. *Dialogues Clin Neurosci* 13(3): 263-278.
46. Fuchs E, Gould E (2000). In vivo neurogenesis in the adult brain: Regulation and functional implications. *Eur J Neurosci* 12(7): 2211-2214.
47. Kaufman J, Plotsky PM, Nemeroff CB, Charney DS (2000). Effects of early adverse experiences on brain structure and function: Clinical implications. *Biol Psychiatry* 48(8): 778-790.
48. Flak JN, Myers B, Solomon MB, McKlveen JM, Krause EG, Herman JP (2014). Role of paraventricular nucleus-projecting norepinephrine/epinephrine neurons in acute and chronic stress. *Eur J Neurosci* 39(11): 1903-1911.
49. McCall JG, Siuda ER, Bhatti DL, Lawson LA, McElligott ZA, Stuber GD, Bruchas MR (2017). Locus coeruleus to basolateral amygdala noradrenergic projections promote anxiety-like behavior. *Elife* 6.
50. Uvnäs-Moberg K, Gross MM, Calleja-Agius J, Turner JD (2024). The Yin and Yang of the oxytocin and stress systems: opposites, yet interdependent and intertwined determinants of lifelong health trajectories. *Front Endocrinol (Lausanne)* 15.
51. Beyeler A, Dabrowska J (2020). Neuronal diversity of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis SayfaNo: 63-100.

52. Sah P, Faber ESL, Lopez De Armentia M, Power J (2003). The Amygdaloid Complex: Anatomy and Physiology. *Physiol Rev* 83(3): 803-834.
53. Ehrlich I, Humeau Y, Grenier F, Cioocchi S, Herry C, Lüthi A (2009). Amygdala Inhibitory Circuits and the Control of Fear Memory. *Neuron* 62(6): 757-771.
54. Royer S, Martina M, Paré D (2000). Polarized Synaptic Interactions Between Intercalated Neurons of the Amygdala. *J Neurophysiol* 83(6): 3509-3518.
55. Godoy LD, Rossignoli MT, Delfino-Pereira P, Garcia-Cairasco N, de Lima Umeoka EH (2018). A Comprehensive Overview on Stress Neurobiology: Basic Concepts and Clinical Implications. *Front Behav Neurosci* 12.
56. Ferrara NC, Vantrease JE, Loh MK, Rosenkranz JA, Rosenkranz JA (2020). Protect and harm: Effects of stress on the amygdala. (Janice Urban J. Amiel Rosenkranz, editor) *Handb Behav Neurosci* 26: 241-274.
57. Paretkar T, Dimitrov E (2018). The Central Amygdala Corticotropin-releasing hormone (CRH) Neurons Modulation of Anxiety-like Behavior and Hippocampus-dependent Memory in Mice. *Neuroscience* 390: 187-197.
58. Andolina D, Maran D, Valzania A, Conversi D, Puglisi-Allegra S (2013). Prefrontal/Amygdalar System Determines Stress Coping Behavior Through 5-HT/GABA Connection. *Neuropsychopharmacology* 38(10): 2057-2067.
59. Arborelius L, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB (1999). The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J Endocrinol* 160(1): 1-12.
60. Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM (2002). Neurobiology of depression. *Neuron* 34(1): 13-25.
61. Baker DG, West SA, Nicholson WE, Ekhtor NN, Kasckow JW, Hill KK, Bruce AB, Orth DN, Geraciotti TD (1999). Serial CSF corticotropin-releasing hormone levels and adrenocortical activity in combat veterans with posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry* 156(4): 585-588.
62. Popoli M, Yan Z, McEwen BS, Sanacora G (2011). The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat Rev Neurosci* 13(1): 22-37.

63. Duvarci S, Pare D (2014). Amygdala Microcircuits Controlling Learned Fear. *Neuron* 82(5): 966-980.
64. Hale MW, Shekhar A, Lowry CA (2012). Stress-related serotonergic systems: implications for symptomatology of anxiety and affective disorders. *Cell Mol Neurobiol* 32(5): 695-708.
65. Dayan P, Huys QJM (2009). Serotonin in Affective Control. *Annu Rev Neurosci* 32(1): 95-126.
66. Valentino RJ, Van Bockstaele E (2008). Convergent regulation of locus coeruleus activity as an adaptive response to stress. *Eur J Pharmacol* 583(2-3): 194-203.
67. McCall JG, Al-Hasani R, Siuda ER, Hong DY, Norris AJ, Ford CP, Bruchas MR (2015). CRH Engagement of the Locus Coeruleus Noradrenergic System Mediates Stress-Induced Anxiety. *Neuron* 87(3): 605-620.
68. Baik J-H (2020). Stress and the dopaminergic reward system. *Exp Mol Med* 52(12): 1879-1890.
69. Pignatelli M, Bonci A (2015). Role of Dopamine Neurons in Reward and Aversion: A Synaptic Plasticity Perspective. *Neuron* 86(5): 1145-1157.
70. Nestler EJ, Carlezon WA (2006). The Mesolimbic Dopamine Reward Circuit in Depression. *Biol Psychiatry* 59(12): 1151-1159.
71. Barnikol-Watanabe S, Gross NA, Götz H, Henkel T, Karabinos A, Kratzin H, Barnikol HU, Hilschmann N (1994). Human protein NEFA, a novel DNA binding/EF-hand/leucine zipper protein. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA, isolation and characterization of the protein. *Biol Chem Hoppe Seyler* 375(8): 497-512.
72. Miura K, Titani K, Kurosawa Y, Kanai Y (1992). Molecular cloning of nucleobindin, a novel DNA-binding protein that contains both a signal peptide and a leucine zipper structure. *Biochem Biophys Res Commun* 187(1): 375-380.
73. Goebel-Stengel M, Wang L (2013). Central and Peripheral Expression and Distribution of NUCB2/nesfatin-1. *Curr Pharm Des* 19(39): 6935-6940.

74. Kohno D, Nakata M, Maejima Y, Shimizu H, Sedbazar U, Yoshida N, Dezaki K, Onaka T, Mori M, Yada T (2008). Nesfatin-1 neurons in paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus coexpress oxytocin and vasopressin and are activated by refeeding. *Endocrinology* 149(3): 1295-1301.
75. Brailoiu GC, Dun SL, Brailoiu E, Inan S, Yang J, Jaw KC, Dun NJ (2007). Nesfatin-1: Distribution and interaction with a G protein-coupled receptor in the rat brain. *Endocrinology* 148(10): 5088-5094.
76. Gonzalez R, Tiwari A, Unniappan S (2009). Pancreatic beta cells colocalize insulin and pronestatin immunoreactivity in rodents. *Biochem Biophys Res Commun* 381(4): 643-648.
77. Stengel A, Goebel M, Yakubov I, Wang L, Witcher D, Coskun T, Taché Y, Sachs G, Lambrecht NWG (2009). Identification and characterization of nesfatin-1 immunoreactivity in endocrine cell types of the rat gastric oxyntic mucosa. *Endocrinology* 150(1): 232-238.
78. Luo J, Wen F, Qiu D, Wang S (2021). Nesfatin-1 in lipid metabolism and lipid-related diseases. *Clin Chim Acta* 522: 23-30.
79. Wang Q, Guo F, Sun X, Gao S, Li Z, Gong Y, Xu L (2014). Effects of exogenous nesfatin-1 on gastric distention-sensitive neurons in the central nucleus of the amygdala and gastric motility in rats. *Neurosci Lett* 582: 65-70.
80. Guo FF, Xu L, Gao SL, Sun XR, Li ZL, Gong YL (2015). The effects of nesfatin-1 in the paraventricular nucleus on gastric motility and its potential regulation by the lateral hypothalamic area in rats. *J Neurochem* 132(3): 266-275.
81. Ayada C, Toru, Korkut Y (2015). Nesfatin-1 and its effects on different systems. *Hippokratia* 19(1): 4-10.
82. Goebel M, Stengel A, Wang L, Taché Y (2009). Restraint stress activates nesfatin-1-immunoreactive brain nuclei in rats. *Brain Res* 1300: 114-124.
83. Weibert E, Hofmann T, Stengel A (2019). Role of nesfatin-1 in anxiety, depression and the response to stress. *Psychoneuroendocrinology* 100: 58-66.

84. Ge J-F, Xu Y-Y, Qin G, Peng Y-N, Zhang C-F, Liu X-R, Liang L-C, Wang Z-Z, Chen F-H (2015). Depression-like behavior induced by Nesfatin-1 in rats: Involvement of increased immune activation and imbalance of synaptic vesicle proteins. *Front Neurosci* 9(NOV): 429.
85. Celik A, Gurger M, Can Ç, Balin M, Gul E, Kobat MA, Gumusay U, Sahan M, Bursali KB, Celiker I, Aydin S, Aydin S (2013). The effect of nesfatin-1 levels on paroxysmal supraventricular tachycardia. *J Investig Med* 61(5): 852-855.
86. Zhao Y, Ma X, Wang Q, Zhou Y, Zhang Y, Wu L, Ji H, Qin G, Lu J, Bi Y, Ning G (2015). Nesfatin-1 correlates with hypertension in overweight or obese Han Chinese population. *Clin Exp Hypertens* 37(1): 51-56.
87. Scharner S, Prinz P, Goebel-Stengel M, Lommel R, Kobelt P, Hofmann T, Rose M, Stengel A (2017). Activity-based anorexia activates nesfatin-1 immunoreactive neurons in distinct brain nuclei of female rats. *Brain Res* 1677: 33-46.
88. Paxinos G, Watson C (2013). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. , 7th Editio.
89. Bagosi Z, Csabafi K, Palotai M, Jászberényi M, Földesi I, Gardi J, Szabó G, Telegdy G (2014). The effect of urocortin I on the hypothalamic ACTH secretagogues and its impact on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuropeptides* 48(1): 15-20.
90. Benoussaidh A, Maurin Y, Rampin O (2005). Possible neural mediation of the central effects of oxytocin on uterine motility. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* 289(3 58-3): R798-R804.
91. Kutlu S, Aydin M, Alcin E, Ozcan M, Bakos J, Jezova D, Yilmaz B (2010). Leptin modulates noradrenaline release in the paraventricular nucleus and plasma oxytocin levels in female rats: A microdialysis study. *Brain Res* 1317: 87-91.
92. Kutlu S, Yilmaz B, Canpolat S, Sandal S, Ozcan M, Kumru S, Kelestimur H (2004). Mu opioid modulation of oxytocin secretion in late pregnant and parturient rats: Involvement of noradrenergic neurotransmission. *Neuroendocrinology* 79(4): 197-203.

93. Aydın M, Yılmaz B, Alcin E, Nedzvetsky VS, Sahin Z, Tuzcu M (2008). Effects of letrozole on hippocampal and cortical catecholaminergic neurotransmitter levels, neural cell adhesion molecule expression and spatial learning and memory in female rats. *Neuroscience* 151(1): 186-194.
94. Şahin Z (2006). Melatoninin sıçan timus hücre kültürlerinde Th1/Th2 dengesi üzerine etkileri. Yüksek lisans tezi, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı, Elazığ.
95. Paxinos G, Watson C (2006). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th edn. J Anat , 6th ed. New York: Academic Press, SayfaNo: 27-29.
96. Stephens MAC, Wand G (2012). Stress and the HPA axis: Role of glucocorticoids in alcohol dependence. *Alcohol Res Curr Rev* 34(4): 468-483.
97. Van Bodegom M, Homberg JR, Henckens MJAG (2017). Modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by early life stress exposure. *Front Cell Neurosci* 11.
98. Xu YY, Ge JF, Qin G, Peng YN, Zhang CF, Liu XR, Liang LC, Wang ZZ, Chen FH, Li J (2015). Acute, but not chronic, stress increased the plasma concentration and hypothalamic mRNA expression of NUCB2/nesfatin-1 in rats. *Neuropeptides* 54: 47-53.
99. Steckler T, Holsboer F (1999). Corticotropin-releasing hormone receptor subtypes and emotion. *Biol Psychiatry* 46(11): 1480-1508.
100. Pacak K, Palkovits M, Kopin IJ, Goldstein DS (1995). Stress-induced norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus and pituitary-adrenocortical and sympathoadrenal activity: In vivo microdialysis studies. *Front Neuroendocrinol* 16(2): 89-150.
101. Öngür D, An X, Price JL (1998). Prefrontal cortical projections to the hypothalamus in macaque monkeys. *J Comp Neurol* 401(4): 480-505.
102. Dunn AJ, Berridge CW (1990). Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? *Brain Res Rev* 15(2): 71-100.

103. Owens, M.J; Plotsky, P.M; Nemeroff CB (1996). *Peptides and Affective Disorders* Washington DC: American Psychiatric Press, SayfaNo: 259-293.
104. Heim C, Schultebraucks K, Marmar CR, Nemeroff CB (2018). Neurobiological pathways involved in fear, stress, and PTSD. (I. Liberzon & K. J. Ressler, editors) *Post-traumatic Stress Disord* 1: 331-351.
105. Singewald N, Schmuckermair C, Whittle N, Holmes A, Ressler KJ (2015). Pharmacology of cognitive enhancers for exposure-based therapy of fear, anxiety and trauma-related disorders. *Pharmacol Ther* 149: 150-190.
106. Ressler KJ, Rothbaum BO, Tannenbaum L, Anderson P, Graap K, Zimand E, Hodges L, Davis M (2004). Cognitive enhancers as adjuncts to psychotherapy: Use of D-cycloserine in phobic individuals to facilitate extinction of fear. *Arch Gen Psychiatry* 61(11): 1136-1144.
107. Hofmann SG (2014). D-cycloserine for treating anxiety disorders: Making good exposures better and bad exposures worse. *Depress Anxiety* 31(3): 175-177.
108. Yurtseven DG, Kocoglu SS, Minbay Z, Eyigor O (2020). Immunohistochemical evidence for glutamatergic regulation of nesfatin-1 neurons in the rat hypothalamus. *Brain Sci* 10(9): 1-18.
109. Serter Kocoglu S, Oy C, Halk Z, Cakır C, Minbay Z, Eyigor O (2022). Glutamate receptor antagonist suppresses the activation of nesfatin-1 neurons following refeeding or glucose administration. *Folia Morphol (Warsz)* 81(2): 379-386.
110. Dore R, Krotenko R, Reising JP, Murru L, Sundaram SM, Di Spiezio A, Müller-Fielitz H, Schwaninger M, Jöhren O, Mittag J, Passafaro M, Shanabrough M, Horvath TL, Schulz C, Lehnert H (2020). Nesfatin-1 decreases the motivational and rewarding value of food. *Neuropsychopharmacology* 45(10): 1645-1655.
111. Li C, Zhang F, Shi L, Zhang H, Tian Z, Xie J, Jiang H (2014). Nesfatin-1 decreases excitability of dopaminergic neurons in the substantia nigra. *J Mol Neurosci* 52(3): 419-424.

112. Bonnet MS, Ouelaa W, Tillement V, Trouslard J, Jean A, Gonzalez BJ, Gourcerol G, Dallaporta M, Troadec JD, Mounien L (2013). Gastric distension activates NUCB2/nesfatin-1-expressing neurons in the nucleus of the solitary tract. *Regul Pept* 187: 17-23.
113. Jing FC, Zhang J, Feng C, Nian YY, Wang JH, Hu H, Yang B De, Sun XM, Zheng JY, Yin XR (2017). Potential rat model of anxiety-like gastric hypersensitivity induced by sequential stress. *World J Gastroenterol* 23(42): 7594-7608.
114. Viviani D, Terrettaz T, Magara F, Stoop R (2010). Oxytocin enhances the inhibitory effects of diazepam in the rat central medial amygdala. *Neuropharmacology* 58(1): 62-68.
115. Dong N, Du P, Hao X, He Z, Hou W, Wang L, Yuan W, Yang J, Jia R, Tai F (2017). Involvement of GABAA receptors in the regulation of social preference and emotional behaviors by oxytocin in the central amygdala of female mandarin voles. *Neuropeptides* 66: 8-17.
116. Han RT, Kim Y-B, Park E-H, Kim JY, Ryu C, Kim HY, Lee J, Pahk K, Shanyu C, Kim H, Back SK, Kim HJ, Kim YI, Na HS (2018). Long-term isolation elicits depression and anxiety-related behaviors by reducing Oxytocin-induced GABAergic transmission in Central Amygdala. *Front Mol Neurosci* 11: 246.
117. Ressler KJ, Nemeroff CB (2000). Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders. *Depress Anxiety* 12(SUPPL. 1): 2-19.
118. Van Bockstaele EJ, Colago EEO, Valentino RJ (1998). Amygdaloid corticotropin-releasing factor targets locus coeruleus dendrites: Substrate for the co-ordination of emotional and cognitive limbs of the stress response. *J Neuroendocrinol* 10(10): 743-758.
119. Van Bockstaele EJ, Bajic D, Proudfit H, Valentino RJ (2001). Topographic architecture of stress-related pathways targeting the noradrenergic locus coeruleus. *Physiol Behav* 73(3): 273-283.
120. Sengupta A, Bocchio M, Bannerman DM, Sharp T, Capogna M (2017). Control of amygdala circuits by 5-HT neurons via 5-HT and glutamate cotransmission. *J Neurosci* 37(7): 1785-1796.

121. Tokunaga R, Shimoju R, Takagi N, Shibata H, Kurosawa M (2016). Serotonin release in the central nucleus of the amygdala in response to noxious and innocuous cutaneous stimulation in anesthetized rats. *J Physiol Sci* 66(4): 307-314.
122. Zhou XP, Sha J, Huang L, Li TN, Zhang RR, Tang MD, Lin L, Li XL (2016). Nesfatin-1/NUCB2 in the amygdala influences visceral sensitivity via glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in male maternal separation rats. *Neurogastroenterol Motil* 28(10): 1545-1553.
123. Cowen PJ (2002). Cortisol, serotonin and depression: All stressed out? *Br J Psychiatry* 180(FEB.): 99-100.
124. Dinan TG (1994). Glucocorticoids and the genesis of depressive illness. A psychobiological model. *Br J Psychiatry* 164(MAR.): 365-371.
125. Bosker FJ, Cremers TIFH, Jongsma ME, Westerink BHC, Wikström H V., Den Boer JA (2001). Acute and chronic effects of citalopram on postsynaptic 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor-mediated feedback: A microdialysis study in the amygdala. *J Neurochem* 76(6): 1645-1653.
126. Browning M, Reid C, Cowen PJ, Goodwin GM, Harmer CJ (2007). A single dose of citalopram increases fear recognition in healthy subjects. *J Psychopharmacol* 21(7): 684-690.
127. Grillon C, Levenson J, Pine DS (2007). A single dose of the selective serotonin reuptake inhibitor citalopram exacerbates anxiety in humans: A fear-potentiated startle study. *Neuropsychopharmacology* 32(1): 225-231.
128. Burghardt NS, Sullivan GM, McEwen BS, Gorman JM, Ledoux JE (2004). The selective serotonin reuptake inhibitor citalopram increases fear after acute treatment but reduces fear with chronic treatment: A comparison with tianeptine. *Biol Psychiatry* 55(12): 1171-1178.
129. Burghardt NS, Bush DEA, McEwen BS, LeDoux JE (2007). Acute Selective Serotonin Reuptake Inhibitors Increase Conditioned Fear Expression: Blockade With a 5-HT_{2C} Receptor Antagonist. *Biol Psychiatry* 62(10): 1111-1118.
130. Bocchio M, McHugh SB, Bannerman DM, Sharp T, Capogna M (2016). Serotonin, amygdala and fear: Assembling the puzzle. *Front Neural Circuits* 10(APR).

131. Freedman JE, Aghajanian GK (1985). Opiate and α 2-adrenoceptor responses of rat amygdaloid neurons: Co-localization and interactions during withdrawal. *J Neurosci* 5(11): 3016-3024.
132. Simson PE, Naylor JC, Gibson B, Schneider AM, Levin D (2001). Dose-sensitive excitation and inhibition of spontaneous amygdala activity by propranolol. *Pharmacol Biochem Behav* 69(1-2): 85-92.
133. Buffalari DM, Grace AA (2007). Noradrenergic modulation of basolateral amygdala neuronal activity: Opposing influences of α -2 and β receptor activation. *J Neurosci* 27(45): 12358-12366.
134. Chen FJ, Sara SJ (2007). Locus coeruleus activation by foot shock or electrical stimulation inhibits amygdala neurons. *Neuroscience* 144(2): 472-481.
135. Koob GF (1999). Corticotropin-releasing factor, norepinephrine, and stress. *Biol Psychiatry* 46(9): 1167-1180.
136. Pavcovich LA, Valentino RJ (1997). Regulation of a putative neurotransmitter effect of corticotropin-releasing factor: Effects of adrenalectomy. *J Neurosci* 17(1): 401-408.
137. Pacak K, Palkovits M, Kvethansky R, Fukuhar K, Armando I, Kopin IJ, Goldstein DS (1993). Effects of single or repeated immobilization on release of norepinephrine and its metabolites in the central nucleus of the amygdala in conscious rats. *Neuroendocrinology* 57(4): 626-633.
138. Hatfield T, Spanis C, McGaugh JL (1999). Response of amygdalar norepinephrine to footshock and GABAergic drugs using in vivo microdialysis and HPLC. *Brain Res* 835(2): 340-345.
139. Galvez R, Mesches MH, McGaugh JL (1996). Norepinephrine release in the amygdala in response to footshock stimulation. *Neurobiol Learn Mem* 66(3): 253-257.
140. Williams CL, Men D, Clayton EC, Gold PE (1998). Norepinephrine release in the amygdala after systemic injection of epinephrine or escapable footshock: Contribution of the nucleus of the solitary tract. *Behav Neurosci* 112(6): 1414-1422.

141. Taneja M, Salim S, Saha K, Happe HK, Qutna N, Petty F, Bylund DB, Eikenburg DC (2011). Differential effects of inescapable stress on locus coeruleus GRK3, alpha2-adrenoceptor and CRF1 receptor levels in learned helpless and non-helpless rats: A potential link to stress resilience. *Behav Brain Res* 221(1): 25-33.
142. Nukina I, Glavin GB, LaBella FS (1987). Acute cold-restraint stress affects α 2-adrenoceptors in specific brain regions of the rat. *Brain Res* 401(1): 30-33.
143. Pruessner JC, Champagne F, Meaney MJ, Dagher A (2004). Dopamine release in response to a psychological stress in humans and its relationship to early life maternal care: a positron emission tomography study using [11C]raclopride. *J Neurosci* 24(11): 2825-31.
144. Chen X, Shu X, Cong ZK, Jiang ZY, Jiang H (2015). Nesfatin-1 acts on the dopaminergic reward pathway to inhibit food intake. *Neuropeptides* 53: 45-50.
145. Rougé-Pont F, Piazza PV, Kharouby M, Le Moal M, Simon H (1993). Higher and longer stress-induced increase in dopamine concentrations in the nucleus accumbens of animals predisposed to amphetamine self-administration. A microdialysis study. *Brain Res* 602(1): 169-174.
146. Piazza PV, Rougé-Pont F, Deroche V, Maccari S, Simon H, Le Moal M (1996). Glucocorticoids have state-dependent stimulant effects on the mesencephalic dopaminergic transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(16): 8716-8720.
147. Rougé-Pont F, Deroche V, Le Moal M, Piazza PV (1998). Individual differences in stress-induced dopamine release in the nucleus accumbens are influenced by corticosterone. *Eur J Neurosci* 10(12): 3903-3907.
148. Marinelli M, Piazza PV (2002). Interaction between glucocorticoid hormones, stress and psychostimulant drugs. *Eur J Neurosci* 16(3): 387-394.
149. Kawakami N, Otubo A, Maejima S, Talukder AH, Satoh K, Oti T, Takanami K, Ueda Y, Itoi K, Morris JF, Sakamoto T, Sakamoto H (2021). Variation of pro-vasopressin processing in parvocellular and magnocellular neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus: Evidence from the vasopressin-related glycopeptide copeptin. *J Comp Neurol* 529(7): 1372-1390.

150. Tribollet E, Dubois-Dauphin M, Dreifuss JJ, Barberis C, Jard S (1992). Oxytocin receptors in the central nervous system. Distribution, development, and species differences. *Ann N Y Acad Sci* 652(1): 29-38.
151. Ross HE, Freeman SM, Spiegel LL, Ren X, Terwilliger EF, Young LJ (2009). Variation in oxytocin receptor density in the nucleus accumbens has differential effects on affiliative behaviors in monogamous and polygamous voles. *J Neurosci* 29(5): 1312-1318.
152. Uvnäs-Moberg K, Ahlenius S, Hillegaart V, Alster P (1994). High doses of oxytocin cause sedation and low doses cause an anxiolytic-like effect in male rats. *Pharmacol Biochem Behav* 49(1): 101-106.
153. De Oliveira DCG, Zuardi AW, Graeff FG, Queiroz RHC, Crippa JAS (2012). Anxiolytic-like effect of oxytocin in the simulated public speaking test. *J Psychopharmacol* 26(4): 497-505.
154. Myers B, McKlveen JM, Herman JP (2014). Glucocorticoid actions on synapses, circuits, and behavior: Implications for the energetics of stress. *Front Neuroendocrinol* 35(2): 180-196.
155. Neumann ID, Landgraf R (2012). Balance of brain oxytocin and vasopressin: Implications for anxiety, depression, and social behaviors. *Trends Neurosci* 35(11): 649-659.
156. Amini-Khoei H, Mohammadi-Asl A, Amiri S, Hosseini MJ, Momeny M, Hassanipour M, Rastegar M, Haj-Mirzaian A, Mirzaian AH, Sanjarimoghaddam H, Mehr SE, Dehpour AR (2017). Oxytocin mitigated the depressive-like behaviors of maternal separation stress through modulating mitochondrial function and neuroinflammation. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 76: 169-178.
157. Frasch A, Zetsche T, Steiger A, Jirikowski GF (1996). Reduction of plasma oxytocin levels in patients suffering from major depression. *Adv Exp Med Biol* 395: 257-258.
158. Yoshida M, Takayanagi Y, Inoue K, Kimura T, Young LJ, Onaka T, Nishimori K (2009). Evidence that oxytocin exerts anxiolytic effects via oxytocin receptor expressed in serotonergic neurons in mice. *J Neurosci* 29(7): 2259-2271.

159. Olson BR, Drutarosky MD, Chow MS, Hruby VJ, Stricker EM, Verbalis JG (1991). Oxytocin and an oxytocin agonist administered centrally decrease food intake in rats. *Peptides* 12(1): 113-118.
160. Morton GJ, Thatcher BS, Reidelberger RD, Ogimoto K, Wolden-Hanson T, Baskin DG, Schwartz MW, Blevins JE (2012). Peripheral oxytocin suppresses food intake and causes weight loss in diet-induced obese rats. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* 302(1): E134-E144.
161. Saito R, Sonoda S, Ueno H, Motojima Y, Yoshimura M, Maruyama T, Hashimoto H, Tanaka K, Yamamoto Y, Kusuhara K, Ueta Y (2017). Involvement of central nesfatin-1 neurons on oxytocin-induced feeding suppression in rats. *Neurosci Lett* 655: 54-60.
162. Yosten GLC, Samson WK (2010). The anorexigenic and hypertensive effects of nesfatin-1 are reversed by pretreatment with an oxytocin receptor antagonist. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* 298(6): R1642-R1647.



EKLER

Ek 1. Etik Kurul Karar Formu 1



T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
KTÜ HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI

Sayı : 53488718 - 491
Konu: Onay Belgesi

04.07.2019

Sayın; Dr. Öğr. Üyesi Zafer ŞAHİN
Fizyoloji ABD. Öğretim Üyesi

“Santral ve Periferik Uygulanan Nesfatin-1 ve Kisspeptinin Amigdala ve Hipotalamo-hipofizer Adrenal Aksa Etkilerinin Araştırılması” başlık ve 2019/35 protokol numaralı çalışma önerisi Kurulumuzca incelenmiş olup; yürürlükteki etik ilke ve kurallara uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinize ve gereğini rica ederim.

Ek 2. Etik Kurul Karar Formu 2

	T.C. KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ DENEY HAYVANLARI YEREL ETİK KURULU
Sayı: 53488718- Konu:	715 24.09.2021
 Sayın; Doç. Dr. Zafer ŞAHİN Fizyoloji ABD Öğretim Üyesi,	
Yürütücülüğünüzde gerçekleşmekte olan “Santral ve Periferik Uygulanan Nesfatin-1 ve Kisspeptinin Amigdala ve Hipotalamo-hipofizer Adrenal Aksa Etkilerinin Araştırılması” başlıklı 2019/35 protokol numarasıyla daha önce onay almış olan çalışmanız ile ilgili Etik Kurul’a sunmuş olduğunuz 10.06.2021 tarihli dilekçede yer alan; Projede yapmayı planladığınız iki kez analiz yapılması talebiniz KTÜ Hayvan Deneyleri Etik Kurul’un 21 Eylül 2021 tarihli toplantısında görüşülerek; toplantıya katılan üyelerin oy birliği ile uygun bulunmuştur. Bilgilerinize ve gereğini rica ederim.	

Ek 3. Figürlerin Kullanım İzni

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Dec 08, 2024

This Agreement between Osman AKTAŞ / Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	5924370219798
License date	Dec 08, 2024
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Elsevier Books
Licensed Content Title	Handbook of Behavioral Neuroscience
Licensed Content Author	Nicole C. Ferrara,Jaime E. Vantrease,Maxine K. Loh,Jolee A. Rosenkranz,J. Amiel Rosenkranz
Licensed Content Date	Jan 1, 2020
Licensed Content Volume	26
Licensed Content Issue	n/a
Licensed Content Pages	34
Start Page	241
End Page	274
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	4
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier chapter?	No
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of translations	1
Title of new work	İntraserebroventriküler Uygulanan Nesfatin-1'in Amigdala ve Hipotalamo Hipofizer Adrenal Aksa Etkilerinin Araştırılması
Institution name	Karadeniz Technical University Graduate School of Health Sciences
Expected presentation date	Jan 2025
Portions	FIG. 1,2,3,4
The Requesting Person / Organization to Appear on the License	Osman AKTAŞ / Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Specific Languages	Turkish
Requestor Location	Mr. Osman AKTAŞ Üniversite Mah. Farabi Cad. No:47 KTU Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Binası Fizyoloji Anabilim Dalı Trabzon, 61000 Turkey
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Customer Tax ID	TR5900378254
Billing Type	Invoice
Billing Address	KTU Üniversite Mah. Farabi Cad. No:47 KTU Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Binası Fizyoloji Anabilim Dalı Trabzon, Turkey 61000

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı : AKTAŞ, Osman
Uyruğu :
Doğum Tarihi ve Yeri :
Telefon (İş) :
E-Posta :
Yazışma Adresi (İş) :

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi	2015
Lise	Trabzon Yomra Fen Lisesi	2006

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl -Yıl)
1. Pratisyen Hekim	Tirebolu İlçe Devlet Hastanesi	2015 - 2015
2. Araştırma Görevlisi Dr.	Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	2015 -

YABANCI DİL

İngilizce

UZMANLIK ALANI

Fizyoloji

YAYINLAR

SCI, SSCI ve AHCI İndekslerine Giren Dergilerde Yayınlanan Makaleler

1. Sahin Z, **Aktas O**, Kalkan OF, Cuce G, Alver A, Sahin E, Erdem S, Saglam N, Solak Gormus ZI, Kutlu S (2024). Intracerebroventricular injection of kisspeptin in male rats activates hypothalamo-pituitary-gonadal axis, but not hypothalamo-pituitary-adrenal axis. J Recept Signal Transduct 44(1): 19-26.
2. Sahin Z, **Aktas O**, Kalkan OF, Cuce G, Alver A, Sahin E, Erdem S, Saglam N, Solak Gormus ZI, Kutlu S (2024). Investigation of effect peripheral kisspeptin treatment on hypothalamo-pituitary-gonadal axis and hypothalamo-pituitary-adrenal axis in male rats. Biol Futur 75(4): 477-486.
3. Kalkan ÖF, Şahin Z, **Aktaş O**, Yildirim A, Aydın Abidin S, Özyaşar AF, Uzun İ, Abidin İ (2025). Central administration of p234, kisspeptin antagonist, but not kisspeptin-10, reduces the power of epileptiform activity and slow EEG waves in male rats. Neurol Res 47(2): 139-146.
4. Kalkan ÖF, **Aktaş O**, Şahin Z, Abidin SA, Yildirim A, Özyaşar AF, Abidin İÜİ (2024). Peripheral nesfatin-1 reduces basal brain activity but has limited effect on epilepsy-like conditions. Gen Physiol Biophys 43(05): 457-467.
5. Kalkan ÖF, **Aktaş O**, Sürmeneli YE, Alver A, Özcan M, Şahin Z (2023). Does irisin has neuroprotective effect against diabetes induced neuropathy in male rats? Arch Physiol Biochem 129(2): 439-448.
6. Şentürk F, Bahadır O, **Aktaş O**, Bıyık AF, Ercan E (2022). Effects of titanium prepared platelet rich fibrin on facial nerve regeneration: an experimental study. Braz J Otorhinolaryngol 88(6): 867-874.
7. Kalkan ÖF, Sürmeneli YE, **Aktaş O**, Yücel BP, Ayar A (2017). Eight-weeks of treadmill exercise ameliorates neuropathic pain in diabetic rats. Acta Physiol 221: 194-196.

Diğer Dergilerde Yayınlanan Makaleler

8. Kalkan ÖF, Şahin Z, **Aktaş O**, Yildirim A, Aydın Abidin S, Özyaşar AF, Uzun İ, Abidin İ (2024). Santral Aların Enjeksiyonunun Erkek Sıçanlarda Toplam Elektroensefalografi (EEG) VE EEG Bantlarına Etkisi: In vivo Elektrofizyolojik Çalışma. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilim Tıp Derg 38(3): 241-246.

9. Şahin Z, Kalkan ÖF, **Aktaş O**, Kalkan A (2023). Circadian Rhythm, Hypothalamo-Pituitary Adrenal Axis, and Immunity: Physiological and Pathological Examples. Akdeniz Med J 9(3): 331-341.
10. Şahin Z, Kalkan ÖF, **Aktaş O**, Kalkan A (2022). Global climate change and accompanying covid-19 pandemic: A physiological perspective by avicenna from 1000 years ago to the present. Türk Bilim Derlemeler Derg 2(2): 79-88.
11. Şahin Z, Kalkan ÖF, **Aktaş O** (2022). How Does the Circadian Rhythm Function in Blind People Who Have No Light Perception? Hippocrates Med J 2(2): 35-43.
12. Şahin Z, Kalkan ÖF, **Aktaş O** (2022). Gülmenin fizyolojisi: Beyin lezyonlarından gülme ile ilişkili yapıları anlama. Sağlık ve Yaşam Bilim Derg 4(2): 242-251.
13. Şentürk F, Bahadır O, Ayar A, Yenilmez E, **Aktaş O**, Bıyık AF, Ercan E (2019). Evaluation of the effects of platelet-rich fibrin prepared in titanium tube on regeneration in acute damage of the facial nerve in rabbits. Türk Otolarengoloji Arşivi 57: 2.

Bildiriler

14. Şentürk F, Bahadır O, Ayar A, Yenilmez E, **Aktaş O**, Bıyık AF, Ercan E (2019). Tavşanlarda fasiyal sinirin akut hasarında titanyum tüpte hazırlanan trombosit zengin fibrinin rejenerasyona olan etkilerinin değerlendirilmesi. . 41 Türk Ulus Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Kongresi, Antalya, Türkiye, 13 - 17 Kasım 2019 .
15. Kalkan ÖF, Sürmeneli YE, **Aktaş O**, Yücel BP, Ayar A (2017). Eight-weeks of treadmill exercise ameliorates neuropathic pain in diabetic rats. FEPS 2017 (joint Meet Fed Eur Physiol Soc Austrian Physiol Soc Vienna, Avusturya, 12 - 15 Eylül 2017, cilt221, sa713, ss194-196 .