



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İNTRASEREBROVENTRİKÜLER NESFATİN-1
ENJEKSİYONUN ERKEK SIÇANLARDA
GHRELİN VE LEPTİN DÜZEYLERİNE ETKİSİ**

FATMANUR ÖZTÜRK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Dr. Öğr. Üyesi Ömer Faruk KALKAN

TRABZON-2023

İthaf

Bu yüksek lisans tezimi, benim bu günlere gelmem için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve her zaman yanımda olan canım aileme ithaf ediyorum.



İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK SAYFASI

ONAY

BEYAN

İTHAF

TEŞEKKÜR

İÇİNDEKİLER

vi

ŞEKİLLER DİZİNİ

ix

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

x

ÖZET

xii

ABSTRACT

xiv

1. GİRİŞ ve AMAÇ

1

2. GENEL BİLGİLER

3

2.1. Açlığın Santral Kontrolü

3

2.2. Açlığın Periferik Kontrolü

4

2.3. Açlık ve Tokluk Üzerinde Yer Alan Moleküller

6

2.3.1. Asprosin

7

2.3.1.1. Asprosin Salınımı

7

2.3.1.2. Asprosin Fonksiyonları ve Etki Mekanizması

7

2.3.2. Oreksin A/B

8

2.3.2.1. Oreksin Reseptörleri

8

2.3.2.2. Oreksin A/B'nin Fizyolojik Etkileri

9

2.3.3. Leptin

9

2.3.3.1. Leptin Sekresyonu ve Düzenlenmesi

10

2.3.3.2. Leptin'in Fonksiyonları

11

2.3.3.3. Leptin Reseptörleri

11

2.3.3.4. Leptinin Etki Mekanizması

11

2.3.4. Ghrelin

12

2.3.4.1. Ghrelin Salınımı

13

2.3.4.2. Ghrelin'in Fonksiyonları

13

2.3.4.3. Ghrelin'in Etki Mekanizması

14

2.3.4. Nesfatin-1	14
2.3.4.1. Nesfatin-1'in Biyokimyasal Yapısı	14
2.3.4.2. Nesfatin-1'in Salgı Alanları	15
2.3.4.3. Nesfatin-1'in Genel Fizyolojik Etkileri ve Etki Mekanizmaları	15
3. GEREÇ ve YÖNTEM	18
3.1. Araştırmanın Yapıldığı Merkez	18
3.2. Gruplardaki Hayvan Sayılarının Belirlenmesi ve Hayvanların Temini	18
3.3. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler	18
3.3.1. Reseptör Antagonistleri	18
3.3.1.1. Kortikotropin Salgılatıcı Hormon ve Reseptör Antagonistleri Astressin 2B ve Antalarmin HCI	18
3.3.1.2. Oksitosin ve Reseptör Antagonisti Atosiban	19
3.3.1.3. Kisspeptin ve Reseptör Antagonisti Peptid 234	19
3.4. Deney Gruplarının Oluşturulması	19
3.5. Erişkin Erkek Hayvanların Seçimi ve Deney Gruplarında Yapılacak Uygulamalar	21
3.6. Serum Eldesi	21
3.7. Serum Analizleri	22
3.7.1. ELISA Kitleri	22
3.7.1.2. Sandwich ELISA	22
3.7.2. Serum Asprosin Ölçümü	23
3.7.3. Serum Orexin A Ölçümü	24
3.7.4. Serum Ghrelin Ölçümü	24
3.7.5. Serum Leptin Ölçümü	24
3.8. İstatistiksel analizler	25
4. BULGULAR	26
4.1. Biyokimyasal Analiz Sonuçları	26
4.1.1. Serum Asprosin Seviyeleri	26
4.1.2. Serum Orexin A Seviyeleri	27
4.2. Serum Ghrelin Seviyeleri	28
4.1.4. Serum Leptin Seviyeleri	29
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	30

6. KAYNAKLAR	35
EKLER	45
EK 1. Ghrelin standart grafiđi	46
EK 2. Orexin A standart grafiđi	47
EK 3. Leptin standart grafiđi	48
EK 4. Asprosin standart grafiđi	49
EK 5. Etik kurul onayı	50
	51



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.	Enerji dengesinin arkuat çekirdekteki iki nöron tipiyle denetlenmesi	4
Şekil 2.	Beslenmenin kontrolü ile ilgili geribildirim mekanizmaları	6
Şekil 3.	Nesfatin-1'in öncüsü olarak NUCB2 proteininin birincil yapısı	15
Şekil 4.	Tüm gruplarda serum asprosin seviyesi ölçüm değerleri	26
Şekil 5.	Tüm gruplarda serum orexin A seviyesi ölçüm değerleri	27
Şekil 6.	Tüm gruplarda serum ghrelin seviyesi ölçüm değerleri	28
Şekil 7.	Tüm gruplarda serum leptin seviyesi ölçüm değerleri	29

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

ACTH	Adrenokortikotropik hormon
AgRP	Aguti-iliskili protein
α-MSH	α -melanosit-uyarıcı hormon
ARC	Arkuat Nükleus
BOS	Beyin omurilik sıvısı
cAMP	Siklik adenzin monofosfat
CART	Kokain ve amfetamin düzenleyici transkript
CCK	Kolesistokinin
CRH₁	Kortikotropin salgılatıcı hormon 1
CRH₂	Kortikotropin salgılatıcı hormon 2
DMN	Dorsomedial nükleus
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ERK	Ekstraselüler sinyal regüle kinaz
ERK1/2	Ekstraselüler sinyal regüle kinaz 1, 2
FBN1	Fibrillin 1
GABA	Gama aminobütirik asit
GHS-R	Büyüme hormonu salgılatırıcı reseptör
GLP-1	Glucagon-like peptide-1 amide
GnRH	Gonadotropin-salgılatıcı hormon
GPR54	G protein-bağı reseptör 54
HPA	Hipotalamik-hipofizer-adrenal
I.c.v	İntraserebroventriküler
I.p	İntraperitoneal
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
JAK/STAT	Janus kinaz/sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü
K_{ATP}	ATP'ye duyarlı potasyum kanalları
LC	Lokus seruleus
LHA	Lateral hipotalamik alan
MC4R	Melanokortin 4 reseptör
MSH	Melanosit salgılatıcı hormo
NPS	Neonatal progeroid sendromu

NPY	Nöropeptid Y
NTS	Nükleus traktus solitarius
NUCB2	Nükleobindin 2
OB-Rb	Leptin reseptörü uzun formu
OLFR734	Olfaktör reseptör 734
OX1R	Oreksin reseptör 1
OX2R	Oreksin reseptör 2
PKA	Protein kinaz A
POMC	Proopiomelanokortin
PVN	Paraventriküler nükleus
P234	Peptid 234
STAT3	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 3 aktivatörü
TRH	Tirotropin salgılatıcı hormon
VMN	Ventromedial nükleus
Simgeler	
mm	Milimetre
ng	Nanogram
pmol	Pikomol
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
Formüller	
NaOH	Sodyum hidroksit
HCl	Hidroklorik asit
H₂SO₄	Sülfürik asit

ÖZET

İntraserebroventriküler Nesfatin-1 Enjeksiyonun Erkek Sıçanlarda Ghrelin ve Leptin Düzeylerine Etkisi

Yeni keşfedilen bir nöropeptid olan nesfatin-1 hipotalamik alanlarda üretilen anoreksijenik bir peptiddir. Bu peptidin anoreksijenik etkisinde stres yanıtı ve hipotalamo-hipofizer-adrenal (HHA) aks aktivasyonu da önemli paya sahiptir.

Leptin yağ dokusundan üretilen ve dolaşıma katılan anoreksijenik bir peptiddir. Ghrelin ise gastrointestinal sistem tarafında üretilen oreksijenik bir nöropeptiddir. Asprosin yakın zamanda keşfedilen açlık durumunda salınımı artan ve hepatik glikoz üretimini artıran bir peptiddir. Oreksin A/B dorsal hipotalamik alan ve lateral hipotalamik alan (LHA)'da tanımlanmıştır. Bununla birlikte nesfatin-1'in bu reseptörlerle sinyalleşmesinin ghrelin, leptin, asprosin ve oreksin A düzeylerine etkisi bilinmemektedir. Bu sebeple, nesfatin-1'in CRH₁, CRH₂, oksitosin ve kisspeptin reseptör antagonistleri ile etkileşiminin ghrelin, leptin, asprosin ve oreksin A düzeylerine etkisinin belirlenmesi önem arz etmektedir.

Sham (kontrol) grubu, nesfatin-1 grubu, nesfatin-1 + p234 grubu, nesfatin-1+ antalarmin HCI grubu, nesfatin-1 + astressin 2B grubu, nesfatin-1 + atosiban grubu olmak üzere toplam altı grup bulunmaktadır. Her grupta 5'er hayvan bulunmaktadır. Deneysel uygulama sonrasında, hayvanlar sakrifiye edilerek serum ghrelin, leptin, asprosin ve oreksin A düzeyleri ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) ile ölçülmüştür.

Serum asprosin seviyeleri istatistiksel olarak herhangi bir farklılık göstermemiştir. Nesfatin-1+p234, nesfatin-1+antalarmin HCI, nesfatin-1+astressin 2B ($p<0,001$) ve nesfatin-1+atosiban ($p<0,01$) grubunda serum oreksin A seviyeleri düşük bulunmuştur. Nesfatin-1+p234 grubu serum ghrelin seviyesi düşük bulunmuştur ($p<0,05$). Nesfatin-1+p234 grubu serum leptin seviyesi yüksek bulunmuştur ($p<0,01$).

Sonuç olarak çalışmamızda nesfatin-1 serum ghrelin ve oreksin A seviyesini azaltmıştır serum leptin düzeyini ise artırmıştır. Serum asprosin seviyesine etki etmemiştir. Bu sonuçlar nesfatin-1'in açlık tokluk sürecinde rol alan peptidleri etkileyebileceğini göstermiştir.

Anahtar Sözcükler: Ghrelin, Kortikotropin Salgılatıcı Hormon, Leptin, Nesfatin-1, Oksitosin

ABSTRACT

Effect of Intracerebroventricular Nesfatin-1 Injection on Ghrelin and Leptin Levels in Male Rats

Nesfatin-1, a newly discovered neuropeptide, is an anorexigenic peptide produced in the hypothalamic areas. Stress response and hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis activation also play an important role in the anorexigenic effect of this peptide.

Leptin is an anorexigenic peptide produced from adipose tissue and join to the circulation. Ghrelin is an orexigenic neuropeptide produced by the gastrointestinal tract. Asprosin is a recently discovered peptide that is released during fasting and increases hepatic glucose production. Orexin A/B has been identified in the dorsal hypothalamic area and LHA. However, the effect of nesfatin-1 signaling with these receptors on ghrelin, leptin, asprosin and orexin A levels is unknown. For this reason, it is important to determine the effect of nesfatin-1's interaction with CRH₁, CRH₂, oxytocin and kisspeptin receptor antagonists on ghrelin, leptin, asprosin and orexin A level.

There are six groups in total: sham (control) group, nesfatin-1 group, nesfatin-1 + p234 group, nesfatin-1 + antalarmin HCl group, nesfatin-1 + astressin2B group, nesfatin-1 + atosiban group. Each group has 5 animals. After the experimental application, the animals were sacrificed and serum ghrelin, leptin, asprosin and orexin A levels were measured by ELISA.

Serum asprosin levels did not differ statistically. Serum orexin A levels were found to be low in nesfatin-1+p234, nesfatin-1+antalarmin HCl, nesfatin-1+astressin 2B ($p<0.001$) and nesfatin-1+atosiban ($p<0.01$) groups. Nesfatin 1+p234 group had low serum ghrelin level ($p<0.05$). Nesfatin-1+ p234 group had high serum leptin level ($p<0.01$).

In conclusion, in our study, nesfatin-1 decreased serum ghrelin and orexin A levels and increased serum leptin levels. It did not affect the serum asprosin level. These results showed that nesfatin-1 can affect the peptides involved in the fasting and satiety process.

Keywords: Ghrelin, Corticotropin Releasing Hormone, Leptin, Nesfatin-1, Oxytocine

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nesfatin-1 ilk kez 2006 yılında Oh-I ve arkadaşları tarafından hipotalamik nükleuslarda keşfedilmiştir (1). Nesfatin-1, DNA bağlayıcı protein olan nükleobindin 2'den (NUCB2) türetilen 82 amino asitli bir polipeptiddir. NUCB2 hipotalamik alanlarda yani arkuat nükleus (ARC), paraventriküler nükleus (PVN), supraoptik nükleus, lateral hipotalamik alan (LHA) beslenmeyi düzenleyen zona incerta ve ayrıca nükleus traktus solitariusta (NTS) ifade edilmektedir. Nesfatin-1 periferik olarak ise mide, pankreas ve testislerden salgılanır. Yapılan çalışmalar merkezi ve periferik nesfatin-1 enjeksiyonun gıda alımını azalttığı gösterilmiştir (2). Bu sonuçlar, nesfatin-1'in enerji dengesinin düzenlenmesinde negatif etkili bir molekül olduğuna işaret etmektedir.

Nesfatin-1'in reseptörü henüz keşfedilmemiştir fakat yapılan bir çalışmada nesfatin-1'in henüz tanımlanmamış G protein bağlı reseptör ile etkileşime girerek hipotalamik nöronlarda Ca^{2+} akışını artırarak sinyal iletimini gerçekleştirdiği bulunmuştur (3). Ayrıca nesfatin-1 ARC'deki nöropeptid Y (NPY) nöronlarını inhibe ederek beslenme davranışı üzerinde anoreksijenik bir etki gösterir (4). Yapılan diğer çalışmalarda ise nesfatin-1'in anoreksijenik etkisini oksitosin ve kortikotropin salgılatıcı hormon 2 (CRH₂) reseptörü ile gösterebileceği öne sürülmüştür (5-7).

Nesfatin-1'in beslenme davranışı üzerine olan etkisinden başka birçok fizyolojik etkisi vardır. Bunların başında stres, depresyon ve korku davranışı üzerinde artırıcı etkisidir (8, 9). Bu etkilerinin dışında mide fonksiyonları ve kardiyovasküler sistem üzerine düzenleyici etkileri vardır (10-12)

Leptin Zhang ve arkadaşları tarafından 1994 yılında keşfedilmiştir. Protein yapısında anoreksijenik bir peptiddir ve 167 aminoasit içermektedir. (13). Leptin anoreksijenik etkisini ARC başta olmak üzere hipotalamus üzerinden gösterir (14).

Oreksijenik peptidlerden olan ve gastrointestinal sistem tarafından üretilen ghrelin merkezi etki ile beslenme davranışı ve vücut ağırlığı düzenler. Ghrelin, 28 aminoasitlik peptiddir (15).

Diğer oreksijenik peptidlerden olan asprosin yakın zamanda keşfedilen açlık durumunda artan ve hepatik glikoz üretimini artıran bir peptiddir (16). Yine oreksijenik peptidlerden olan oreksin ise 1988 yılında iki bağımsız araştırmacı grup tarafından dorsal

hipotalamik alan ve LHA'da tanımlamıştır. Oreksin A ve B 130 aminoasitli öncü bir polipeptid olan preproreksinden üretilmektedir (17).

Nesfatin-1'in anoreksijenik etkisi iyi bilinmektedir. Bu peptidin anoreksijenik etkisinde stres yanıtı ve hipotalamik-hipofizer-adrenal (HPA) aks aktivasyonu da önemli paya sahiptir. Stres yanıtının düzenlenmesinde, nesfatin-1'e bağlı etkilerde CRH₁ ve CRH₂ reseptörlerinin yanı sıra oksitosin reseptörü de rol almaktadır (5-7). Bununla birlikte nesfatin-1'in bu reseptörlerle sinyalleşmesinin ghrelin, leptin, oreksin A ve asprosin düzeylerine etkisi bilinmemektedir. Bu sebeple, nesfatin-1'in CRH₁, CRH₂ ve oksitosin reseptör antagonistleri ile etkileşiminin serum ghrelin, leptin, asprosin ve oreksin düzeylerine etkisinin belirlenmesi önem arz etmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

Açlık hissi huzursuzluk ve midedeki ritmik kasılmalar gibi fizyolojik etkiler ile ilişkilidir. Açlık hissi kişiyi uygun bir besin kaynağı aramaya yöneltir (18). Açlık, beslenme olayını başlatan besin arama ve tüketme motivasyonu olarak tanımlanır (19). İştah, belirli tipte bir yiyeceğe karşı olan isteği belirtir ve yiyeceğin niteliğini seçerken kişiye yardım eder. Yiyecek isteğinin karşılanması ardından tokluk duygusu oluşur. Bu açlık ve tokluk duyguları çevresel ve kültürel faktörler tarafından etkilenirler. Açlık ve tokluk duyguları beyin ve özellikle hipotalamustaki açlık ve tokluğa özgü merkezler tarafından kontrol edilir.

2.1. Açlığın Santral Kontrolü

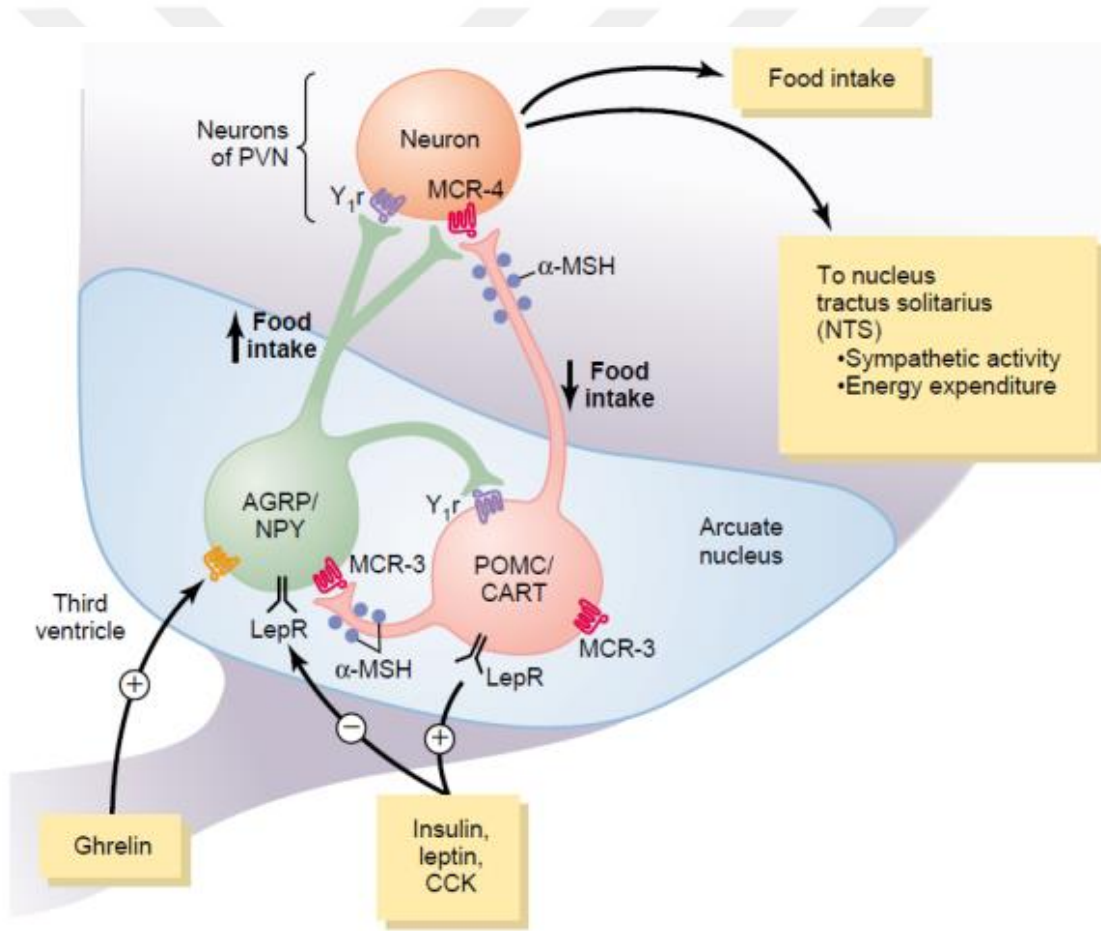
Açlık ve tokluk hissi hipotalamus ve beyindeki açlık ve tokluk merkezleri tarafından kontrol edilir (18). Anahtar hipotalamik bölgeler; ARC, PVN, dorsomedial nükleus (DMN), LHA ve ventromedial nükleus (VMN)'tur (19). Hipotalamusun lateral nükleusu 'açlık merkezi' olarak görev yaparken hipotalamusun ventromedial nükleusu 'tokluk merkezi' olarak görev yapar (18). Paraventriküler nükleus lezyonları çoğunlukla aşırı yemeye neden olurken, dorsomedial nükleustaki lezyonla sıklıkla yeme davranışını baskılar. ARC, yağ dokusundan ve sindirim sisteminden salgılanan çok sayıda hormonun enerji harcamasını ve besin alımını düzenlemek için etkilerinin birleştiği hipotalamus bölgesidir (18). Ayrıca ARC; PVN, VMN, DMN ve LHA dahil olmak üzere diğer hipotalamik iştah düzenleyici bölgelerle karşılıklı bağlantılara sahiptir (19).

Ayrıca hipotalamus mide-bağırsak kanalından gelen duyuşal bilgileri, gastrointestinal hormonlardan gelen sinyalleri, kandaki tokluk hissi sağlayan besin maddeleri ile ilgili kimyasal sinyalleri, beslenme davranışında etkili olan serebral korteks kaynaklı sinyalleri, yağ dokusundan serbestlenen hormonlardan gelen sinyalleri de alır.

ARC'de enerji tüketimi ve iştahı kontrol eden iki tip sinir hücresi bulunur. Bu sinir hücrelerinde birisi proopiomelanokortin (POMC)'dir. POMC, α -melanosit-uyarıcı hormon (α -MSH) ve kokain ve amfetamin düzenleyici transkript (CART) üretir. Bir diğeri ise oreksijenik maddeler olan NPY ve aguti-ilişkili protein (AgRP) üretimini sağlayan nöronlardır. POMC nöronlarının uyarılması enerji tüketimini artırırken yiyecek alımını azaltır. NPY-AgRP nöronları uyarıldığı zaman ise enerji tüketimi azalırken yiyecek alımı artar.

POMC nöronlarından α -MSH salındığı zaman paraventiküler nükleustaki melanokortin reseptörlerini uyarır. Bu uyarma sempatik aktivitede ve enerji harcanmasında artışa neden olur. Bu nöronlar arasında önemli derecede etkileşim vardır. Bu nöronlar insülin, leptin, kolesistokinin (CCK) ve ghrelin gibi iştahı düzenlemede etkili olan peptidlerin etkilerini göstermeleri için başlıca hedeflerdir (18).

İnsülin, CCK, AgRP-NPY nöronlarını baskılar ve komşu POMC-CART nöronlarını uyarır. Bunun sonucu olarak besin alımı azalır. Ghrelin ise AgRP-NPY nöronlarını uyarak besin alımını arttıran bir peptiddir.



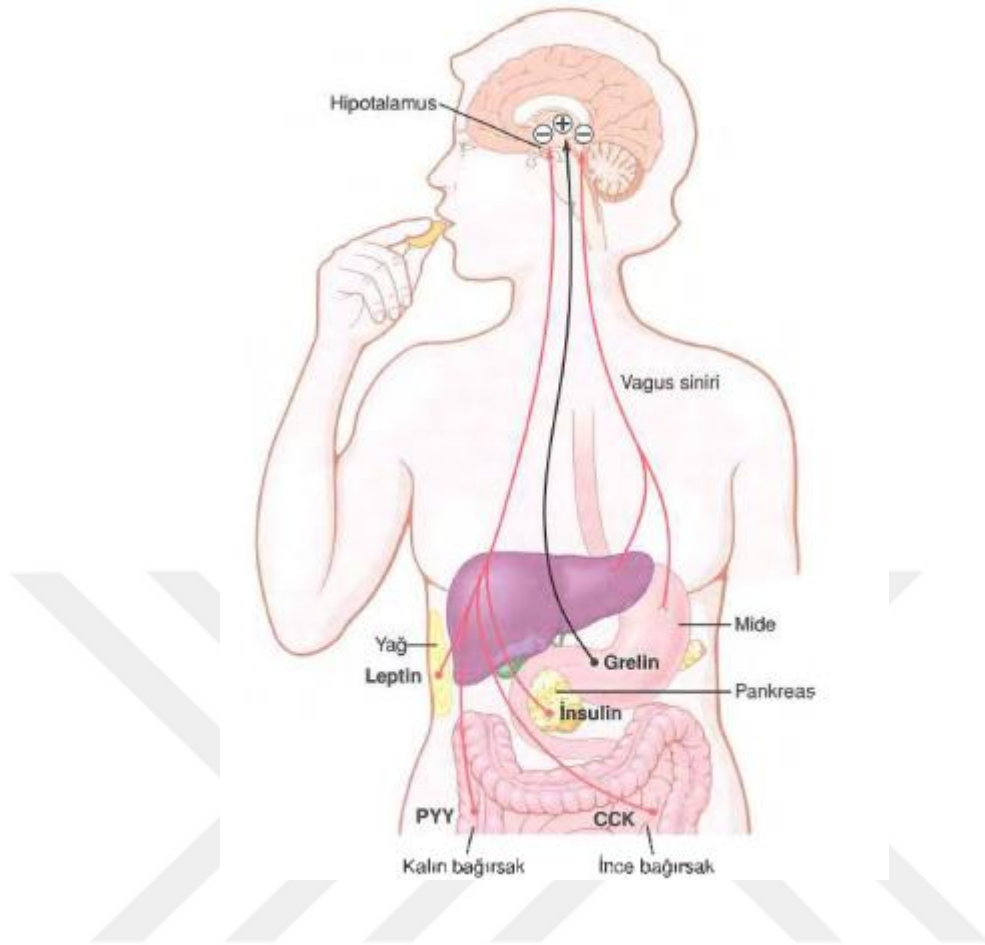
Şekil 1. Enerji dengesinin arkuat çekirdekteki iki nöron tipiyle denetlenmesi (Guyton ve Hall'dan, 18).

2.2. Açlığın Periferal Kontrolü

Mide-bağırsak kanalı, özellikle de duodenum ve mide gerildiği zaman, beslenme merkezini geçici olarak baskılamak amacıyla baskılayıcı gerilme sinyalleri öncelikli olarak vagus siniri yoluyla taşınır ve bunun sonucu olarak yeme isteği azalır. Ayrıca gastrointestinal hormonlar da beslenmeyi baskılama da etkilidir. CCK, duodenumda bölgesel duyuşal sinirlerdeki reseptörleri etkinleştirir ve beyine vagus siniri yoluyla sinyal göndererek doyma hissine ve yemeyi bırakmaya katkıda bulunur. CCK beslenme üzerinde kısa süreli bir etkiye sahiptir.

Ghrelin ise başlıca midenin oksintik hücrelerinden salgılanan bir peptiddir. Kandaki ghrelin düzeyi açlık durumunda yükselirken yemekten hemen önce en üst düzeye ulaşması ve besin alımını takiben hızla düşüş göstermesi beslenmeyi uyarmada olası bir rolü olduğunu gösterir.

Yağ dokusu miktarı arttığında, yağ hücreleri leptin üretimini artırır ve kana salınan leptin beyine ulaşır. Kan-beyin bariyerini kolaylaştırılmış difüzyonla geçtikten sonra hipotalamusta bulunan ARC ve PVN'nin POMC nöronlarında bulunan leptin reseptörlerine bağlanır. Hipotalamusta bulunan NPY ve AgRP gibi oreksijenik peptidlerin üretimi azalır. Melanokortin reseptörlerinin aktifleşmesine ve α -MSH'nin salgılanmasına yol açan POMC nöronları aktive edilir. Enerji tüketimini ve metabolizma hızını artıran sempatik sinir sistemi aktivitesi artar. Böylece, leptin yağ dokusunda yeterli miktarda enerji depolandığını ve daha fazla yiyecek alınmasına gerek olmadığını beyine ileten önemli bir sinyaldir (18).



Şekil 2. Beslenmenin kontrolü ile ilgili geribildirim mekanizmaları (Guyton ve Hall'dan, 18).

2.3. Açlık ve Tokluk Üzerinde Yer Alan Moleküller

Besin alımını düzenleyen peptidler beslenme davranışı üzerindeki etkilerine göre anoreksijenik ve oreksijenik peptidler olarak iki gruba ayrılır. Anoreksijenik peptidler doyma hissi oluşunca besin alımını durdurur. Oreksijenik peptidler ise açlık hissinin başlatılınca besin alımını uyarırlar (20).

Oreksijenik moleküller: Asprosin, NPY, Oreksin A/B, AgRP, α -MSH, Galanin, Ghrelin, Opioidler, Endorfinler (18, 20, 21).

Anoreksijenik moleküller: Leptin, Nesfatin-1, Peptid YY, Nöradrenalin, İnsülin, α -MSH, CCK, CRH, Glucagon-like peptide-1 (7-36) amide (GLP-1), Nörotensin, Serotonin, Bombesin, CART, Aminoasitler (glutamat ve γ -aminobütirik asit), kortizol, endokanaboidler (18, 20, 21).

2.3.1. Asprosin

Asprosin yakın zamanda keşfedilen açlık durumunda salınımı artan ve hepatik glikoz üretimini artıran bir peptiddir (16). Asprosin ismi yunanca beyaz anlamına gelen ‘aspros’ kelimesinden türetilmiştir (22). Asprosin, fibrillin 1 (FBN1) tarafından kodlanan profibrillin-1 proteininin 140 amino asitlik C-terminal bölünme ürünüdür (16).

Asprosin ilk olarak 2016 yılında Chopre Romere ve arkadaşları tarafından neonatal progeroid sendromu (NPS) veya marfanoid-progeroid-lipodistrofi olarak adlandırılan nadir bir genetik duruma sahip bir grup hastada tanımlanmıştır. Hastalar aşırı zayıflık, düşük iştah/kalori tüketimi, düşük enerji harcaması, yüz ve ekstremiteleri etkileyen kısmi lipodistrofi ile karakterize bir fenotipe sahipti. Bu hastalarda FBN1 geninde bir mutasyon saptanmıştır (16).

2.3.1.1. Asprosin Salınımı

Asprosin en fazla beyaz yağ dokusundan salgılanmakla birlikte deri, tükürük bezleri ve pankreas β hücrelerinden de asprosin salgılanır (23).

Asprosin beslenme durumu ile koordineli sirkadiyen ritm gösterir. Gece açlığı, açlık sırasında hepatik glikoz salınımının gerekliliğine uygun olarak asprosin konsantrasyonlarında artışa neden olurken yeniden beslenmeyle birlikte asprosin seviyesi akut bir şekilde düşer (23). Ayrıca insülin direncine sahip insanlar ve fareler, patolojik olarak yüksek plazma asprosin seviyesi gösterirler (22).

2.3.1.2. Asprosin Fonksiyonları ve Etki Mekanizması

Asprosin hepatik glikoz salınımını artırır. Asprosin beyaz yağ dokusundan salgılandıktan sonra karaciğere alınır ve burada G protein-cAMP-PKA (siklik adenosin monofosfat-protein kinaz A) yolunu aktive ederek dolaşıma hızlı glikoz salınımını gerçekleştirir (22). Olfaktör reseptör 734 (OLFR734)'ün de hepatik glikoz üretimini düzenlemek için bir asprosin reseptörü gibi hareket ettiği yapılan bir çalışma ile belirlenmiştir (24).

Asprosin merkezi etki ile iştahı düzenler. Asprosin ARC'deki iştah düzenleyici nöronlardan AgRP ve POMC'yi uyarmak için kan-beyin bariyerini geçer ve henüz tanımlanamayan bir reseptör aracılığıyla oreksijenik bir etki uygular. Asprosin ateşleme frekansında ve membran potansiyelinde bir artış yoluyla AgRP nöron aktivasyonunu akut olarak indükler (23).

Plazmadaki asprosin kan-beyin bariyerini geçtikten sonra cAMP ikinci haberci sistemini kullanarak oreksijenik AgRP nöronlarını doğrudan aktive eder. G-proteinleri (özellikle G α s), adenilat siklaz, cAMP ve PKA yoluyla olan sinyalleme asprosin aracılı AgRP nöron aktivasyonu için gereklidir. Asprosinin AgRP nöronunu aktive ederken G proteinleri-cAMP-PKA eksenli yoluyla sinyalleşmesi aynı zamanda POMC nöronlarının %85'inin aktivitesini gama aminobütirik aside (GABA) bağlı olarak inhibe eder. Böylece asprosin gıda alımını uyarır ve enerji homeostazını düzenler (16, 23)

Yapılan bir çalışmada AgRP nöron ablasyonunun, POMC nöronlarında asprosin aracılı hiperpolarizasyonu tamamen önlediği gösterilmiştir. Bu sonuç, AgRP nöronlarının, asprosinin sinyalini POMC nöronlarına ileten en az bir yukarı akış GABAerjik nöron popülasyonu olduğunu gösterir (16).

2.3.2. Oreksin A/B

1988 yılında iki bağımsız araştırmacı grup tarafından dorsal hipotalamik alan ve LHA'da oreksin nöropeptidleri tanımlanmıştır. Oreksin A ve B 130 aminoasitli öncü bir polipeptid olan preproreksinden üretilmektedir (25, 26). Oreksin A 33 amino asitli, Oreksin B ise 28 amino asitlidir ve aralarında %46 homoloji bulunur (26).

2.3.2.1. Oreksin Reseptörleri

Oreksinlerin oreksin reseptör 1 (OX1R) ve oreksin reseptör 2 (OX2R) olmak üzere iki tip reseptörü vardır. Oreksinler bu iki tip G protein bağlı reseptörü bağlayarak ve aktive ederek etkilerini gösterirler. Oreksin reseptörleri hipotalamus, enterik sinir sisteminin myenterik plexus hücreleri, bağırsak ve adrenal bezin endokrin hücrelerinde ve erkek üreme sisteminde bulunur (27, 28). OX1R, oreksin B'ye kıyasla oreksin A için büyük bir afiniteye sahiptir. Buna karşılık hem oreksin A hem de oreksin B, OX2R'yi benzer afinite ile bağlar (29).

G protein bağlı reseptörün önemli bir grubu olarak oreksin reseptörleri merkezi sinir sistemi boyunca geniş ölçüde eksprese edilir. OX1R prefrontal ve infralimbik korteks, hipokampus, paraventriküler talamik nükleus, VMN, dorsal rafe nükleus ve lokus seruleus (LC) dağılımı gösterir (30).

OX2R serebral korteks, septal nükleuslar, hipokampus, medial talamik gruplar, rafe nükleus ve tuberomamiller nükleus, DMN, PVN ve ventral premamiller nükleusu içeren

birçok hipotalamik nükleusta dağılım gösterir (30). OX2R, hem oreksin A hem de oreksin B tarafından aktive edilir (31).

Oreksinlerin hücreler üzerindeki en önemli etkisi, artan uyarılabilirliğe ve ateşleme hızına yol açan nöronların depolarizasyonudur. Bu depolarizasyon K^+ kanallarının inhibisyonu veya spesifik olmayan katyon kanallarının aktivasyonu ile elde edilir (31).

2.3.2.2. Oreksin A/B'nin Fizyolojik Etkileri

Oreksin A'nın kan beyin bariyerini geçebildiği fakat oreksin B'nin kan beyin bariyerini geçemediği bilinmektedir (32). Oreksin ARC, VMN, suprakiazmatik nükleus, DMN ve PVN gibi komşu hipotalamik nükleuslar dahil olmak üzere merkezi sinir sistemi boyunca yaygın olarak bulunur. Hipotalamusun dışında, koku alma nükleusları, talamus ve hipokampusta da yüksek yoğunlukta OX1R bulunur. Oreksin sisteminin yaygın dağılımı ve bağlantıları, oreksinlerin iştah, uyku-uyanıklık döngüsü, uyarılma, stres, ödül ve otonomik işlevler gibi birçok fizyolojik işlevde yer aldığını göstermektedir. Ayrıca oreksin nöronları, doğrudan omurilikteki sempatik nöronları innerve ettikleri için premotor sempatik nöronlar gibi davranırlar (33).

Özellikle oreksin A'nın merkezi olarak uygulanmasının gıda alımını arttırdığı gösterilmiştir. Oreksinlerin enerji dengesinin düzenlenmesinde pozitif etkili bir molekül olmasının yanı sıra; uyanıklığı aktive etmesi ve sempatik vazomotor tonus ve kan basıncı gibi nöroendokrin ve otonomik fonksiyonları düzenleyen sempatik sinir aktivitesini uyarması gibi etkileri de vardır (33).

2.3.3. Leptin

Leptin, Zhang ve arkadaşları tarafından 1994 yılında keşfedilmiştir. Protein yapısında anoreksijenik bir peptiddir ve 167 aminoasit içermektedir. (13). 1950'lerin sonlarına doğru farelerde aşırı yeme ve az enerji harcamasına neden olan ve ileri derecede obez fenotipe sebep olan genetik bir defekt saptanmıştır. Bu gene Ob ve bu defekte sahip olan farelere de ob/ob adı verilmiştir. Ob/ob farelerinde eksik olan ürüne leptin adı verilmiştir ve yunanca ince anlamına gelen 'leptos' kelimesinden türetilmiştir (34, 35).

Leptinin molekül ağırlığı 16-kDa'dır. Leptin ob geni tarafından kodlanır. Bu gen 7. kromozomun uzun kolu (7q31) üzerindedir (34, 36).

2.3.3.1. Leptin Sekresyonu ve Düzenlenmesi

Leptin ağırlıklı olarak beyaz yağ dokusundan üretilir ve dolaşıma katılır. Leptin ayrıca beyin ve gastrointestinal sistemin endokrin hücreleri tarafından da üretilir (37). Yapısal leptin mRNA'sı, plasenta trofoblastlarında ve amniyon hücrelerinde, insan koryokarsinom hücre dizisinde (BeWo), kemik ve kıkırdak dahil olmak üzere bir dizi dokuda tespit edilmiştir (34).

Leptin'in dolaşımdaki yarı ömrü yaklaşık 30 dakikadır ve pulsatif olarak yemeklerden 2-3 saat sonra salgılanır (38). Leptin serumda hem serbest hem de proteine bağlı şekilde dolaşır (39). Leptin steroid ve tiroid hormonlarının yanı sıra, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), spesifik IGF bağlayıcı proteinlere bağlı olarak dolaşır (40).

Yağ dokusu miktarı ve dolaşımdaki leptin seviyesi pozitif koreledir (41). Kadınlarda birim yağ kütlesi başına düşen plazma leptin konsantrasyonu erkeklere göre 3 kat daha yüksektir. (39, 42). Bunun nedeni cinsiyet farkı, deri altı yağ dokusunda daha yüksek leptin üretimine, kadınlarda östrojen tarafından leptinin uyarılmasına ve erkeklerde testosteron tarafından leptinin baskılanmasına bağlanmıştır. İnsanlardan farklı olarak, leptin erkek kemirgenlerde dişilere kıyasla daha yüksektir (35).

Açlık durumunda dolaşımdaki leptin düzeyi azalırken beslenme veya obezite dolaşımdaki leptin düzeyini artırır. Açlık sırasında serum leptin düzeylerindeki hızlı düşüş, leptin salınımının vücut yağ kütlesindeki değişiklikler dışındaki faktörler tarafından düzenlendiğini gösterir (43). Aşırı yemek yeme dolaşımdaki leptin düzeyini artırırken, açlık dolaşımdaki leptin düzeyini azaltır. Dolaşımdaki leptin düzeyini belirleyen diğer bir faktör adipositlerin boyutudur. Daha büyük adipositler küçük adipositlere göre daha fazla leptin içerir (44, 45).

Soğuğa maruz kalma, katekolaminler ve melatonin leptin seviyesini azaltır. İnsülin, leptin mRNA seviyesini etkilemeden leptin sekresyonunu 15 dakika gibi kısa bir sürede arttırır (46).

Leptin, steroid hormonları tarafından da düzenlenir. Glukokortikoidler hem ob (leptin) mRNA seviyelerini hem de leptin salgısını artırır (47, 48). CRH leptin ekspresyonunu artırır (49). Oksitosin, 3T3-L1 adipositleri tarafından leptin salgılanmasını artırır (50).

Tiroid hormonları leptin salınımını azaltır (51). Katekolaminlerin farklılaşmış insan adipositlerinden leptin salınımını beta 1 ve beta 2 adrenerjik reseptörler aracılığıyla baskılar (52).

2.3.3.2. Leptin'in Fonksiyonları

Leptinin en önemli rolü iştah üzerindeki inhibitör etkisi olarak kabul edilir. Ancak hem leptin eksikliği olan (ob / ob) hem de leptin reseptörü eksikliği olan (db / db) fareler sadece obez değildir. Ayrıca anormal üreme fonksiyonu, hormonal dengesizlikler ve hematopoietik ve bağışıklık sistemindeki değişiklikler ile karakterize karmaşık bir sendrom geliştirirler. Leptin eksikliği olan insanlarda da benzer değişiklikler tarif edilmiştir (34).

2.3.3.3. Leptin Reseptörleri

Leptin reseptörü, 6 tane varyant içeren genişletilmiş sınıf I sitokin reseptör ailesinin bir üyesidir. Bu reseptörler Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Rf, Ob-Re'dir. Leptin reseptörü kısa formları; Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd ve Ob-Rf, öncelikle koroid pleksus vasküler endotel ve periferik dokularda eksprese edildiklerinden leptinin kan beyin bariyeri boyunca taşınmasından sorumludur (44). Leptin Reseptörü uzun formu (Ob-Rb) ise leptin sinyalizasyonunda sorumludur. Leptin reseptörünün uzun formu (Ob-Rb) ARC, VMN, DMN ve LHA'da bolca eksprese edilir (44, 62).

Leptinin kilo düzenleyici etkilerine hipotalamustaki OB-Rb aracılık eder. OB-Rb ayrıca birkaç periferik dokuda mevcuttur. Özellikle endotel hücreleri, trombositler, T lenfositleri, yolk kesesi ve fetal karaciğer, lösemi hücreleri OB-Rb eksprese eder (34).

Sınıf I sitokin reseptörlerinde olduğu gibi, leptin sinyalinin esas olarak janus kinaz/sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (JAK-STAT) yolu ile iletildiği düşünülmektedir. Yalnızca uzun reseptör JAK/STAT sinyal iletim yolunun aktivasyonu için gerekli hücre içi motiflere sahiptir (35). Leptin reseptörünün uzun formu JAK/STAT sinyal iletim yolunu aktive ederek ARC'deki oreksijenik peptidlerin etkisini bastırır (14, 53).

2.3.3.4. Leptinin Etki Mekanizması

Leptin esas olarak merkezi sinir sistemi üzerinde etkilidir. Leptin, ağırlıklı olarak ARC'deki reseptörünün uzun formuna bağlandığı santral sinir sistemine aktif olarak taşınır (20).

Leptin anoreksijenik etkisini ARC başta olmak üzere hipotalamus üzerinden gösterir (14, 44). ARC leptin hedefleri olan, oreksijenik NPY/AgRP ve anoreksijenik CART/POMC nöronlarını içerir (14). Leptin, NPY/AgRP nöronlarını inhibe edip salımını azaltırken bunun aksine POMC ve CART gen ekspresyonunu destekler ve POMC/CART nöronlarını aktive eder (54).

Leptin anoreksijenik etkisini esas olarak ARC-PVN eksenindeki oreksijenik bir peptid olan NPY'nin sinyalini baskılayarak gösterir (55).

Leptin POMC nöronlarının depolarizasyonunu indükler. POMC nöronları aktifleştiği için buradan salgılanan α -MSH'in yapımı artar (15, 56). POMC nöronları tarafından salınan α -MSH, PVN'ye eksprese edilen MC4R'e bağlanarak enerji alımını azaltmak için sinyal verir ve iştahı bastırır (56).

Leptin, anoreksijenik POMC nöronlarındaki aksiyon potansiyellerinin sıklığını iki mekanizma ile artırır: spesifik olmayan bir katyon kanalı yoluyla depolarizasyon ve lokal oreksijenik NPY/GABA nöronları tarafından azaltılmış inhibisyon. Ayrıca, melanokortin peptidlerinin bu devre üzerinde oto-inhibitör etkisi vardır (57).

Leptin ATP'ye duyarlı bir potasyum kanalını aktive ederek hücreden K^+ iyonu çıkışını artırır ve hiperpolarizasyona neden olur (44). JAK-STAT sinyali, ARC nöronları üzerindeki leptin etkisi için kritiktir; leptin hem POMC hem de NPY nöronlarında sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 3 aktivatörü (STAT3) aktivasyonunu indükler. STAT3'ün leptin ile aktivasyonu POMC transkripsiyonunu indükler. Leptinin STAT3'ü aktive etme yeteneğinin kaybı obeziteye yol açar (58).

Leptin, POMC nöronlarına NPY projeksiyonu yapan inhibitör kollateraller üzerinde etki eder ve bu da sonuç olarak terminallerden GABA ve NPY salınımını azaltır (44).

2.3.4. Ghrelin

Oreksijenik peptidlerden olan ve gastrointestinal sistem tarafından üretilen ghrelin merkezi etki ile beslenme davranışını ve vücut ağırlığını düzenler. Ghrelin, 28 aminoasitlik peptiddir (15, 59).

Ghrelin ilk olarak Kojima ve arkadaşları tarafından büyüme hormonu salgılatırıcı reseptöre (GHS-R) özgü bir endojen ligandın sıçan midesinde saflaştırılması ile keşfedilmiştir. Büyüme hormonu salan bu peptidi 'ghrelin' olarak adlandırmışlardır (15).

İmmünotokimyasal tekniklerle, santral sinir sisteminde hipofiz bezinin yanı sıra sıçan plasantasının labirent trofoblast sitoplazmasında, ARC, PVN, VMN, DMN ve lateral hipotalamusta yüksek konsantrasyonda ghrelin olduğunu gösterilmiştir (61, 64).

2.3.4.1. Ghrelin Salınımı

Ghrelin, X/A-benzeri hücreler tarafından salgılanır. X/A-benzeri hücreler hem sıçanların hem de insanların oksintik mukozasındaki ana endokrin hücre popülasyonunu temsil eder. Esas olarak oksintik bezde ve nadiren pilor bezi ve ince bağırsakta bulunurlar (59, 60).

Ghrelin ayrıca hipotalamus, hipofiz bezi ve böbrek ve enterik endokrin hücrelerden de eksprese edilir (59, 60, 63).

Ghrelin hormonu beslenmeye kısa süreli etki eden maddelerden biridir. Ghrelin hormonunun kan seviyesi beslenme zamanları ile uyumlu sirkadiyen dalgalanmalar gösterir. Yemekten hemen önce ani artış ve tokluk sonrası ani düşüş gösterir (65).

Oksitosin, dopamin ve vazopressin, mide ghrelinoma (MGN3-1) hücreleri tarafından ghrelin salgılanmasını önemli ölçüde uyardığı yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir (66). Adrenokortikotropik hormon (ACTH), kortikosteroidler ve CRH ise ghrelin ekspresyonunu azaltır (67). İnsülin ghrelin salınımını baskılar (68).

2.3.4.2. Ghrelin'in Fonksiyonları

Ghrelin ARC'de GHS-R'yi aktive eder ve büyüme hormonu salınımını uyarır (69). Ghrelin keşfinin ilk zamanlarında vücutta, büyüme hormonu salınımını artıran bir hormon olarak görülmüştür. Fakat son zamanlarda iştah ve vücut ağırlığının düzenlenmesi üzerine olan etkileri daha fazla dikkat çekmektedir (15).

Ghrelinin oreksijenik etkisinin yanında bağırsak motilitesinin ve mide asidi salgılanmasının uyarılması, uykunun düzenlenmesi, tat duyusu, ödül arama davranışı, glikoz metabolizmasının düzenlenmesi, kahverengi yağ termojenezinin baskılanması, stres ve kaygının düzenlenmesi, kas atrofisine karşı koruma, vazodilatasyon ve kardiyak kontraktilite gibi kardiyovasküler fonksiyonların iyileştirilmesi, sempatik sinir sistemi aktivasyonunu azaltması, hipofiz bezinden ACTH salınımı artırılması dahil olmak üzere birçok merkezi ve periferik etkileri tanımlanmıştır (60).

2.3.4.3. Ghrelin'in Etki Mekanizması

Ghrelinin enerji metabolizmasını düzenlemesindeki en önemli etki alanı hipotalamusta bulunan ARC'dir. Ayrıca PVN ve LHA'ya ghrelin enjeksiyonu da pozitif enerji dengesini destekler (71). İ.c.v ghrelin uygulamasından sonra NPY ve AgRP nöronları dahil olmak üzere beslenmenin düzenlenmesinde birincil öneme sahip bölgelerde nöronal aktivasyonun bir belirteci olan Fos proteini bulunmuştur (72). Yani ghrelin PVN'yi uyarak oreksijenik peptidlerden olan NPY ve AgRP üreten nöronları uyarak bu peptidlerin ekspresyonunu artırır. Böylece ghrelin beslenme ve vücut ağırlığında artışa neden olur (72).

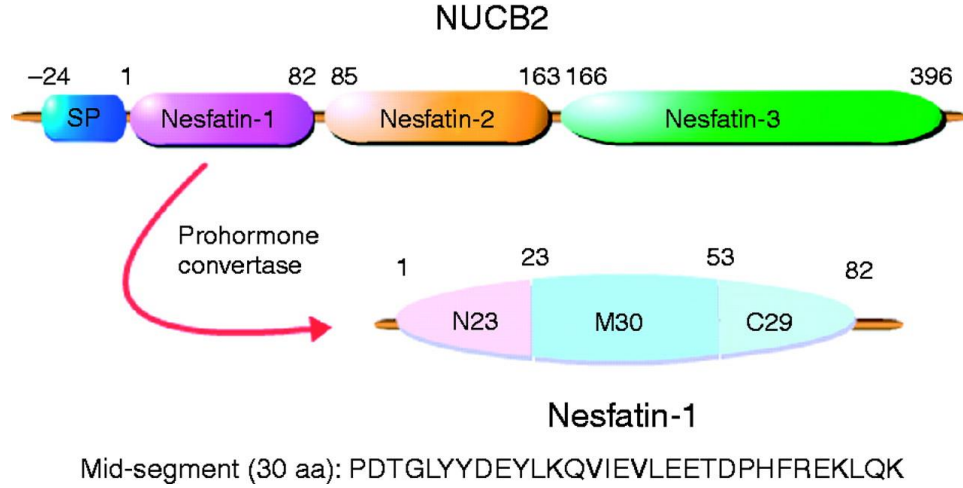
2.3.4. Nesfatin-1

Nesfatin-1 ilk defa 2006 yılında Oh-I ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada hipotalamik nükleuslarda keşfedilmiştir. Nesfatin-1'in hipotalamik anoreksijenik bir peptid olduğu ve kronik enjeksiyonun vücut ağırlığını azalttığı aynı çalışmada gösterilmiştir. Nesfatin-1 hipotalamusta melanokortin sinyalizasyonu ile ilişkili ve bir tokluk molekülü olarak tanımlanmıştır. Nesfatin-1'in leptin salgılayamayan farelerde bile gıda alımını engelleyebilmesi nesfatin-1'in leptin yolağından bağımsız çalıştığını göstermektedir (1).

2.3.4.1. Nesfatin-1'in Biyokimyasal Yapısı

Nesfatin-1 DNA bağlayıcı protein olan NUCB2'den üretilen 82 amino asitli bir polipeptiddir (2). NUCB2, PC3/1 ve PC2 gibi prohormon dönüştürücü enzimler tarafından nesfatin-1, nesfatin-2 ve nesfatin-3'e dönüşür (73). İntraserebroventriküler (i.c.v) nesfatin-1 enjeksiyonun, sıçanlarda doza bağlı bir şekilde gıda alımını azalttığı gösterilmiştir. Buna karşılık, ne nesfatin-2 ne de nesfatin-3 herhangi bir anorektik tepki uyandırmamıştır (1). Nesfatin-2 ve nesfatin-3'ün biyolojik aktivitesi hakkında henüz kesin bir bilgi yoktur.

Nesfatin-1'in üç bölümü bulunmaktadır. Bu bölümler N-terminali (N23), orta kısım (M30) ve C-terminali (C29). Orta kısmı nesfatin-1'in aktif bölümüdür ve nesfatin-1'in fizyolojik etkilerinde anahtar role sahiptir.



Şekil 3. Nesfatin-1'in öncüsü olarak NUCB2 proteininin birincil yapısı (García-Galiano'dan, 73).

2.3.4.2. Nesfatin-1'in Salgı Alanları

NUCB2 hipotalamik alanlarda yani ARC, PVN, SON, LHA, zona incerta ve NTS'de bulunmaktadır. (1). Ayrıca nesfatin-1 diğer beyin bölgelerinde de bulunur. Bunlar; piriform, insular, singulat ve somatomotor korteksleri içeren kortikal alanlarda, amigdaloid nükleusları içeren limbik sistemde, hipokampus ve septumda, bazal gangliyonlarda, stria terminalinin yatak nükleusunda, PVN ve parafasiküler nükleusları içeren thalamustur. Beyin sapında ise rafe nükleusları, Edinger-Westphal nükleus, LC, lateral parabrakial nükleus, ventrolateral medulla ve dorsal vagal komplekste bulunur (74). Nesfatin-1 nöronları hipotalamusta oksitosin, vazopressin ve melanin konsantre edici hormon ile birlikte eksprese olur (75).

Nesfatin-1 periferik olarak ise mide mukozası, pankreas endokrin beta hücreleri, kalp, yağ dokusu ve testis, epididim, yumurtalık ve uterusun salgılanır. Ayrıca testis, epididim, yumurtalık ve uterus gibi üreme organlarından nesfatin-1 ekspresyonun hipotalamustan çok daha yüksek olduğu gösterilmiştir (76).

2.3.4.3. Nesfatin-1'in Genel Fizyolojik Etkileri

Beslenme üzerine etkisi

Nesfatin-1'in i.c.v enjeksiyonunun gıda alımını azalttığı bulunmuştur (1). Sıçanlara karanlık fazın başlangıcında i.c.v olarak enjekte edilen nesfatin-1'in, enjeksiyon sonrası 3. saatten 6. saate kadar, kan şekerini değiştirmeden, kümülatif olarak gıda alımını önemli

ölçüde azalttığı bulunmuştur (20). Bir başka çalışmada ise sıçanlara i.c.v nesfatin-1 uygulanmasının gıda alımını azalttığı, fakat vücut ağırlığına etki etmediği tespit edilmiştir (6). Nesfatin-1'in intraperitoneal (i.p) enjeksiyonunun da doza bağlı bir şekilde gıda alımını baskıladığı gösterilmiştir (77). Bu sonuçlar, nesfatin-1'in enerji dengesinin düzenlenmesinde negatif etkili bir molekül olduğuna işaret etmektedir.

Nesfatin-1'in reseptörü henüz keşfedilmemiştir fakat yapılan bir çalışmada nesfatin-1'in G proteinine bağlı bir reseptör ile etkileşime girerek hipotalamik nöronlarda Ca^{2+} akışını artırarak sinyal iletimini gerçekleştirdiği bulunmuştur (3).

ARC'nin beslenme davranışını düzenlenmesindeki rolü nesfatin-1 içeren PVN, NTS ve Raphe çekirdeği gibi birçok beyin yapısından girdi alması ile gerçekleşir. Nesfatin-1'in ARC'deki nöronların uyarılabilirliğini nasıl etkilediğine dair yapılan bir çalışmada nesfatin-1'in ATP'ye duyarlı potasyum kanallarının (K_{ATP}) aktivasyonu yoluyla ARC'deki NPY nöronlarını inhibe ederek beslenme davranışı üzerinde anoreksijenik etkilerini gösterebileceği öne sürülmüştür (4).

Ayrıca nesfatin-1'in periferik enjeksiyondan sonra kan beyin bariyerini geçerek leptinden bağımsız bir mekanizma yoluyla NTS'deki POMC ve CART nöronlarını aktive edip anoreksiye yol açtığı yapılan çalışma ile gösterilmiştir (77). Kemirgenlerde beslenme davranışının düzenlenmesinde nesfatin-1, CRH, tiotropin salgılatıcı hormon (TRH) ve histamin arasındaki etkileşimleri inceleyen bir çalışmada nesfatin-1, hipotalamusta CRH ve TRH düzeylerini ve histamin dönüşümünü artırdığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar, nesfatin-1'in beslenme davranışı üzerindeki baskılayıcı etkilerine CRH, TRH ve hipotalamik nöronal histaminin aracılık ettiğini göstermektedir (7).

Merkezi olarak uygulanan nesfatin-1'in PVN'yi ve NTS'yi aktive ettiği gösterilmiştir. PVN'de nesfatin-1, hem magnoselüler hem de parvosellüler oksitosin nöronlarını ve nesfatin-1 nöronlarının kendilerini hedef alır ve oksitosin salınımını uyarır. NTS, POMC nöronuna oksitosinerjik sinyal gönderir ve böylece melanokortine bağlı anoreksiye neden olur (78).

Nesfatin-1'in PVN'de anoreksijenik etkisinin yanında strese tepki fonksiyonunu ortaya çıkarmaya neden olan CRH ekspresyonu yapan nöronları aktive eder. Yapılan bir çalışmada nesfatin-1'in hipotalamik ekstraselüler sinyal regüle kinaz (ERK) sinyalini uyardığı ve bu yolun nesfatin-1 aracılı beslenme davranışı, sempatik sinir aktivitesi ve kardiyovasküler fonksiyon düzenlemesinde yer aldığını ileri sürülmüştür. Santral nesfatin-

1 bu etkiyi PVN'nin kortikotropin nöronlarında ekstraselüler sinyal regüle kinaz 1,2 (ERK1/2) fosforilasyonunu uyararak bu da böbreklerin seçici sempatoeksitasyonu ile sonuçlanması ile gerçekleştirir (79).

Yapılan bir çalışmada PVN'de bulunan NUCB2/nesfatin-1 nöronunun PVN'de oksitosin ve arginin vazopressin nöronları nöronları aracılığıyla enerji metabolizmasını ve sıvı dengesini düzenlediğini önermiştir (5).

Ayrıca yapılan başka bir çalışmada ise i.c.v nesfatin-1 enjeksiyonun karanlık faz sırasında gıda alımını azalttığı bu anoreksijenik etkinin ise CRH₂ reseptör antagonisti astressin 2B ile ortadan kaldırıldığı gösterilmiştir. Bu sonuçlarda nesfatin-1 in lateral ventriküle enjeksiyonun karanlık fazdaki anoreksijenik etkisini CRH₂ reseptörüne bağlı yollar aracılığıyla ortaya çıkardığını göstermektedir (6).

Mide fonksiyonları üzerine etkisi

Nesfatin-1'in amigdalanın merkezi çekirdeğinde bulunan gastrik distansiyona duyarlı nöronların aktivitesi, mide motilitesi ve vagusun dorsal motor çekirdeğinin potansiyel düzenleme mekanizmaları üzerindeki etkilerini araştıran bir çalışmada amigdala nesfatin-1 uygulamasının gastrik distansiyona duyarlı nöronların ateşleme aktivitesini değiştirdiğini ve doza bağlı olarak mide hareketliliğini azalttığı gösterilmiştir. Nesfatin-1'in bu etkileri melanokortin 3/4 reseptör antagonisti SHU9119 ile ön tedavi ile kısmen ortadan kaldırılabilirliği gösterilmiştir. (80).

PVN'ye eksojen nesfatin-1 uygulamasının gastrik distansiyona yanıt veren nöronlar ve gastrik hareketlilik/boşaltma üzerindeki etkilerini araştıran başka bir çalışmada nesfatin-1'in PVN'deki gastrik distansiyona yanıt veren nöronları düzenlediğini ve oksitosin reseptör antagonisti H4928 ile ön tedavi ile kısmen bloke edilen gastrik motiliteyi azalttığını göstermiştir (10). ARC'ye nesfatin-1 uygulamasının ARC'deki ghrelin duyarlı (GD) nöronlarının ateşleme aktivitesini değiştirdiğini ve kısmen bir melanokortin 3/4 reseptör antagonisti SHU9119 ön tedavisi tarafından bloke edilen gastrik motiliteyi azalttığını gösterilmiştir. (11). Sonuç olarak nesfatin-1'in amigdala, PVN ve ARC'deki nöronların aktivitesini değiştirerek mide fonksiyonunu modüle ettiğini gösterilmiştir.

Çalışmamızın amacı i.c.v olarak enjekte edilen nesfatin-1'in CRH₁ ve CRH₂ ve oksitosin reseptörleri ile sinyalleşmesinin serum ghrelin, leptin, oreksin A ve asprosin düzeylerine etkisini incelemektir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Yapıldığı Merkez

Bu tez çalışması Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınan onayla (31.05.2022 tarihli ve 53488718-475 sayılı karar) yapılmıştır. Hayvan deneyleri KTÜ Fizyoloji Anabilim Dalı Fizyoloji Laboratuvarında yapılmıştır. Serum analizleri KTÜ Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Biyokimya Laboratuvarında yapılmıştır. Tez çalışmasında kullanılan deney hayvanları, ELISA kitleri KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından (TYL-2022-10361 numaralı proje) desteklenmiştir.

3.2. Gruplardaki Hayvan Sayılarının Belirlenmesi ve Hayvanların Temini

Çalışmada kullanılan hayvan sayısı daha önceki benzer çalışmalarımızdaki değerler esas alınarak vücut ağırlığı üzerinden hesaplanmıştır. Deney başlangıcında sıçanların ortalama ağırlıkları yaklaşık 300 gr standart sapma 25 gr % 4 sapma tip 1 hata (α) 0.05 ve tip 2 hata (β) (güç=0.80) alınarak; 6 grup için toplam 30 hayvan gerektiği, dolayısıyla her grup için n sayısı 5 hayvan olarak belirlenmiştir. Her gruptaki hayvanların dağılımları rastgele belirlenmiştir.

Araştırmada Wistar albino erkek sıçanlar kullanılmıştır. Deney hayvanları Karadeniz Teknik Üniversitesi Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden sağlanmıştır.

3.3. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler

Enjeksiyon öncesi hayvanlar üretan (Urethane, minimum %99, 51-79-6, Sigma) ile anestezi altına alınmıştır. Deney gruplarına nesfatin-1 (1-82) (003-22-B, Phoenix Pharmaceuticals, Inc.), p234 (048-96, Phoenix Pharmaceuticals, Inc.), antalarmin HCI (%99.6, 1321, Axon Medchem), astressin 2B (2391, Tocris Bioscience), atosiban (6332, Tocris Bioscience) enjekte edilmiştir.

3.3.1. Reseptör Antagonistleri

3.3.1.1. Kortikotropin Salgılatıcı Hormon ve Reseptör Antagonistleri Astressin 2B ve Antalarmin HCI

CRH, ilk olarak koyun hipotalamusundan izole edilen ve hipofiz bezi tarafından salgılanan pro-opiomelanokortin türevli peptidlerin düzenlenmesinden sorumlu olan

ACTH ve beta-endorfin salgılanmasını uyaran 41 amino asitli bir peptiddir. Yapılan çalışmalarla, CRH'nin ayrıca hipofiz adrenal ekseninden bağımsız olarak strese karşı bir dizi otonomik ve davranışsal tepki verdiğini gösterilmiştir (81, 82).

İki CRH reseptörü alt tipi tanımlanmıştır. Bunlar CRH₁ reseptörü ve CRH₂ reseptörüdür. CRH₁ reseptörü esas olarak hipofiz, amigdala, hipokampus, beyincik ve kortekste bulunur ve aktivasyonu genellikle kaygı benzeri davranışlardaki artışlarla ilişkilidir. CRH₂ reseptörü ise esas olarak lateral septumda, VMN ve koroid pleksusta bulunur. CRH₂ reseptörünün aktivasyonu beslenme davranışındaki değişikliklerle ilişkilidir (83). CRH₂ reseptör antagonisti astressin 2B dir (84). CRH₁ reseptör antagonisti ise antalarmin HCI dir (85).

3.3.1.2. Oksitosin ve Reseptör Antagonisti Atosiban

Oksitosin, hipofizin nöral lobundan genel dolaşıma salınan, doğum sırasında uterus kasılmalarını ve emzirme sırasında süt çıkışını indükleyen hipotalamik bir nöropeptiddir.

Ferring tarafından geliştirilen oksitosin antagonisti atosiban, bugüne kadar en çok çalışılan oksitosin antagonistidir. Oksitosin antagonisti atosiban insanlarda erken uterus kasılmalarını inhibe ederek erken doğumu önler (86).

3.3.1.3. Kisspeptin ve Reseptör Antagonisti Peptid 234

Kiss1 geninin peptid ürünleri olan kisspeptinler, başlangıçta memelilerde, tümör metastazını baskılama kabiliyetine sahip G protein-bağlı reseptör 54'ün (GPR54; Kiss1R olarak da adlandırılır) ligandları olarak tanımlanmıştır. Kisspeptin üreme fonksiyonunun kontrolünde önemli rol oynar (87). Kisspeptin nöronları ARC/infundibular nükleus, medial preoptik alan, DMN, periventriküler nükleus, lateral septumun ventral tarafı ve medial amigdalada bulunur (88).

Peptid 234 kisspeptin reseptör antagonistidir ve gonadotropin-salgılatıcı hormon (GnRH) nöronlarının ateşlenmesini bloke eder (89).

3.4. Deney Gruplarının Oluşturulması

Araştırmamızın deneysel uygulamaları, i.c.v (lateral ventriküle) enjeksiyon gruplarının yer aldığı toplam 6 grupta gerçekleştirilmiştir. Uygulama sabahı aç olacak şekilde, 12 saat öncesinde yem alımı durdurulmuştur ve suya erişimi serbest bırakılmıştır.

Grup 1: Sham (kontrol) grubu

2 µl/dk hızında toplam 2 dakika (4 µl hacimde) yapay beyin omurilik sıvısı (BOS) lateral ventriküle enjekte edilmiştir. Enjeksiyon sonrası 30. dakikada hayvanlar servikal dislokasyonla sakrifiye edilerek deney sonlandırılmıştır.

Grup 2: Nesfatin-1 grubu

25 pmol dozda nesfatin-1 yapay BOS içerisinde çözülerek, 4 µl hacimde lateral ventrikül içine enjekte edilmiştir. Enjeksiyon sonrası 30. dakikada hayvanlar servikal dislokasyonla sakrifiye edilerek deney sonlandırılmıştır.

Grup 3: Nesfatin-1+p234 grubu

Nesfatin 25 pmol dozda 2 µl yapay BOS içerisinde lateral ventriküle enjekte edildikten 5 dakika sonra 1 nmol dozda 2 µl hacimde p234 enjekte edilmiştir. Böylece her gruba maksimum 4 µl hacimde uygulama yapılmıştır. Enjeksiyon sonrası 30. dakikada hayvanlar servikal dislokasyonla sakrifiye edilerek deney sonlandırılmıştır.

Grup 4: Nesfatin-1+Antalarmin HCl grubu

Nesfatin-1 enjeksiyonundan 5 dakika önce 0,1 µg dozda antalarmin (90) enjekte edilmiştir ve sonrasında nesfatin-1 enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyon sonrası 30. dakikada hayvanlar servikal dislokasyonla sakrifiye edilerek deney sonlandırılmıştır.

Grup 5: Nesfatin-1+ Astressin 2B grubu

Nesfatin-1 enjeksiyonundan 5 dakika önce 1 µg (90) dozda Astressin 2B uygulanmıştır. Sonrasında nesfatin-1 uygulanmıştır. Enjeksiyon sonrası 30. dakikada hayvanlar servikal dislokasyonla sakrifiye edilerek deney sonlandırılmıştır.

Grup 6: Nesfatin-1+Atosiban grubu

Nesfatin-1 enjeksiyonundan 5 dakika önce 300 ng/sıçan dozda atosiban (91) verilmiştir ve sonrasında 50 pmol nesfatin-1 uygulanmıştır. Enjeksiyon sonrası 30. dakikada hayvanlar servikal dislokasyonla sakrifiye edilerek deney sonlandırılmıştır.

3.5. Erişkin Erkek Hayvanların Seçimi ve Deney Gruplarında Yapılacak Uygulamalar:

Çalışma, 250-300 gram ağırlığında erişkin 3-4 aylık erkek sıçanlar üzerinde yapılmıştır. Deney süresince hayvanlar sabit sıcaklık (21 ± 2 °C) ve 12 saat gece/12 saat gündüz (ışık açılışı 07.00) ortamda tutulmuştur.

Uygulama sabahı aç karnına olacak şekilde 12 saat öncesinde yem alımı durdurulmuştur ve suya erişimi serbest bırakılan hayvanlara anestezi uygulanmıştır ve kan şekeri ölçülmüştür. Normal açlık kan şekeri değerinin dışında sonuç veren hayvanlar araştırmadan çıkarılmıştır. Enjeksiyon sonrası 30. dakikada numuneleri toplamak için deney sonlandırılmıştır. Süre olarak 30 dakikalık bir zaman diliminin belirlenmiş olmasının gerekçesi nesfatin-1'in plazma yarı ömrü ile ilgilidir (92).

Hayvanlar üretan (1.25 g/kg, periton içi) ile anestezi altına alındıktan sonra sterotaktik cihaza yerleştirilmiştir. Anestezi derinliği kontrol edildikten sonra, bistüri yardımıyla kafa derileri açılarak, kemik doku diğer yumuşak dokulardan arındırılmıştır. Kafatasında Bregma noktası belirlenerek, sterotaktik cihazın bir holderine klips yardımıyla yerleştirilmiş kılavuz kanülü aracılığıyla sterotaksik koordinatlar belirlenmiştir. Rat beyin atlasından yararlanılarak lateral ventrikül koordinatları (lateral: 1.70mm, anteroposterior: -0.72 mm ve ventral: 4 mm) hesaplanmıştır ve kafatasındaki iz düşüm noktası işaretlenmiştir (93). Ardından kafatası dişçi turu yardımıyla delinerek Hamilton enjektörü ile lateral ventriküle enjeksiyonlar gerçekleştirilmiştir.

3.6. Serum Eldesi

Enjeksiyonlar yapıldıktan sonra belirtilen süre tamamlandığında, anestezi altındaki hayvanlar dekapitasyonla sakrifiye edilmiştir. Gövde kanı bir cam huni aracılığıyla sarı renkli vakumlu tüplere alınmıştır. Toplanan kanlar soğutmalı santrifüjde 15 dakika süresince 5000 rpm'de santrifüj edilerek, serumları ayrılıp analizler yapılana kadar KTÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'ndaki soğutucularda muhafaza edildi. Serum örneklerinde ELISA analizi için yapılacak prosedürler, ticari kitlerin prospektüslerine uygun şekilde Biyokimya Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.7. Serum Analizleri

Serum analizleri için alınan serum örnekleri KTÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'ndaki soğutucularda muhafaza edildi. Parametrelerin ölçümü için KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda bulunan cihazlar kullanıldı.

Deneysel uygulama sonrasında, hayvanlar sakrifiye edilerek serum ghrelin, leptin, asprosin ve orexin A düzeyleri ELISA kitleri ile ölçülmüştür. ELISA analizleri sensitivitesi yüksek ve inter-assay / intra-assay varyasyon katsayıları % 15'i geçmeyen ticari ELISA kitleri ile üretici firmanın belirlediği prosedürler esas alınarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada kullanılan ELISA kitleri Sandwich-ELISA prensibi ile çalışır. Analiz için ölçüm dalga boyu 450 nm'dir.

3.7.1. ELISA Kitleri

ELISA yöntemi, enzim substratı ve enzim bağlantılı bir konjugat kullanılması ile elde edilen renk değişimi yoluyla antijen-antikor reaksiyonlarını gösteren ve biyolojik sıvılardaki moleküllerin konsantrasyonunu ve varlığını belirlemeye yarayan kantitatif analitik yöntemlerdir.

ELISA yönteminde kullanılan antijen, katı bir faza bağlanır. Katı faz olarak polivinil sert polistiren ve polipropilenden yapılmış mikropalakalar ve tüpler kullanılır. Kullanılan mikropalakalar antikoru ve antijeni uygun şekilde adsorbe edebilmelidir. Ancak diğer fazlardaki bileşenleri adsorbe etmemelidir. ELISA'da kullanılan enzimler arasında glikoz oksidaz, beta galaktosidaz, peroksidaz ve alkalın fosfataz bulunur.

Enzimlerin katabolik etkileri, enzim-substrat reaksiyonu sırasında immünolojik reaksiyonun hem özgüllüğünü hem de ivmesini belirler. Enzim-substrat reaksiyonu çoğunlukla 30-60 dakika içinde tamamlanır. Reaksiyon, sülfürik asit (H_2SO_4), sodyum hidroksit (NaOH) veya hidroklorik asit (HCl) kullanılarak durdurulabilir. Sonuçlar, kullanılan konjugenin özelliklerine bağlı olarak bir spektrofotometrede ve kullanılan konjugatın karakteristiğine bağlı olarak 400-600 nm'de okunur (94).

3.7.1.2. Sandwich ELISA

Sandwich ELISA tekniği, Kato ve arkadaşları tarafından 1977'de geliştirilmiştir. Sandwich ELISA yönteminde, kuyucuklar yakalama antikoru ile kaplanır ve bloke edilir. Örnek, antikorla kaplanmış mikropalaka kuyucuklarına eklenir. Kuyucuklara eklendikten

sonra plak bir süre inkübe edilir ve inkübe edildikten sonra yıkanır. Yıkama işlemi, bağlanmamış antijenleri uzaklaştırır. Bağlı antikora özgü antijen bulunduğunda ise bu antijenler uzaklaştırılmaz. Yıkama işlemi ardından etiketlenen antikorlar ile antijene özgü enzim eklenir ve inkübe edilir. İnkübasyon ve yıkama işlemi sonrası ortamda antijenler varsa enzim etiketli antikorlar kendilerine bağlı olduğu için bunlar uzaklaştırılmaz.

Enzim aktivitesini ortaya çıkarmak için ortama enzim substratı eklenir ve bu sayede renklenme sağlanır. Renklenme olumlu bir sonuç gösterirken, renklenme olmaması enzim eksikliğini veya olumsuz bir sonucu gösterir. İlgili protein iki antikor molekülü arasında sıkıştığı için bu yöntem Sandviç ELISA adı verilir. Bu yöntemin diğer tüm ELISA yöntemlerinden 2-5 kat daha duyarlı olduğu gösterilmiştir. (94).

3.7.2. Serum Asprosin Ölçümü

Serum örneklerinde asprosin seviyeleri, SEA332Ra katalog numaralı ticari ELISA kiti kullanılarak üretici firmanın (Cloud-Clone, Wuhan China) tavsiyeleri doğrultusunda belirlendi.

Çalışma gününe kadar -80 °C'de saklanan numuneler çalışma günü soğutucudan çıkarılarak oda sıcaklığında çözülmesi sağlandı. 500 µL standarta 500 µL standart dilüent eklenerek standart 2 kat dilüe edildi. Standart ve serum örneklerinden 100 µL alınarak ELISA kuyucuklarına eklendi ve 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. Antikorlarla kaplı kuyucuklara serum numuneleri eklendiğinde asprosin antikorlarıyla bağlanması sonucu antijen-antikor kompleksi oluşur. İnkübasyon sonrası ELISA pleyti aspire edildi. Detection reagent A ve B assay dilüent A ve B ile 100 kat dilüe edildi. Daha sonra kuyucuklara 100 µL detection reagent A eklendi ve 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası ELISA pleyti 3 kez yıkandı. Yıkamanın ardından 100 µL detection reagent B eklendi ve 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi ve 5 kez yıkandı. Yıkamanın ardından kuyucuklara 90 µL substrat (TMB) eklendi ve 37 °C'de karanlıkta 10-20 dk bekletildi.

İnkübasyon sırasında bağlı enzim konjugatı renksiz kromojeni mavi renkli ürüne dönüştürdü. İnkübasyondan sonra kuyucuklara 50 µL stop çözeltisi eklendi. Durdurma çözeltisi mavi rengi sarıya dönüştürdü. Standard ve serum örneklerinin optik absorban değerleri 450 nm'de ELISA okuyucusunda ölçüldü.

3.7.3. Serum Orexin A Ölçümü

Serum örneklerinde Orexin A seviyeleri, CEA607Ra katalog numaralı ticari ELISA kiti kullanılarak üretici firmanın (Cloud-Clone, Wuhan China) tavsiyeleri doğrultusunda belirlendi. Çalışma gününe kadar -80 °C’de saklanan numuneler çalışma günü soğutucudan çıkarılarak oda sıcaklığında çözülmesi sağlandı. Standart PBS ile 2 kat dilüe edildi (150 µL tampon PBS ve 150 µL örnek). Standart ve serum örneklerinden 50 µL alınarak ELISA kuyucuklarına eklendi ve ardından üzerine 50 µL detection reagent A eklendi ve 37 °C’de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon ardından 3 kez yıkama işlemi yapıldı. Yıkamanın ardından detection reagent B eklendi ve 37 °C’de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 5 kez yıkandı. Yıkamanın ardından kuyucuklara 90 µL substrat (TMB) eklendi ve 37 °C’de karanlıkta 10-20 dk bekletildi. İnkübasyon sırasında bağlı enzim konjugatı renksiz kromojeni mavi renkli ürüne dönüştürdü. İnkübasyondan sonra kuyucuklara 50 µL stop çözeltisi eklendi. Stop çözeltisi eklendikten sonra mavi renk sarıya dönüştü. Standard ve serum örneklerinin optik absorbans değerleri 450 nm’de ELISA okuyucusunda ölçüldü.

3.7.4. Serum Ghrelin Ölçümü

Serum örneklerinde ghrelin seviyeleri, CEA991Ra katalog numaralı ticari ELISA kiti kullanılarak üretici firmanın (Cloud-Clone, Wuhan China) tavsiyeleri doğrultusunda belirlendi. Standart ve serum örneklerinden 50 µL alınıp ELISA kuyucuklarına eklendi. Üzerine 50 µL detection reagent A eklendi ve 37 °C’de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 3 kez yıkandı. Yıkamanın ardından 100 µL detection reagent B eklendi 37 °C’de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 5 kez yıkandı ve yıkama işleminin ardından kuyucuklara 90 µL substrat (TMB) eklendi ve 37 °C’de karanlıkta 10 dk bekletildi. İnkübasyon sırasında bağlı enzim konjugatı renksiz kromojeni mavi renkli ürüne dönüştürdü. İnkübasyondan sonra kuyucuklara 50 µL stop çözeltisi ilave edildi. Stop çözeltisi eklendikten sonra mavi renk sarıya dönüştü. Standard ve serum örneklerinin optik absorbans değerleri 450 nm’de ELISA okuyucusunda ölçüldü.

3.7.5. Serum Leptin Ölçümü

Serum örneklerinde Leptin seviyeleri, SEA084Ra katalog numaralı ticari ELISA kiti kullanılarak üretici firmanın (Cloud-Clone, Wuhan China) tavsiyeleri doğrultusunda belirlendi. Standart 2 kat dilüe edildi (250 µL standart dilüent ile 250 µL standart). Standart ve serum örneklerinden 100 µL alınarak ELISA kuyucuklarına koyuldu ve 37 °C’de 1 saat inkübe edildi. Daha sonra ELISA pleyti aspire edildi. Aspire edildikten sonra

100 µL detection reagent A eklendi ve 37 °C’de 1 saat inkübe edildi. Daha sonra 3 kez yıkandı. Yıkamanın ardından 100 µL detection reagent B eklendi ve 37 °C’de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 5 kez yıkandı. Yıkama işlemi sonrası kuyucuklara 90 µL substrat (TMB) eklendi ve 37 °C’ de karanlıkta 10 dk bekletildi. İnkübasyon sırasında bağlı enzim konjugatı renksiz kromojeni mavi renkli ürüne dönüştürdü. İnkübasyondan sonra kuyucuklara 50 µL stop çözeltisi eklendi. Stop çözeltisi ilavesinden sonra mavi renk sarıya dönüştü. Standard ve serum örneklerinin optik absorbans değerleri 450 nm’de ELISA okuyucusunda ölçüldü.

3.8. İstatistiksel analizler

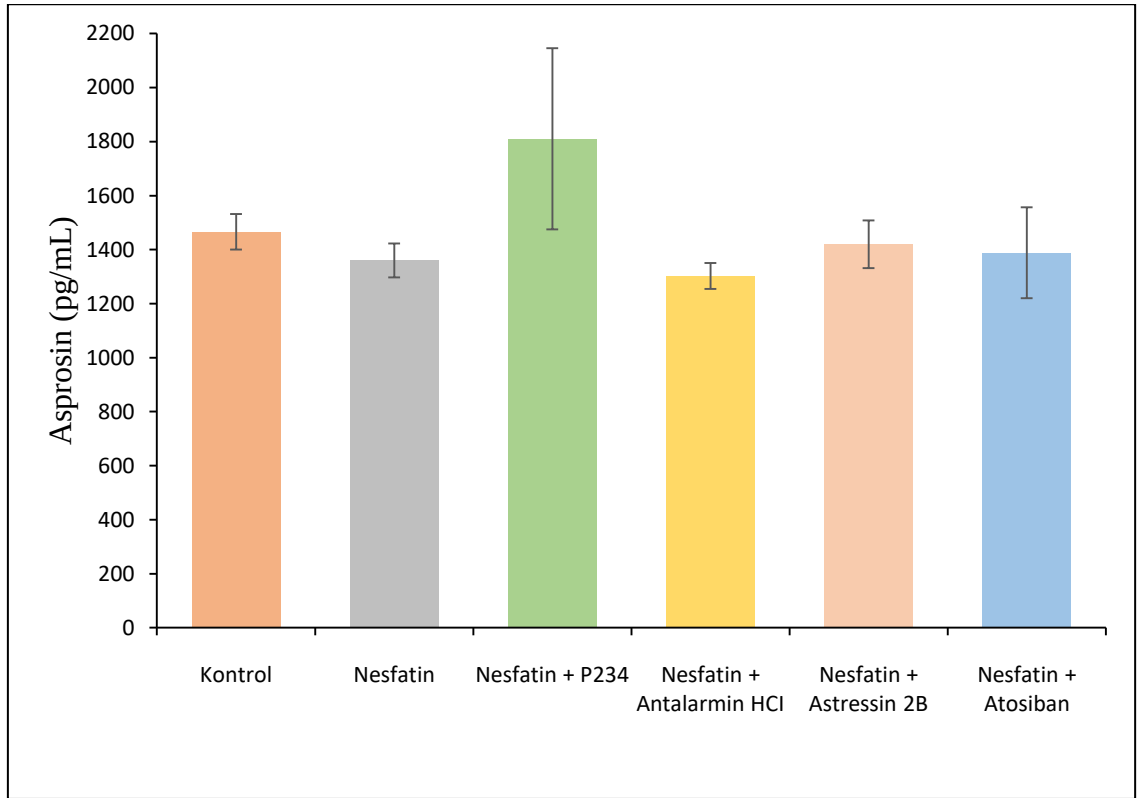
Verilerin istatistiksel analizinde Tukey testi kullanılmıştır. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Sonuçlar $\pm$ standart hata olarak sunulmuştur.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Analiz Sonuçları

4.1.1. Serum Asprosin Seviyeleri

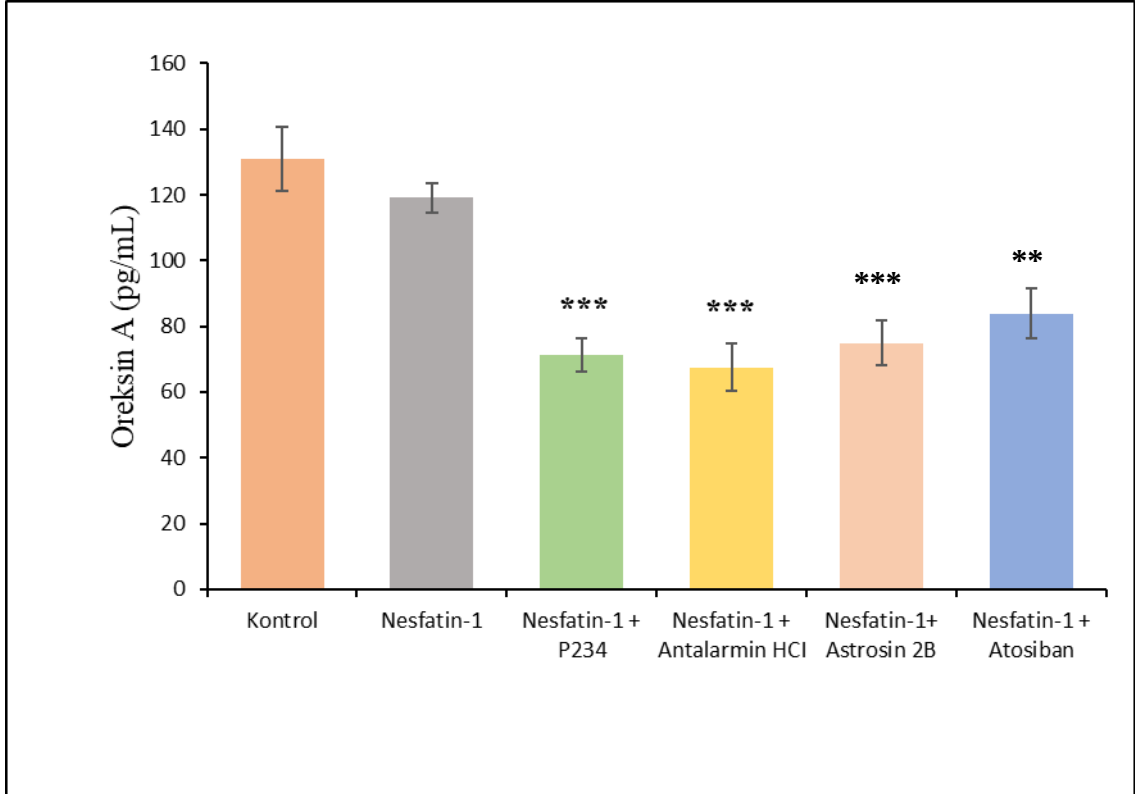
Serum asprosin seviyeleri hayvan deneyleri sonlandırıldıktan sonra biyokimyasal analiz yapılarak ölçülmüştür. Serum asprosin seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmamıştır. (Şekil 4).



Şekil 4. Tüm gruplarda serum asprosin seviyesi ölçüm değerleri.

4.1.2. Serum Orexin A Seviyeleri

Serum orexin A seviyeleri hayvan deneyleri sonlandırıldıktan sonra biyokimyasal analiz yapılarak ölçülmüştür. Nesfatin-1+p234, nesfatin-1+antalarmin HCl, nesfatin-1+astrosin 2B ($p<0,001$) ve nesfatin-1+atosiban ($p<0,01$) grubunda serum orexin A seviyeleri düşük bulunmuştur (Şekil 5).



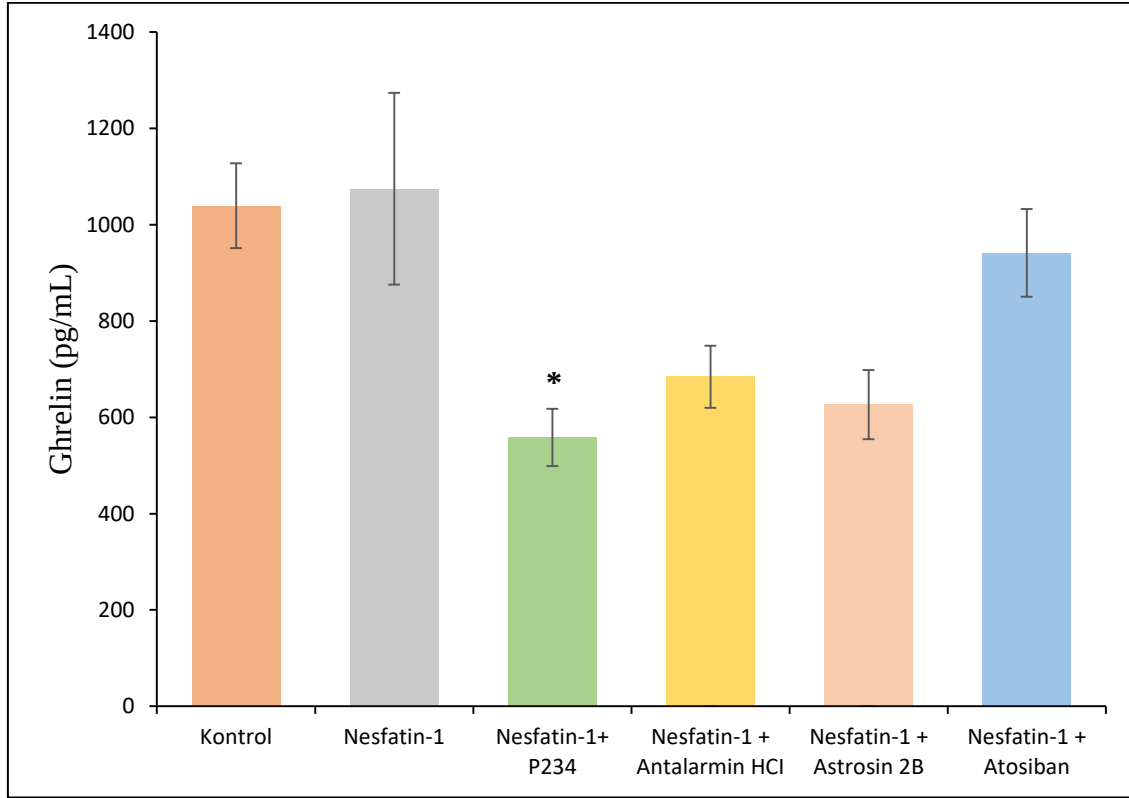
Şekil 5. Tüm gruplarda serum orexin A seviyesi ölçüm değerleri.

** : $p<0,01$

*** : $p<0,001$

4.1.3. Serum Ghrelin Seviyeleri

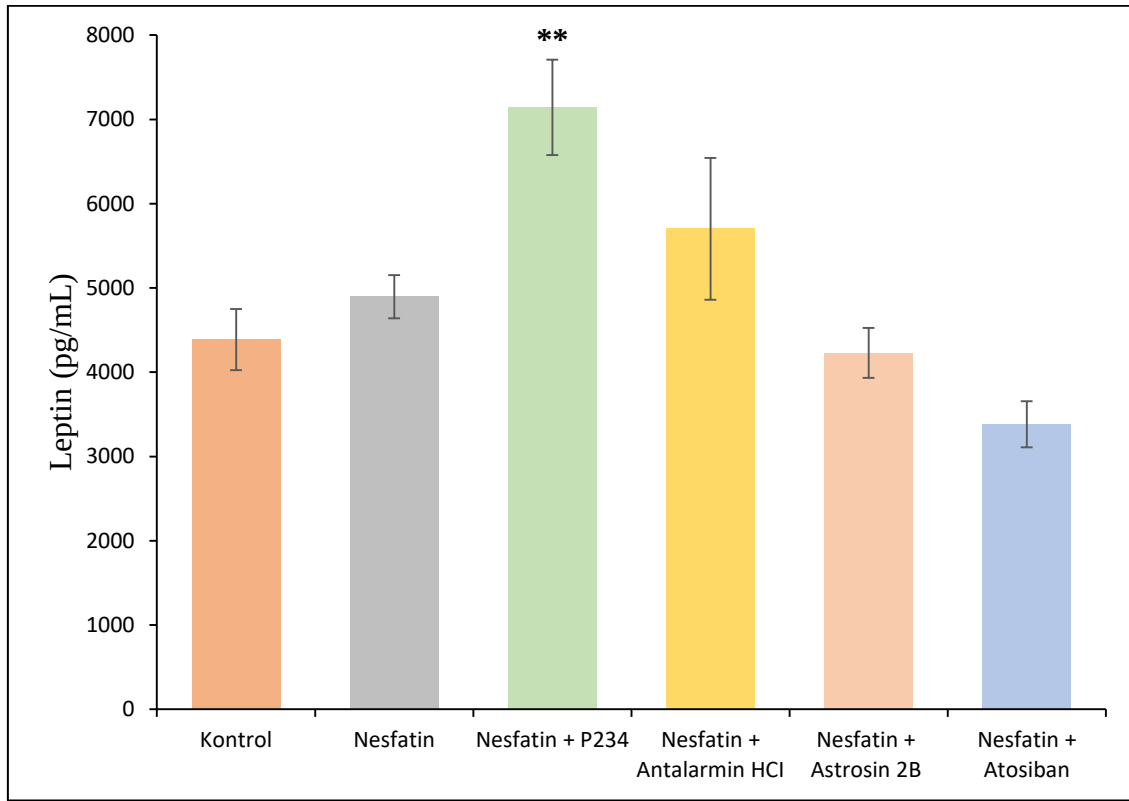
Serum ghrelin seviyeleri hayvan deneyleri sonlandırıldıktan sonra biyokimyasal analiz yapılarak ölçülmüştür. Nesfatin-1+p234 grubu serum ghrelin seviyesi düşük bulunmuştur. ($p<0,05$) (Şekil 6).



Şekil 6. Tüm gruplarda serum ghrelin seviyesi ölçüm değerleri.
*: $p<0,05$

4.1.4. Serum Leptin Seviyeleri

Serum leptin seviyeleri hayvan deneyleri sonlandırıldıktan sonra biyokimyasal analiz yapılarak ölçülmüştür. Nesfatin-1+ p234 grubu serum leptin yüksek bulunmuştur. ($p<0,01$) (Şekil 7).



Şekil 7. Tüm gruplarda serum leptin seviyesi ölçüm değerleri.
**: $p<0,01$

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışmasında i.c.v olarak enjekte edilen nesfatin-1'in serum ghrelin, serum leptin, oreksin A ve asprosin seviyelerine olan etkisi incelendi. Kontrol grubu, nesfatin-1 grubu nesfatin-1+p234 grubu, nesfatin-1+antalarmin HCI grubu, nesfatin-1+atosiban grubu ve nesfatin-1+astressin 2B grubu olmak üzere toplam 6 deney grubu bulunmaktadır.

Yapılan çalışmalar nesfatin-1'in beslenme davranışı üzerindeki baskılayıcı etkilerini CRH, TRH ve hipotalamik nöronal histaminin, melanokortinin, oksitosin ve arginin vazopressin nöronları aracılığıyla gerçekleştirdiğini göstermektedir. (5-7, 78,79).

Nesfatin-1 grubu serum leptin, ghrelin, oreksin ve asprosin seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır.

I.c.v olarak enjekte edilen nesfatin-1+p234 grubu serum oreksin A seviyesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltmıştır ($p<0,001$). Serum ghrelin seviyesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltmıştır ($p<0,05$). Serum leptin seviyesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırmıştır ($p<0,01$). Serum asprosin seviyesinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır.

I.c.v olarak enjekte edilen nesfatin-1+ antalarmin HCI serum oreksin A seviyesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltmıştır ($p<0,01$). Serum leptin, serum ghrelin ve serum asprosin seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır.

I.c.v olarak enjekte edilen nesfatin-1+ atosiban grubu serum oreksin A seviyesini istatistiksel olarak anlamlı olarak azaltmıştır ($p<0,01$). Serum leptin, serum ghrelin ve serum asprosin seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır.

I.c.v olarak enjekte edilen nesfatin-1 + astressin 2B grubu serum oreksin A seviyesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltmıştır ($p<0,001$). Serum leptin, serum ghrelin ve serum asprosin seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır.

Bu çalışmada serum leptin seviyesi i.c.v olarak enjekte edilen nesfatin-1, nesfatin-1+ antalarmin HCI, nesfatin-1+astressin 2B, nesfatin-1+ atosiban enjeksiyonu serum leptin düzeyinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Nesfatin-1+p234 grubu serum leptin seviyesini artırmıştır.

Önceki çalışmalara bakıldığında bir çalışmada antisens nesfatin-1'in i.c.v uygulamasından sonra HD-GLP-1 (glukagon benzeri peptit), CCK-8 (kolesistokinin) veya LD-GLP-1 ve LD-leptin kombinasyonunun i.p uygulamasının gıda alımı üzerindeki etkilerine bakılmıştır. Antisens nesfatin-1 CCK-8, HD-GLP-1 veya LD-GLP-1 ve LD-leptin kombinasyonu tarafından tetiklenen gıda alımını CRH₂ reseptörüne bağlı bir kısmı aracılığıyla baskılayacağını göstermiştir. Çalışmanın sonucu olarak beyin sapındaki nesfatin-1 eksprese eden nöronların, dolaşımdaki glukagon benzeri peptid (GLP-1) ve leptin seviyelerini algılamada önemli bir rol oynayabileceğini ve merkezi uygulanan nesfatin-1 yoluyla beslenmeyi baskılamak için hareket edebileceğini göstermektedir (95).

Yapılan başka bir çalışmada ise sonuçlar, PVN'deki NUCB2/nesfatin-1'in leptinin anoreksijenik etkisine büyük ölçüde aracılık ettiğini ve PVN'ye özgü NUCB2 yıkımının, leptinin gıda alımını engelleyememesiyle sonuçlandığını ortaya çıkardı göstermektedir (96). Mevcut çalışmalar nesfatin-1'in leptinin anoreksijenik etkisine aracılık ettiğini göstermektedir. Bu tez çalışmasında ise sadece nesfatin-1+p234 grubunda serum leptin seviyesi anlamlı bir şekilde artmıştır. Bunun nedeni mevcut çalışmalarda leptinin gıda alımının üzerine etkisine bakılması ve PVN NUCB2/nesfatin-1 nöronlarının incelenmesi bu tez çalışmasında ise direkt olarak serum leptin seviyesine bakılması olabilir. Ayrıca verilen antalarmin HCI, atosiban, astressin antagonistleri nesfatin-1'in etkisini ortadan kaldırmamış olabilir.

Yapılan başka bir çalışmada menopoz öncesi ve sonrası obez ve obez olmayan kadınlarda leptin, nesfatin-1 ve kisspeptinin rollerini belirlemektir. Leptin, nesfatin-1 ve kisspeptin arasında da korelasyon saptanmamıştır (97). Bu yapılan çalışmanın sonucu bizim çalışmamızdaki nesfatin-1 grubu, nesfatin-1+ antalarmin HCI grubu, nesfatin-1+ atosiban grubu ve nesfatin-1+ astressin 2B grubunun serum leptin seviyesine etki etmemesini desteklemektedir.

I.c.v nesfatin-1 enjeksiyonu nesfatin-1+p234 grubu haricindeki diğer gruplarda serum ghrelin seviyesinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Serum ghrelin seviyesi nesfatin-1+p234 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır. Yapılan bir çalışmada i.p desasil grelinin, serbestçe beslenen sıçanlarda periferik ghrelin tarafından indüklenen oreksijenik etkiyi bloke ettiğini ve ARC'nin ventromedial kısmında ghrelin tarafından indüklenen Fos ekspresyonunu azalttığını gösterilmiştir. Çift boyama, desasil

ghrelin'in ARC'de ghrelin ile aktive olan nöronların inhibisyonu üzerindeki etkisine, nesfatin-1 immüno pozitif nöronlar aracılığıyla aracılık edilebileceğini ortaya çıkardı (98).

Başka bir çalışmada ise ARC'a nesfatin-1 uygulamasının, ARC'taki ghreline duyarlı GD nöronlarının ateşleme aktivitesini değiştirdiğini ve bir melanokortin 3/4 reseptörü antagonisti SHU9119 ön tedavisi tarafından kısmen bloke edilen gastrik motiliteyi azalttığını gösterilmiştir. Bu nedenle, eksojen nesfatin-1, melanokortin nöronal yolu yoluyla gastrik motiliteyi düzenlemek için ARC üzerinde hareket edebilir. Ek olarak, PVN'nin elektriksel stimülasyonu, ARC'deki ghreline yanıt veren GD nöronlarının ateşleme aktivitesini değiştirmiştir ve gastrik motiliteyi desteklemiştir. Bununla birlikte, ARC'ta bir anti-NUCB2/nesfatin-1 antikoru ile ön tedavi, PVN'nin elektriksel stimülasyonu ile indüklenen grelin-yanıtlı GD-E nöronlarının ateşleme hızını arttırdı, ancak grelin-yanıtlı GD-I nöronlarındaki oranı düşürmüştür. Mide hareketliliği, ARC'ta bir anti-NUCB2/nesfatin-1 antikoru ile ön tedavi ile artırıldı. Ayrıca retrograd izleme ve immünohistokimya boyama deneyleri, NUCB2/nesfatin-1/FG çift etiketli nöronların PVN'de ifade edildiğini gösterdi. Bu, ARC'ın gastrik hareketliliğin düzenlenmesinde rol oynayabileceğini ve PVN'nin düzenleme sürecinde önemli bir rol oynayabileceğini gösterir.

ARC'deki nesfatin-1'in gastrik motiliteye nasıl aracılık ettiğine ilişkin potansiyel mekanizmaları daha fazla araştırmak için bir elektrofizyolojik teknik uygulandı. Burada açıklanan elektrofizyolojik veriler, ARC'a nesfatin-1 enjeksiyonunun, ghreline yanıt veren GD-E nöronlarının ani frekansında bir azalmaya, ancak ghreline yanıt veren GD-I nöronlarında bir artışa yol açtığını göstermektedir. Bu, nesfatin-1'in GD yanıt nöronları üzerindeki grelin düzenlenmesinde yer alabileceğini düşündürür (11). Literatürde ghrelin ile ilgili yapılan çalışmalar nesfatin-1+ p234 grubunun serum ghrelin seviyesini azaltması ile uyumludur. Ancak diğer gruplar serum ghrelin seviyesinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Bunun nedeni mevcut çalışmalar nesfatin-1'in ghreline etkisine santralde bakması bizim çalışmamızda ise serumda ghrelin seviyesine bakılması olabilir. Ayrıca nesfatin-1 ile birlikte verilen antagonistler nesfatin-1'in etkisini ortadan kaldırmada etkili olmamış olabilir.

Bu tez çalışmasında nesfatin-1 grubu serum oreksin A seviyesine etki etmemiştir. Diğer gruplar; nesfatin-1+p234, nesfatin-1+antalarmin HCl, nesfatin-1+atosiban ve nesfatin-1+astressin 2B grubu serum oreksin A seviyesini azaltmıştır.

Yapılan bir çalışmada nesfatin-1 ile oreksin-A nöronlarının birbirleri üzerindeki direkt etkileri araştırılmıştır. Nesfatin-1 ve oreksin-A i.p olarak enjekte edilmiştir. Nesfatin-1 peptidi verilmiş deneklerde oreksinerjik nöronların aktivitesindeki değişikliklere bakılmıştır. Nöronal aktivasyonun immünohistokimyasal olarak belirlenebilmesi için nükleusta lokalize c-Fos, pSTAT5 veya pCREB proteinlerinin varlığının incelenmesi temel yaklaşım olarak kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda nesfatin-1 ve oreksin A peptidlerinin birbirleri üzerinde aktive edici etkisinin olmadığını, dolayısıyla besin alınımlı sonrasında artan nesfatin-1 peptidinin oreksin A nöronları üzerinde ya da açlık sonrasında artan oreksin A peptidinin nesfatin-1 nöronları üzerinde direkt/indirekt etkisinin olmadığını göstermiştir (99).

Nesfatin-1 grubu serum oreksin A seviyesine etki etmemiştir. Bu bulgu literatür ile uyumludur. Fakat nesfatin-1+p234 grubu, nesfatin-1+antalarmin HCI grubu, nesfatin-1+atosiban grubu ve nesfatin-1+astressin 2B grubu serum oreksin A seviyesini azaltmıştır. Bunun nedeni nesfatin-1'in anatagonistler ile birlikte verilmesi ve antagonistlerin nesfatin-1'in etkisini baskılayarak bu etkinin ortaya çıkmasını sağlamış olabilir. Ayrıca bu tez çalışmasında nesfatin-1 i.c.v olarak enjekte edilmiştir. Mevcut literatür çalışmasında ise i.p olarak enjekte edilmiştir ve santral etkiye bakılmıştır. Bu tez çalışmasında ise nesfatin-1'in oreksin A üzerindeki periferik etkisine bakılmıştır.

Serum asprosin seviyesini hiçbir nesfatin-1 grubu anlamlı olarak değiştirememiştir. Sadece nesfatin-1 uygulaması ve nesfatin-1 ile birlikte p234, antalarmin HCI, astressin 2B ve atosiban antagonistlerinin uygulanması serum asprosinini değitirememiştir. Literatürde de nesfatin-1 ve asprosin arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Bu bilgilere bakarak nesfatin-1 ve asprosin arasında herhangi bir bağlantı olmadığı yorumunu yapabiliriz.

Sonuç olarak çalışmamızda nesfatin-1 serum ghrelin ve oreksin A seviyesini azaltmıştır serum leptin düzeyini ise artırmıştır. Serum asprosin seviyesine etki etmemiştir. Bu sonuçlar nesfatin-1'in açlık tokluk sürecinde rol alan peptidleri etkileyebileceğini göstermiştir.

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* 443:709-12.
2. Stengel A, Taché Y (2010). Nesfatin-1 role as possible new potent regulator of food intake. *Regul Pept* 163:18-23.
3. Brailoiu GC, Dun SL, Brailoiu E, Inan S, Yang J, Chang JK, Dun NJ (2007). Nesfatin-1: distribution and interaction with a G protein-coupled receptor in the rat brain. *Endocrinology* 148:5088-94.
4. Price CJ, Samson WK, Ferguson AV (2008). Nesfatin-1 inhibits NPY neurons in the arcuate nucleus. *Brain Res* 1230:99-106.
5. Nakata M, Gantulga D, Santoso P, Zhang B, Masuda C, Mori M, Okada T, Yada T (2016). Paraventricular NUCB2/nesfatin-1 supports oxytocin and vasopressin neurons to control feeding behavior and fluid balance in male mice. *Endocrinology* 157:2322-32.
6. Stengel A, Goebel M, Wang L, Rivier J, Kobelt P, Mönnikes H, Lambrecht NW, Taché Y (2009). Central nesfatin-1 reduces dark-phase food intake and gastric emptying in rats: differential role of corticotropin-releasing factor2 receptor. *Endocrinology* 150:4911-9.
7. Gotoh K, Masaki T, Chiba S, Ando H, Shimasaki T, Mitsutomi K, Fujiwara K, Katsuragi I, Kakuma T, Sakata T, Yoshimatsu H (2013). Nesfatin-1, corticotropin-releasing hormone, thyrotropin-releasing hormone, and neuronal histamine interact in the hypothalamus to regulate feeding behavior. *J Neurochem* 124:90-9.
8. Merali Z, Cayer C, Kent P, Anisman H (2008). Nesfatin-1 increases anxiety- and fear-related behaviors in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 201:115-23.
9. 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)* 2:775-84.

10. 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* 132:266-75.
11. Li ZL, Xu L, Sun XR, Guo FF, Gong YL, Gao SL (2013). Central nesfatin-1 influences the excitability of ghrelin-responsive gastric distension neurons in the arcuate nucleus and reduces gastric motility in rats. *Eur J Neurosci* 38:3636-43.
12. Ayada C, Turgut G, Turgut S, Güçlü Z (2015). The effect of chronic peripheral nesfatin-1 application on blood pressure in normal and chronic restraint stressed rats: related with circulating level of blood pressure regulators. *Gen Physiol Biophys* 34:81-8.
13. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-32.
14. Balthasar N, Coppari R, McMinn J, Liu SM, Lee CE, Tang V, Kenny CD, McGovern RA, Chua SC Jr, Elmquist JK, Lowell BB (2004). Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis. *Neuron* 42:983-91.
15. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402:656-6.
16. Duerrschmid C, He Y, Wang C, Li C, Bournat JC, Romere C, Saha PK, Lee ME, Phillips KJ, Jain M, Jia P, Zhao Z, Farias M, Wu Q, Milewicz DM, Sutton VR, Moore DD, Butte NF, Krashes MJ, Xu Y, Chopra AR (2017). Asprosin is a centrally acting orexigenic hormone. *Nat Med* 23:1444-1453.
17. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92:573-85.
18. Guyton AC, Hall JE (2017). *Textbook of Medical Physiology. Tıbbi Fizyoloji*. 13th ed. Çeviren/Çeviri Editörü: Yeğen BÇ, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Sti. İstanbul, 889-897.
19. Harrold JA, Dovey TM, Blundell JE, Halford JC (2012). CNS regulation of appetite. *Neuropharmacology*. 63:3-17.
20. Güldemir, H. (2018). Yüksek yağlı diyetin açlık-tokluk metabolizmasında görevli hormonlar ve nöropeptidler üzerine etkileri. *Sağlık Bilimleri Dergisi* 27,239-344.

21. Wilding JP (2002). Neuropeptides and appetite control. *Diabet Med* 19:619-27.
22. Romere C, Duerschmid C, Bournat J, Constable P, Jain M, Xia F, Saha PK, Del Solar M, Zhu B, York B, Sarkar P, Rendon DA, Gaber MW, LeMaire SA, Coselli JS, Milewicz DM, Sutton VR, Butte NF, Moore DD, Chopra AR (2016). Asprosin, a fasting-induced glucogenic protein hormone. *Cell* 165:566-79.
23. Hoffmann JG, Xie W, Chopra AR (2020). Energy regulation mechanism and therapeutic potential of asprosin. *Diabetes* 69:559-566.
24. Li E, Shan H, Chen L, Long A, Zhang Y, Liu Y, Jia L, Wei F, Han J, Li T, Liu X, Deng H, Wang Y (2019). OLFR734 Mediates glucose metabolism as a receptor of asprosin. *Cell Metab* 30:319-328.e8.
25. de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS 2nd, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG (1998). The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:322-7.
26. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92:573-85.
27. Karteris E, Chen J, Rande HS (2004). Expression of human prepro-orexin and signaling characteristics of orexin receptors in the male reproductive system. *J Clin Endocrinol Metab* 89:1957-62.
28. Kukkonen JP, Leonard CS (2014). Orexin/hypocretin receptor signalling cascades. *Br J Pharmacol* 171:314-31.
29. Sakurai T (2005). Roles of orexin/hypocretin in regulation of sleep/wakefulness and energy homeostasis. *Sleep Med Rev* 9:231-41.
30. Marcus JN, Aschkenasi CJ, Lee CE, Chemelli RM, Saper CB, Yanagisawa M, Elmquist JK (2001). Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J Comp Neurol* 435:6-25.
31. Xu TR, Yang Y, Ward R, Gao L, Liu Y (2013). Orexin receptors: multi-functional therapeutic targets for sleeping disorders, eating disorders, drug addiction, cancers and other physiological disorders. *Cell Signal* 25:2413-23.

32. Kastin AJ, Akerstrom V (1999). Orexin A but not orexin B rapidly enters brain from blood by simple diffusion. *J Pharmacol Exp Ther* 289:219-23.
33. Imperatore R, Palomba L, Cristino L (2017). Role of orexin-a in hypertension and obesity. *Curr Hypertens Rep* 19:34.
34. Fantuzzi G, Faggioni R (2000). Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol* 68:437-46.
35. Ahima RS, Osei SY (2004). Leptin signaling. *Physiol Behav* 81:223-41.
36. Auwerx J, Staels B (1998). Leptin. *Lancet* 351:737-42.
37. Zhang Y, Chua S Jr (2017). Leptin function and regulation. *Compr Physiol* 8:351-369.
38. Aslan K, Serdar Z, Tokullugil H A (2004). Multifonksiyonel hormon: leptin. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 30:113-118.
39. Zhang F, Chen Y, Heiman M, Dimarchi R (2005). Leptin: structure, function and biology. *Vitam Horm* 71:345-72.
40. Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, Kolaczynski JW, Heiman ML, Hale J (1996). Evidence of free and bound leptin in human circulation. *J Clin Invest* 98:1277–82.
41. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, José F. Caro MD (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 334:292-5.
42. Ostlund RE Jr, Yang JW, Klein S, Gingerich R (1996). Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age, and metabolic covariates. *J Clin Endocrinol Metab* 81:3909-13.
43. Boden G, Chen X, Mozzoli M, Ryan I (1996). Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 81:3419-23.
44. van Swieten MM, Pandit R, Adan RA, van der Plasse G (2014). The neuroanatomical function of leptin in the hypothalamus. *J Chem Neuroanat* 61-62:207-20.
45. Kolaczynski JW, Ohannesian JP, Considine RV, Marco CC, Caro JF (1996). Response of leptin to short-term and prolonged overfeeding in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 81:4162-5.
46. Wang Y, Ali Y, Lim CY, Hong W, Pang ZP, Han W (2014). Insulin-stimulated leptin secretion requires calcium and PI3K/Akt activation. *Biochem J* 458:491-8.
47. Leal-Cerro A, Soto A, Martínez MA, Dieguez C, Casanueva FF (2001). Influence of cortisol status on leptin secretion. *Pituitary* 4:111-6.

48. Sliker LJ, Sloop KW, Surface PL, Kriauciunas A, LaQuier F, Manetta J, Bue-Valleskey J, Stephens TW (1996). Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J Biol Chem* 271: 5301-4.
49. Fahlbusch FB, Ruebner M, Volkert G, Offergeld R, Hartner A, Menendez-Castro C, Strick R, Rauh M, Rascher W, Dötsch J (2012). Corticotropin-releasing hormone stimulates expression of leptin, 11beta-HSD2 and syncytin-1 in primary human trophoblasts. *Reprod Biol Endocrinol* 12;10:80.
50. Assinder SJ, Boumelhem BB (2021). Oxytocin stimulates lipolysis, prostaglandin E₂ synthesis, and leptin secretion in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 534:111381.
51. Escobar-Morreale HF, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G (1997). Thyroid hormones influence serum leptin concentrations in the rat. *Endocrinology* 138:4485-8.
52. Boucsein A, Kamstra K, Tups A (2021). Central signalling cross-talk between insulin and leptin in glucose and energy homeostasis. *J Neuroendocrinol* 33:e12944.
53. Leshan RL, Björnholm M, Münzberg H, Myers MG Jr (2006). Leptin receptor signaling and action in the central nervous system. *Obesity (Silver Spring)* 5:208-212.
54. Münzberg H, Morrison CD (2015). Structure, production and signaling of leptin. *Metabolism* 64:13-23.
55. Kalra SP (2008). Disruption in the leptin-NPY link underlies the pandemic of diabetes and metabolic syndrome: new therapeutic approaches. *Nutrition* 24:820-6.
56. Baldini G, Phelan KD (2019). The melanocortin pathway and control of appetite-progress and therapeutic implications. *J Endocrinol* 241:1-33.
57. Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdán MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411:480-4.
58. Morrison CD (2009). Leptin signaling in brain: A link between nutrition and cognition? *Biochim Biophys Acta* 1792:401-8.
59. Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M (2000). Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 141:4255-61.

60. 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* 31:357-69.
61. Gualillo O, Caminos J, Blanco M, García-Caballero T, Kojima M, Kangawa K, Dieguez C, Casanueva F (2001). Ghrelin, a novel placental-derived hormone. *Endocrinology* 142:788-94.
62. Korbonits M, Kojima M, Kangawa K, Grossman AB (2000). Presence of ghrelin in normal and adenomatous human pituitary. *Endocrine* 14:101-4
63. Mori K, Yoshimoto A, Takaya K, Hosoda K, Ariyasu H, Yahata K, Mukoyama M, Sugawara A, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K (2000). Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin. *FEBS Lett* 486:213-6
64. Kirsz K, Zieba DA (2011). Ghrelin-mediated appetite regulation in the central nervous system. *Peptides* 32:2256-64.
65. Howick K, Griffin BT, Cryan JF, Schellekens H (2017). From belly to brain: targeting the ghrelin receptor in appetite and food intake regulation. *Int J Mol Sci* 18:273.
66. Iwakura H, Ariyasu H, Hosoda H, Yamada G, Hosoda K, Nakao K, Kangawa K, Akamizu T (2011). Oxytocin and dopamine stimulate ghrelin secretion by the ghrelin-producing cell line, MGN3-1 in vitro. *Endocrinology* 152:2619-25.
67. Bali A, Jaggi AS (2016). An integrative review on role and mechanisms of ghrelin in stress, anxiety and depression. *Curr Drug Targets* 17:495-507.
68. Saad MF, Bernaba B, Hwu CM, Jinagouda S, Fahmi S, Kogosov E, Boyadjian R (2002). Insulin regulates plasma ghrelin concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3997-4000.
69. Konturek SJ, Konturek JW, Pawlik T, Brzozowski T (2004). Brain-gut axis and its role in the control of food intake. *J Physiol Pharmacol* 55:137-54.
70. Müller TD, Nogueiras R, Andermann ML, Andrews ZB, Anker SD, Argente J, Batterham RL, Benoit SC, Bowers CY, Broglio F, Casanueva FF, D'Alessio D, Depoortere I, Geliebter A, Ghigo E, Cole PA, Cowley M, Cummings DE, Dagher A, Diano S, Dickson SL, Diéguez C, Granata R, Grill HJ, Grove K, Habegger KM, Heppner K, Heiman ML, Holsen L, Holst B, Inui A, Jansson JO, Kirchner H, Korbonits M, Laferrère B, LeRoux CW, Lopez M, Morin S, Nakazato M, Nass R, Perez-Tilve D, Pfluger PT, Schwartz TW, Seeley RJ, Sleeman M, Sun Y, Sussel L, Tong J, Thorner

- MO, van der Lely AJ, van der Ploeg LH, Zigman JM, Kojima M, Kangawa K, Smith RG, Horvath T, Tschöp MH (2015). Ghrelin. *Mol Metab* 4:437-60.
71. Korbonits M, Goldstone AP, Gueorguiev M, Grossman AB (2004). Ghrelin a hormone with multiple functions. *Front Neuroendocrinol* 25:27-68.
 72. Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S (2001). A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409:194-8.
 73. García-Galiano D, Navarro VM, Gaytan F, Tena-Sempere M (2010). Expanding roles of NUCB2/nesfatin-1 in neuroendocrine regulation. *J Mol Endocrinol* 45:281-90.
 74. Goebel-Stengel M, Wang L, Stengel A, Taché Y (2011). Localization of nesfatin-1 neurons in the mouse brain and functional implication. *Brain Res* 1396:20-34.
 75. Shimizu H, Ohsaki A, Oh-I S, Okada S, Mori M (2009). A new anorexigenic protein, nesfatin-1. *Peptides* 30:995-8.
 76. Kim J, Chung Y, Kim H, Im E, Lee H, Yang H (2014). The tissue distribution of nesfatin-1/nucb2 in mouse. *Dev Reprod* 18:301-9.
 77. Shimizu H, Oh-I S, Hashimoto K, Nakata M, Yamamoto S, Yoshida N, Eguchi H, Kato I, Inoue K, Satoh T, Okada S, Yamada M, Yada T, Mori M (2009). Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: the leptin-independent mechanism. *Endocrinology* 150:662-71.
 78. Maejima Y, Sedbazar U, Suyama S, Kohno D, Onaka T, Takano E, Yoshida N, Koike M, Uchiyama Y, Fujiwara K, Yashiro T, Horvath TL, Dietrich MO, Tanaka S, Dezaki K, Oh-I S, Hashimoto K, Shimizu H, Nakata M, Mori M, Yada T (2009). Nesfatin-1-regulated oxytocinergic signaling in the paraventricular nucleus causes anorexia through a leptin-independent melanocortin pathway. *Cell Metab* 10:355-65.
 79. Tanida M, Gotoh H, Yamamoto N, Wang M, Kuda Y, Kurata Y, Mori M, Shibamoto T (2015). Hypothalamic Nesfatin-1 stimulates sympathetic nerve activity via hypothalamic ERK signaling. *Diabetes* 64:3725-36.
 80. 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.* 28:1545-53.
 81. Spina MG, Basso AM, Zorrilla EP, Heyser CJ, Rivier J, Vale W, Merlo-Pich E, Koob GF (2000). Behavioral effects of central administration of the novel CRF antagonist astressin in rats. *Neuropsychopharmacology* 22:230-9.

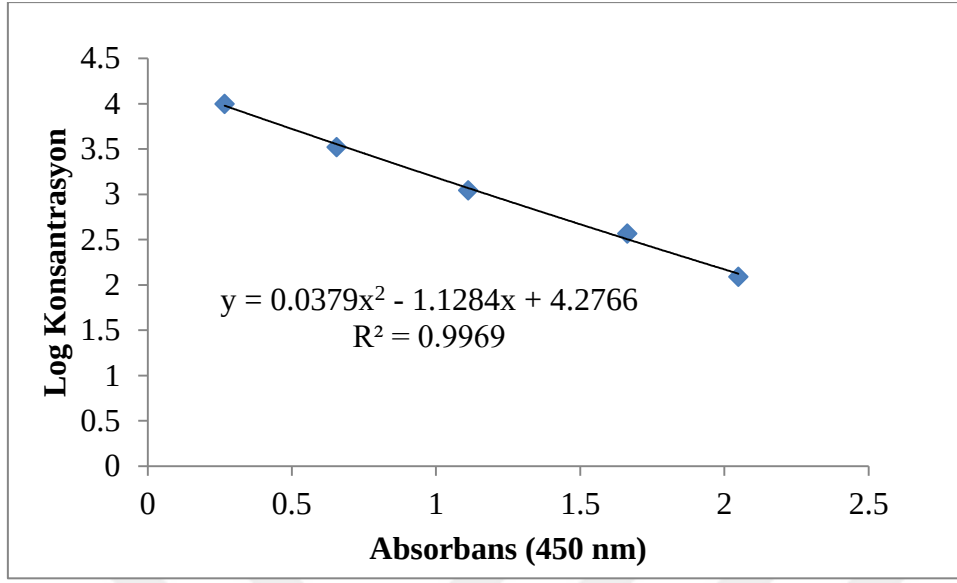
82. Rivier JE, Rivier CL (2014). Corticotropin-releasing factor peptide antagonists: design, characterization and potential clinical relevance. *Front Neuroendocrinol* 35:161-70.
83. Valdez GR (2006). Development of CRF1 receptor antagonists as antidepressants and anxiolytics: progress to date. *CNS Drugs* 20:887-96.
84. Rivier JE, Kirby DA, Lahrichi SL, Corrigan A, Vale WW, Rivier CL (1999). Constrained corticotropin releasing factor antagonists (astressin analogues) with long duration of action in the rat. *J Med Chem* 42:3175-82.
85. Deak T, Nguyen KT, Ehrlich AL, Watkins LR, Spencer RL, Maier SF, Licinio J, Wong ML, Chrousos GP, Webster E, Gold PW (1999). The impact of the nonpeptide corticotropin-releasing hormone antagonist antalarmin on behavioral and endocrine responses to stress. *Endocrinology* 140:79-86.
86. Zingg HH, Laporte SA (2003). The oxytocin receptor. *Trends Endocrinol Metab* 14:222-7.
87. Tena-Sempere M, Felip A, Gómez A, Zanuy S, Carrillo M (2012). Comparative insights of the kisspeptin/kisspeptin receptor system: lessons from non-mammalian vertebrates. *Gen Comp Endocrinol* 175:234-43.
88. Clarkson J, d'Anglemont de Tassigny X, Colledge WH, Caraty A, Herbison AE (2009). Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. *J Neuroendocrinol* 21:673-82.
89. Roseweir AK, Kauffman AS, Smith JT, Guerriero KA, Morgan K, Pielecka-Fortuna J, Pineda R, Gottsch ML, Tena-Sempere M, Moenter SM, Terasawa E, Clarke IJ, Steiner RA, Millar RP (2009). Discovery of potent kisspeptin antagonists delineate physiological mechanisms of gonadotropin regulation. *J Neurosci* 29:3920-9.
90. 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* 48:15-20.
91. 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:R798-804.
92. Pan W, Hsueh H, Kastin A J (2007). Nesfatin-1 crosses the blood-brain barrier without saturation. *Peptides* 28:2223-8.
93. Paxinos, G, Watson, C (2006). "The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 6th edn.". *Journal of Anatomy*. New York: Academic Press.

94. Aydin S (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* 72:4-15.
95. Saito R, So M, Motojima Y, Matsuura T, Yoshimura M, Hashimoto H, Yamamoto Y, Kusuhara K, Ueta Y (2016). Activation of nesfatin-1-containing neurones in the hypothalamus and brainstem by peripheral administration of anorectic hormones and suppression of feeding via central nesfatin-1 in rats. *J neuroendocrinol.* 28(9).
96. Darambazar G, Nakata M, Okada T, Wang L, Li E, Shinozaki A, Motoshima M, Mori M, Yada T (2015). Paraventricular NUCB2/nesfatin-1 is directly targeted by leptin and mediates its anorexigenic effect. *Biochem Biophys Res Commun* 456:913-8.
97. Çelik F, Belviranlı M, Okudan N. Circulating levels of leptin, nesfatin-1 and kisspeptin in postmenopausal obese women (2016). *Arch Physiol Biochem* 122:195-199.
98. Inhoff T, Mönnikes H, Noetzel S, Stengel A, Goebel M, Dinh QT, Riedl A, Bannert N, Wisser AS, Wiedenmann B, Klapp BF, Taché Y, Kobelt P (2008). Desacyl ghrelin inhibits the orexigenic effect of peripherally injected ghrelin in rats. *Peptides* 29:2159-68.
99. Gök Yurtseven D, Minbay Z, Eyigör Ö (2019). Nesfatin-1 ve oreksin a nöronları arasındaki etkileşimin immünohistokimyasal olarak araştırılması. *Uludağ Tıp Derg.* 45: 243-249.

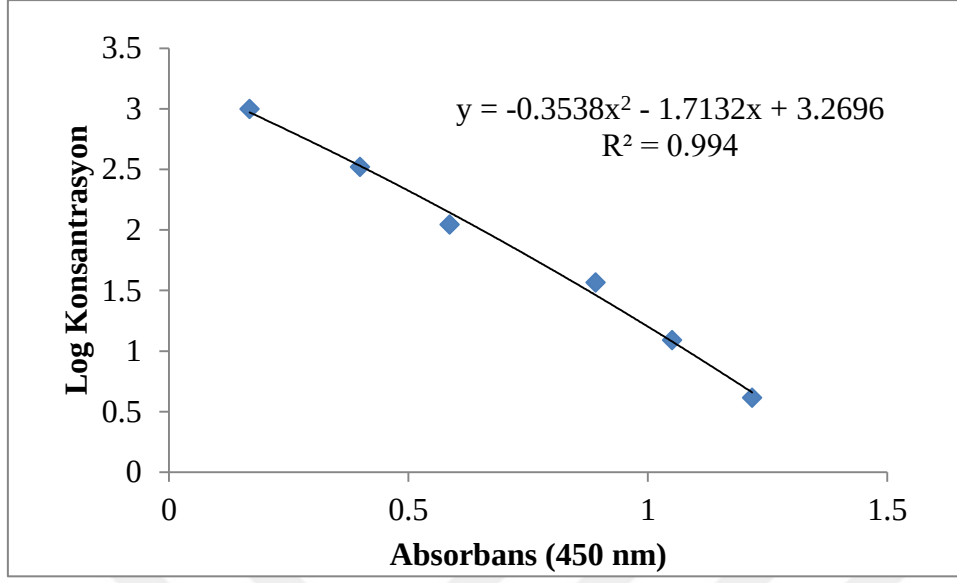


EKLER

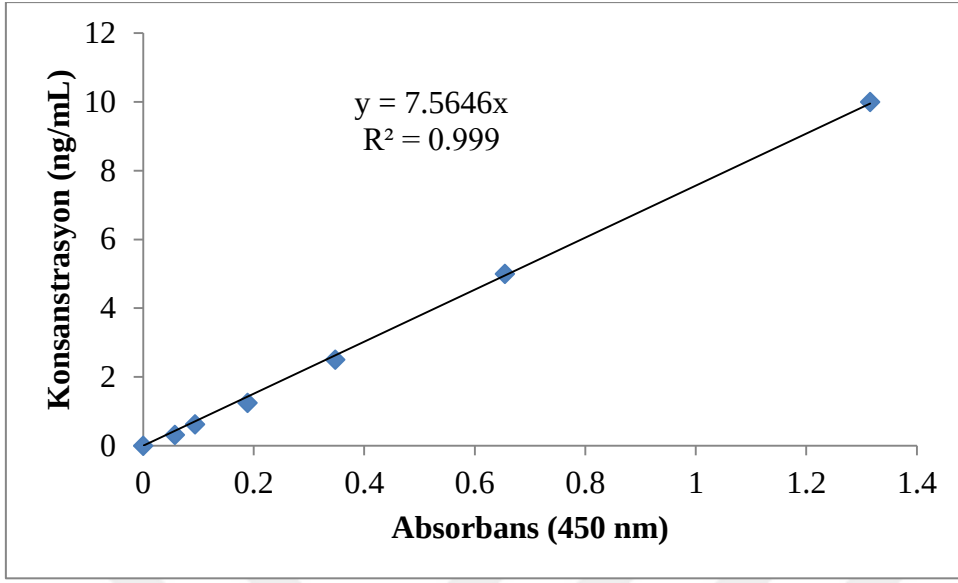
Ek 1. Ghrelin standart grafiđi



Ek 2. Orexin A Standart Grafiđi



Ek 3. Leptin Standart Grafiđi



Ek 4. Asprosin Standart Grafiđi

