

**T.C.**  
**FIRAT ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SIÇAN AORT'UNDA KASILMA-GEVŞEME**  
**MEKANİZMASI ÜZERİNE NESFATİN-1' İN**  
**ETKİLERİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Ali BARUTÇU**

**2015**

**ONAY SAYFASI**

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

*Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü*

Bu tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR

*Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı*

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans

Tezi olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Emine KAÇAR

*Danışman*

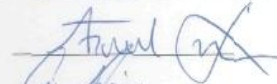


*Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri*

Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR



Prof. Dr. Ahmet AYAR



Yrd. Doç. Dr. Emine KAÇAR



.....

\_\_\_\_\_

.....

\_\_\_\_\_

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilimsel ve akademik tecrübesiyle bana daima yol gösteren danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Emine KAÇAR'a, çalışmalarım sırasında ve eğitimim süresince yardım ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim değerli hocam Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR'a, deney ve istatistiksel analiz aşamasında destek ve yardımlarını esirgemeyen çok kıymetli hocalarım Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Mete ÖZCAN ve Sayın Yrd. Doç. Dr. İhsan SERHATLIOĞLU'na, Histolojik incelemeler aşamasında desteğini tam olarak yanımda hissettiğim Histoloji ve Embryoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Nevin KOCAMAN'a, bölüm asistanlarına, tez hazırlık aşamasında yardımlarını esirgemeyen Bingöl Üniversitesi'ndeki mesai arkadaşlarım Öğr. Gör. Veysel SÜZERER, Öğr. Gör. Hasan SELİMOĞLU ve Öğr. Gör. Celal GÖKUÇ'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca beni bu günlere getiren aileme, desteğini her zaman yanımda hissettiğim eşime ve sürekli moral kaynağım olan çocuklarım Berat ve Enes'e sevgilerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

<b>BAŞLIK SAYFASI</b> .....	<b>i</b>
<b>ONAY SAYFASI</b> .....	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>iii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iv</b>
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>TABLolar LİSTESİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>KISALTMALAR</b> .....	<b>x</b>
<b>1. ÖZET</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>3. GİRİŞ</b> .....	<b>3</b>
3.1. Sıçanlarda Aort Anatomisi.....	4
3.2.Kan Basıncı .....	6
3.3. Düz Kaslar.....	9
3.3.1. Düz Kas Kasılmasının Mekanizması .....	10
3.3.1.1. Düz Kas Kasılmasının Kalsiyum İyonları ile Düzenlenmesi.....	11
3.3.1.2. Kasılmanın Düzenlenmesi .....	11
3.3.1.3. Miyoplazmik Kalsiyum Konsantrasyonunun Düzenlenmesi.....	12
3.3.1.4. Sarkolemma.....	13
3.3.2. Düz Kasta Zar Potansiyelleri .....	14
3.3.2.1 Düz Kas Aksiyon Potansiyellerinin Oluşmasında Kalsiyum Kanallarının Önemi.....	14
3.3.3 Vasküler Düz Kas Yapısı Ve Vasküler Düz Kas Hücreleri .....	14

3.4. Nesfatin-1 .....	16
3.4.1. Nesfatinin Biyokimyası ve Metabolizması .....	17
3.4.2. Nesfatin Reseptörü .....	19
3.4.3. Nesfatinin Etkileri .....	20
<b>4. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>30</b>
4.1. Deney Hayvanlarının Bakım ve Beslenmeleri .....	30
4.2. Deney Hayvanlarının Hazırlanması .....	30
4.3. Krebs Solusyonu .....	30
4.4. Deney Düzeneği .....	31
4.4.1. Oksijen karbondioksit kaynağı: .....	31
4.4.2. Organ banyosu .....	32
4.4.2.1. Krebs Solüsyonunun Depolandığı Kısım .....	32
4.4.2.2. Organ Banyosu Hazneleri .....	33
4.4.2.3. Kanal ve Kapak Sistemi .....	33
4.4.2.4. İzometrik Transduser .....	33
4.4.2.5 Termosirkülâtör .....	33
4.4.2.6. Amplifikatör .....	34
4.4.2.7. Kayıt ünitesi .....	34
4.5. İmmunohistokimyasal Boyama .....	34
<b>5. BULGULAR .....</b>	<b>36</b>
5.1. Kasılma Protokolü Bulguları .....	36
5.2. Gevşeme Protokolü Bulguları .....	39
5.2.1. Sodyum Nitroproside Gevşeme Protokolü Bulguları .....	40
5.2.2. ACH Gevşeme Protokolü Bulguları .....	43

5.3.İmmunohistokimyasal Bulgular .....	46
<b>6.TARTIŞMA .....</b>	<b>52</b>
<b>7. KAYNAKÇA .....</b>	<b>56</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>64</b>

## ŞEKİLLER LİSTESİ

<b>Şekil 1.</b> Sıçan arter anatomisi.....	5
<b>Şekil 2.</b> Arter duvarının yapısı .....	15
<b>Şekil 3.</b> Nesfatin-1'in alt segmentleri . .....	18
<b>Şekil 4.</b> Nesfatin-1 olmaksızın (kontrol) ,0.1, 1, 10 nM Nesfatin-1 ilave edilen aort kesitlerinin artan dozlarda FNF ile kasılma yüzdeleri eğrisi. ....	39
<b>Şekil 5.</b> Nesfatin-1 olmaksızın (kontrol) , 0.1, 1, 10 nM Nesfatin-1 ilave edilen aort kesitlerinin artan dozlarda SNP ile gevşeme eğrisi.....	43
<b>Şekil 6.</b> Nesfatin-1 olmaksızın (kotrol) , 0.1, 1, 10 nM Nesfatin-1 ilave edilen aort kesitlerinin artan dozlarda Ach ile gevşeme eğrisi.....	46
<b>Şekil 7.</b> Asılmayan grup sıçan damar dokusu endotel ve media tabakasına ait nesfatin immunreaktivitesi (Grup I).....	48
<b>Şekil 8.</b> Asılmayan grup sıçan damar dokusu endotel ve media tabakasına ait nesfatin immunreaktivitesi(Grup I).....	48
<b>Şekil 9.</b> Asılmayan grup sıçan damar dokusu endotel ve media tabakasına ait nesfatin immunreaktivitesi(Grup I).....	48
<b>Şekil 10.</b> Asılmayan grup sıçan damar dokusu endotel ve media tabakasına ait nesfatin immunreaktivitesi(Grup I).....	49
<b>Şekil 11.</b> Asılan grup sıçan damar dokusu endotel ve media tabakasına ait nesfatin immunreaktivitesi(Grup II).....	50
<b>Şekil 12.</b> Asılan grup sıçan damar dokusu endotel ve media tabakasına ait nesfatin immunreaktivitesi (Grup II) .....	50

**Şekil 13.** Asılan grup sıçan damar dokusu endotel ve media tabakasına ait nesfatin immunreaktivitesi(Grup II)..... 51

## TABLÖLAR LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b> Krebs solusyonu içeriği mM/L .....	31
<b>Tablo 2.</b> Felinefrinin aortkesiti üzerindeki (kontrol, 0.1, 1, 10 nM nesfatin uygulanan guruplar) kasılma yüzde değerleri. ....	38
<b>Tablo 3.</b> SNP'nin aort kesiti üzerindeki (kontrol, 0.1, 1, 10 nM nesfatin uygulanan guruplar ) gevşeme değerleri.....	42
<b>Tablo 4.</b> Ach'nin aortkesiti üzerindeki (konrol, 0.1, 1, 10 nM nesfatin uygulanan guruplar )gevşeme değerleri.....	45
<b>Tablo 5.</b> Histoskor (yaygınlık x şiddet).....	47

## KISALTMALAR

<b>NUCB2</b>	: Nükleobindin 2
<b>Camp</b>	:Siklik adenozinmonofosfat
<b>POMC</b>	: Propiomelanokortin
<b>RAA</b>	: Renin anjiyotensin aldosteron
<b>PRA</b>	: Plazma renin aktivitesi
<b>ACE</b>	: Anjiyotensin Converting enzim
<b>ADH</b>	: Antidiüretik hormon
<b>ATP</b>	: Adenozintrifosfat
<b>ADP</b>	: Adenozindifosfat
<b>SR</b>	: Sarkoplazmikretikulum
<b>CIF</b>	: Kalsiyum giriş faktörü
<b>VDKH</b>	: Vasküler düz kas hücreleri
<b>PC</b>	: Prohormon convertase
<b>ARC</b>	: Arkuat çekirdek
<b>MCH</b>	: Melanin konsantre edici hormon
<b>CRF2</b>	: Kortikotropin salgılatıcı hormon 2
<b>GDM</b>	: Gestasyonel diyabetis mellitus
<b>NO</b>	: Nitrik oksit
<b>SAK</b>	: Subaraknoit kanama
<b>ICV</b>	:İntraserebroventriküler
<b>IgG</b>	: İmmünglobülün G
<b>PVN</b>	: Paraventriküler nükleus

<b>UCN1</b>	: Ürokortin 1
<b>PBS</b>	: Phosa phoyte buffered saline
<b>FNF</b>	: Felinefrin
<b>SNP</b>	: Sodyumnitroprosyt
<b>Ach</b>	: Asetilkolin
<b>KB</b>	: Kan basıncı
<b>cGMP</b>	:Siklik guanosin monofosfat

## 1. ÖZET

Nesfatin-1, son dönemlerde keşfedilen önemli endokrin ve metabolik işlevleri olduğu düşünülen muhtemel yeni bir metabolik hormondur. Bu bilgiler ışığında yapılan çalışmada 4-6 aylık 200-250 gram ağırlığındaki erkek Wistar cinsi sıçanlarda nesfatin-1'in sıçan aort kontraksiyonları üzerindeki olası etkisi araştırılmıştır.

Çalışmada sıçan aortuna, 0.1, 1 ve 10 nM dozlarda kümülatif olmayan uygulamalarla nesfatin-1'in izometrik kontraksiyonlar üzerindeki doz bağımlı etkisi izole organ banyosu kullanılarak test edildi. Ayrıca bu uygulamanın sıçan aort dokusundaki değişimde immüno-histokimyasal boyama yöntemiyle histolojik olarak gösterildi. Çalışmanın sonucundan nesfatin-1'in farklı dozlarda doz bağımlı olarak sıçan aort kontraksiyonlarını inhibe ettiği ve uygulamanın sıçan aortunda immüno-histokimyasal değişimlere neden olduğu gözlemlendi. Kasılma ve gevşeme gerilim yüzdeleri açısından 0.1 nM nesfatin uygulanan grupta istatistiksel olarak herhangi bir farklılık oluşturmaz iken, 1 nM ve 10 nM dozlarda ise istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar ortaya çıktı ( $p < 0.05$ ). 1 ve 10 nM doz uygulamasında aort kontraksiyon ve relaksasyonlarını kasılma ve gevşeme periyodunda istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı tespit edildi ( $p < 0.05$ ).

Çalışma sonucunda elde edilen bulgular nesfatin-1'in doz bağımlı olarak sıçan aort kontraksiyon ve gevşeme protokollerinin her ikisine de inhibisyon yaptığı gözlenmiştir ayrıca nesfatin uygulamasının doz bağımlı bu etkileri histolojik olarak doku düzeyinde de tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Nesfatin-1, aort, kasılma, gevşeme, sıçan

## 2. ABSTRACT

Effects Of Nesfatin-1 On Contraction-Relaxation Mechanisms In Rat Aorta

Nesfatin-1 is likely to be a new metabolic hormone recently discovered which is thought to have the significant endocrine and metabolic functions. The study carried out in the light of this data attempts to find the effect of Nesfatin-1 on the aorta contractions of 4-6 month-old male Wistar rats weighing 200–250 g.

In this study the dose-dependent effect of nesfatin given to the aorta of rats at doses of 0.1, 1 ve 10 nM non-cumulatively methods on isometric contractions has been tested by using isolated organ bath. In addition, the effect of this application on aortic tissue of rats has been histologically presented using histo-chemical staining methods.

It has been revealed at the end of the study that nesfatin-1 at different doses inhibits the contractions of rat aorta in a dose dependent manner and this application results in immunohistochemical changes in rat aorta. In terms of the contraction and relaxation stress percentages it has not resulted in any statistical difference within the group at a dose of 0.1nM nesfatin while there is a statistically significant difference among the groups at doses of 1 nM and 10 nM( $p<0.05$ ). Nesfatin application at doses of 1 and 10 nM has been found to decrease the aortic contractions in a statistically significant way ( $p<0.05$ ).

The se results have demonstrated that nesfatin-1 inhibits both the aortic contractions and relaxation procedures of rats in a dose dependent manner. Moreover, these dose-dependent effects of nesfatin application have been histologically identified in tissue level, as well.

**Key Words:** Nesfatin-1, aorta, contraction, relaxation, rat.

### 3. GİRİŞ

Nesfatin-1 ilk kez 2006 yılında Oh ve arkadaşları tarafından hipotalamusta tespit edilmiş olup bir tokluk molekülü olduğu düşünülmektedir(1). Nesfatin-1'in beynin değişik bölgelerinin yanı sıra yağ doku, mide, pankreas adacıkları, karaciğer, testis gibi dokularda da bulunduğu tespit edilmiştir(1).

Ratlarda intraserebroventriküler (İCV) nesfatin-1 enjeksiyon sonucunda doz-zaman bağımlı olarak gıda alımının baskılandığını ve böylece vücut ağırlığını düşürdüğü görülmüştür(1).

Nesfatin-1 82 amino asitten oluşan, 9.7 kDa moleküler ağırlığındadır(1). Yapılan bir çalışmada nesfatin-1'in, NEFA/nükleobindin2 (NUCB2) 'den türeyen bir amino terminal fragmet olduğu gösterilmiştir (1). NUCB2 ise toplam 396 aminoasitten oluşan bir protein olup 24 aminoasitlik bir sinyal peptidini meydana getirir ve iştahın kontrolünde görev alır (1, 3).

Nesfatin-1 NUCB2'nin ilk terminal bölgesinden oluşan bir fragmenttir. Nesfatin-1 molekülünün C terminal fragmenti besin alımının düzenlenmesinde rol almaktadır. Ortafragmentinde besin alımında önemli rol aldığı düşünülmektedir(1, 4).

Yani 396 aminoasitli NUCB2'nin ilk 1– 82 aminoasitlik kısmı nesfatin-1'i, 85–163 aminoasitlik kısmı nesfatin-2'yi, 166–396 aminoasitlik kısmı ise nesfatin-3'ü oluşturmaktadır(1).

Nesfatin-1'in; N23 (1-23), M30 (24-53), C29 (54-82) gibi üç alt gurubun birleşmesi ile oluştuğu ortaya çıkarılmıştır(5).

Su ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada Nesfatin-1'in hiperglisemik ratlarda intravenöz uygulanmasının kandaki glukoz seviyesini anlamlı bir düzeyde azalttığı, bu antihiperglisemik etkinin doz-zaman ve insülin bağımlı olmasının yanısıra periferik etkisiyle de oluştuğu gözlenmiştir (6). Nesfatinin antihiperglisemik etki mekanizması tam olarak bilinmemekte olup insülin üzerinden etki gösterdiği tahmin edilmektedir(6).

Nesfatin-1, infüzyonu ise paraventricüler ve arkuat nükleuslarda potentanoreksigenik maddeler olan melanokortin prekürsör peptid, propiomelanokortin'i (POMC) kodlayan genlerin ekspresyonunda bir artışa sebep olmadığını gösteren çalışmalar mevcuttur(6).

Nesfatin-1, paraventricüler ve arkuat nükleuslarda potentanoreksigenik maddeler olan melanokortin prekürsörpeptid, propiomelanokortin (POMC) gibi maddelerin ve hücre içi kalsiyum veya cAMP artışına yol açmadığı gösteren çalışmalar nesfatin-1 in iştah baskılayıcı etkisinin leptin yolağından farklı yollar üzerinden gerçekleştirdiğini düşündürmektedir(7).Nesfatin-1'in leptin yolağı üzerinden etki göstermemesi,insanlardaki diyete bağlı obezite gibi leptin rezistansında artışın olduğu durumlarda etkili farmakolojik ajan olabileceğini düşündürmektedir(7).

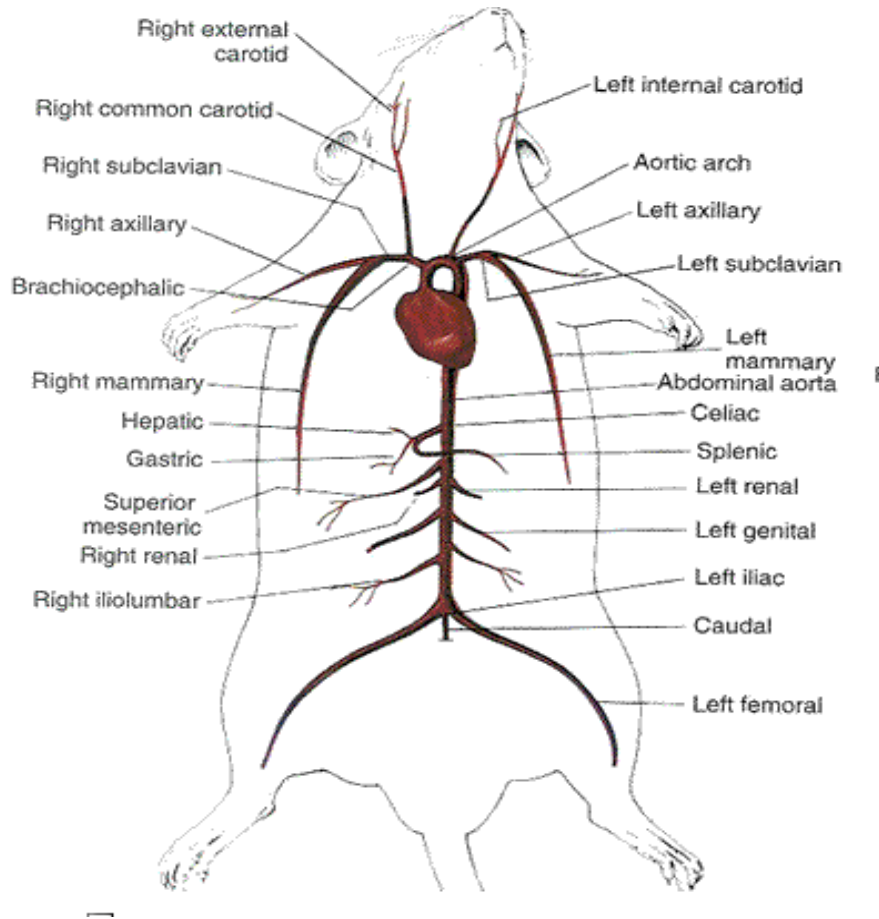
### **3.1. Sıçanlarda Aort Anatomisi**

Sıçanlarda aort anatomisi üç ana başlık altında toplanır. Bunlar; göğüs boşluğunun ön kısmı,ön bacaklar,boyun ve başın arterleri, karın boşluğu ve pelvis arterleri, arka bacağın arterleri şeklindedir(8).

Truncuscoeliacus, diafragma kıvrımı yakınında çıkar ve kısa bir uzantıdan sonra üç dala ayrılır. Truncuscoeliacus'dan kısa bir uzantıdan sonra a. mezentericacranialis dal alır. A. mezenterica yakınında a. renalis dal alır.

Aort abdominalis'in arka bölümündeki kıvrımı truncusiliacus oluşturur. Truncusiliacus'ungövdesindea. İliaca externa ve a. İliacainterna çıkar.

İliacainternadapelvis boşluğu organları dal alır. A. iliaca externa pelvisten çıkmadan önce a. abdominalis ve a. pudentalis dal alır. A. pudentalis' de a. circumflexia, a. abdominalis caudalis, a. Spermaticaexterna ve a. pudentalis externa olarak dallanır(8).



Şekil 1. Sıçan arter anatomisi(9)

### 3.2.Kan Basıncı

Kan basıncı, damarlarda dolaşan kanın arter duvarına uyguladığı basınç olarak bilinmektedir. Kan basıncının devamlılığı sol ventrikülün kasılma şiddeti, arteriyel damarların elastik yapısı, dolaşıma katılan kan miktarı ve kanın akışkanlığı tarafından sürdürülmektedir. Sistolik kan basıncı ventrikülün kasılması sırasında oluşan basınçtır. Diastolik kan basıncı ise ventrikülün gevşemesi sırasındaki basınçtır(10,11).

Hipertansiyon arteriyel kan basıncının normal değerlerinin üzerinde olmasıdır. Sistolik kan basıncının 140mmHg'nın, diastolik kan basıncının ise 90mmHg'nın üzerinde olması hipertansiyon olarak kabul edilse de bu değerler tartışmalıdır(12,13).

Kardiyak output ve damar rezistansının çarpımına kan basıncı denir. Kan basıncının artışı kardiyak output ve vasküler rezistans artışına paralel olarak artar. Bu parametrelerden biri artarken diğeri azalırsa kan basıncında belirgin bir değişiklik meydana gelmez(14,15).

Kan basıncının yükselmesi bir hastalığa bağlı ise sekonder hipertansiyon, nedeni belli değilse, primer veya esansiyel hipertansiyon olarak isimlendirilir. Sekonder hipertansiyon oluşumunun diyet, stres, obezite gibi birçok nedeni vardır(15).

Hipertansif olguların ~%90-95'inde kan basıncı yükselmesinden sorumlu etiyolojik neden bilinmemektedir. Bu hipertansiyon tipi bu nedenle esansiyel ya da primer hipertansiyon olarak tanımlanmaktadır. Birincil hipertansiyonun nedeni günümüzde bilinmemekle birlikte oluşumuna katkıda bulunan mekanizmalar olduğu düşünülmektedir(16).

Hipertansiyon, önlenabilir ölümlenenler arasında dünyada en önde gelen risk faktörlerindedir. İki bin yılı verilerine göre 972 milyon insanda hipertansiyon görülmekte olup bu sayı dünyadaki erişkin nüfusunun yaklaşık olarak %26,4'üne denk gelmektedir (17).

Hipertansiyon hastası olan insanların yaşam kalitelerinin normal insanlara göre oldukça düşük seviyede olduğu gözlenmiştir(17).

Hipertansiyon, bir kan basıncı regülasyon bozukluğudur. Sistemik kan basıncının regülasyonunda birçok faktörün rol alması nedeniyle hipertansiyonun oluşumunda birçok patofizyolojik mekanizmanın sorumlu olduğu düşünülmektedir. Kan basıncının kontrolü böbrekler, santral sinir sistemi, periferik sinir sistemi, vasküler endotel ve adrenal gland arasındaki karmaşık etkileşimle sağlanır (18).

Renin anjiyotensin aldosteron (RAA) sistemi kan hacmini ve basıncını düzenleyen önemli mekanizmalardan birisidir. Karaciğerden salgılanan anjiyotensinojen, böbrek jukstaglomerüler aparatından salgılanan renin tarafından anjiyotensin-1'e dönüştürülür. Anjiyotensin-1, anjiyotensin dönüştürücü enzim tarafından anjiyotensin-2'ye çevrilir. Anjiyotensin-2 böbrek üstü bezi korteksinden aldosteron salınımını uyarır. Renin anjiyotensin aldosteron sisteminin aktivasyonu; böbrek perfüzyon basıncının düşmesi, hücre içi volümdeazalma, dolaşımdaki katekolaminlerin artışı, sempatik sinir sistemi aktivasyonu ve hipokalemi gibi uyarılara cevap olarak oluşur. Renin anjiyotensin aldosteron sisteminin esansiyel hipertansiyondaki rolü oldukça karmaşıktır. Plazma renin aktivitesi (PRA) hipertansif hastaların %20'sinde yüksek, %30'unda düşük, %50'sinde normaldir. Ancak normal plazma renin

seviyesi olan çoğu hastada PRA total vücut sodyumuna oranla uygunsuz olarak yüksek olabilir. Bu hastalara anjiyotensin dönüştürücü enzim(ACE) inhibitörleri veya aldosteron reseptör blokerleri verildiğinde kan basıncının düşmesi de bu görüşü desteklemektedir (20).

Damarların kasılıp gevşeme özellikleri sayesinde kan her dokuda ideal basınçta yer alması sağlanır. Bu basıncın ana belirleyicisi arter sistemindeki basınçtır ve normal sınırlar içinde tutulması yaşamın devamlılığı için gereklidir. Bu sayede değişen şartlarda (egzersiz, beslenme vb.) tüm dokulara ideal kan akımının devam etmesi sağlanır. Organizma bu amaçlara ulaşmak için kan basıncı ve ilgili sistemler üzerinde (kalp kası, damar düz kası vb.) hızlı, güçlü, kalıcı kontrol mekanizmalarına sahiptir. Bu mekanizmalar otonom sinir sistemi (sempatik ve parasempatik) ve baroreseptör tarafından sağlanan akut kontrol ve böbrekler tarafından sağlanan uzun süreli kontrol mekanizmalarıdır. Baroreseptörler kan basıncında meydana gelen anlık değişimlerden otonom sinir sistemini haberdar ederek gerekli otonom değişiminin meydana gelmesini sağlayan en önemli haberci sistemlerdir. Sempatiksinir sisteminin aktivasyonu kalp kasında pozitif kronotropik ve inotropik etkiler oluştururken arteriyolardüz kaslar üzerinde vazokonstriktör etkilere sahiptir. Bu etkiler kan basıncının ancak kısa süreli kontrolünü sağlayabilirler ancak kan basıncının uzun süreli regülasyonunda asıl görev böbreklerindir. Böbrekler, nefronlarında bulunan özelleşmiş sistemleri (glomerüle yakın aparat) ile damar içinde dolaşan sıvı miktarını ve kan basıncının uzun süreli regülasyonunu sağlarlar. Bu fizyolojik düzenleyici mekanizmalar bozulduğunda veya aksadığında kan basıncı düzensizliğine bağlı doku ve organ fonksiyon bozukluğu ortaya çıkar.

Kan basıncında meydana gelen uzun süreli düşüklük böbreklerden renin salgılanmasına neden olur. Renin, dolaşımdaki anjiotensinojeni antiyotensin I' e dönüştürür. Bu hafif bir vazokonstriktördür ve kapiller endotel hücre zarlarında (özellikle de akciğer kapilleri) yerleşik anjiyotensin dönüştürücü enzim ile anjiotensin II' ye dönüştürülür. Anjiotensin II, kuvvetli vazokonstrüktör etkiye sahip olup kan basıncının artmasını sağlar. Ciddi kanamalar ve sıvı kayıpları, hipofizden diğer bir kuvvetli vazokonstrüktör madde olan ADH'ın (vazopressin) salgılanmasını uyarır.

Sistemik kan basıncının esas kontrolörleri muskuler arterlerdir. Arterlerin kasılmaları sempatik sinirlerle sağlandığı gibi yaralanma sonucu ortaya çıkan yerel maddelerin direkt etkisiyle de olabilir. Yerel faktörler küçük arterde ve arteriollerde etkili olabilmektedir.

### **3.3. Düz Kaslar**

İnsan vücudundaki toplam kas kitlesinin %10'unu oluşturur. Çapı iskelet kasının çapından 30 kat daha küçük olup, düz kas 1-5 mikrometre çapa ve 20-500 mikrometre boya sahiptir. Kasılmaları iskelet kası ile benzerlik gösterir fakat düz kas liflerinin fiziksel düzenlenmesi tamamen farklıdır (22).

Düz kaslarda iskelet kasında olduğu gibi düzenli sinir-kas kavşakları yoktur. Düz kasların inervasyonu otonom sinir lifleri aracılığı ile gerçekleşmektedir. Otonom sinir lifleri bir kas tabakası üzerine parçalı olarak dallanır(23).

Aynı zamanda düz kaslar sinir sonlanmalarında iskelet kaslarında bulunan kas liflerini uyaranmotor sinir liflerinin dallanan sonlanmasına da sahip değildir.

Bunun yerine düz kasların terminal sonlanmalarında genişlemeler ve kalınlaşmalar (varikozite) gözlenir(23, 24).

Düz kaslar her organa göre bir takım farklılıklar gösterir. Buna rağmen düz kaslar genellikle çok birimli ve üniter (tek birimli) düz kaslar olmak üzere iki grupta incelenir (22). Çok birimli düz kaslarda göze çarpan en önemli özellik; çok sayıda kas lifinden oluşmasına rağmen bu kas liflerinin birbirindenbağımsız kasılabilmesi ve genel olarak sinir sinyalleriyle kontrol edilmesidir (22).

Düz kas hücre membranları birçok noktada birbiri ile temas halindedir, bir kas lifinde oluşan güç bu sayede yanındaki kas liflerine aktarılır(22). Hücre membranlarında oluşan aksiyon potansiyelinde iyonların yanındaki hücrelere aktarılması, hatta aksiyon potansiyeli dışındaki iyonların kas lifleri arasında aktarılması ve kas liflerinin birlikte kasılmasına olanak sağlayan çok sayıda yarık bağlantı (gap junction) ile birleştirilmiştir(22).

### **3.3.1. Düz Kas Kasılmasının Mekanizması**

Kimyasal yapı olarak iskelet kasındakine benzerlik gösteren aktin ve miyozinflamentler içerse de iskelet kasındakine benzer aktin miyozin çizgili yerleşimi yoktur. Yani aktin ve miyozin yerleşim bakımında düz kaslarla farklıdır. Kas lifinde dağınık serpilmiş birçok aktinfilamenti arasında az sayıda miyozinfilamenti vardır(22).

Düz kasların kasılmasında tıpkı iskelet kaslarında olduğu gibi  $Ca^{+2}$  önemli bir rol almaktadır. Asıl olarak kontraksiyon voltaj kapılı kanallar aracılığı ile hücre dışından hücre içine  $Ca^{+2}$  akışına bağlıdır(23, 24).

Düz kaslarda kas kasılması için ihtiyaç duyulan enerji adenozin trifosfatın (ATP) adenozin difosfata (ADP) yıkılmasıyla ortaya çıkar (22).

### **3.3.1.1. Düz Kas Kasılmasının Kalsiyum İyonları ile Düzenlenmesi**

Düz kasların kasılmasında tıpkı iskelet kaslarında olduğu gibi  $Ca^{+2}$  önemli bir rol almaktadır. Düz kaslarda sarkoplazmikretikulum az geliştiği için asıl kasılmayı başlatan asıl olarak voltaj kapılı kanallar aracılığı ile hücre dışından hücre içine  $Ca^{+2}$  akışıdır (23, 24).

Ayrıca hücre içi  $Ca^{+2}$  artışı düz kas liflerinin sinirsel ya da hormonal yolla uyarılması, lifin gerilmesi veya lifin kimyasal çevresindeki değişikliklerle de meydana gelebilir(22).

### **3.3.1.2. Kasılmanın Düzenlenmesi**

İskelet kasında hücre içi  $Ca^{+2}$  konsantrasyonundaki artış aktin filamentleri etkilerken düz kasta myozin filamentlerini etkiler. Bu da düz kaslarda kasılmanın myozin filamentleri tarafından kontrol edildiğini, düzenlendiğini gösterir(22). Düz kaslarda hücre içi kalsiyum konsantrasyonundaki artış myozini etkileyerek myozindeki hafif zinciri fosforile ederek Aktinle etkileşmesini sağlar ve kuvvet oluşumunu sağlayan kalsiyum- kalmoduleline bağlı protein kinazı aktive eder(22).

Kalmoduline dört kalsiyum molekülü bağlanır. Kalsiyum-kalmodulin kompleksi myozin hafif zincir kinazı aktive eder. Bu ise miyozinin düzenleyici hafif zincirini fosforile eder(22).

Miyozin başının aktinle tutunma ayrılma döngüsünün oluşması için myozin hafif zincirin fosforile olması gerekir. Bağlanma ve bundan sonraki tüm

döngüsel işlemlerin gerçekleşmesive dolayısı ile kasta kasılma olayının gerçekleşmesi için düzenleyici zincirin fosforile olması şarttır(22)

Düz kas hücresindeki miyozin fosfataz miyozini defosforile eder. Sitoplâzmadaki  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu düşünce miyozin çapraz köprülerini bir süre aktine bağlı halde tutan bir kilitlenmiş köprü mekanizması bulunmaktadır. Böylece damar düz kaslarında az enerji ile uzun süre kasılma sağlanmış olur. Kalp kasında kasılma cevapları fazik olup ard arda kasılma gevşeme dönemlerinde oluşurken düz kasta kasılma cevapları farklılık göstererek kilitli köprü mekanizması nedeniyle çoğunlukla toniktir (23, 24,25).

### **3.3.1.3. Miyoplazmik Kalsiyum Konsantrasyonunun Düzenlenmesi**

Düz kas kontraksiyonunda kalsiyum iyonlarının uyarıcı etkisi olduğu bilinmektedir. Kasılmanın gerçekleşmesinde miyozinin fosforilasyonu kasılma mekanizmaları içinde en çok öne çıkan görüştür. Kalsiyumun  $10^{-8}$  ile  $10^{-7}$  olan sarkoplazmik konsantrasyonu uyarılma neticesinde geçici olarak  $10^{-6}$  ya çıkar. Bunun sonucunda kalsiyum inaktif kalsiyum bağlayıcı protein olan kalmodulin ile bileşik oluşturur. Kalsiyum kalmodulin bileşiği, miyozin hafif zincir kinazı aktive eder. Miyozin hafif zincir kinaz enzimi miyozinin hafif zincirinin fosforilasyonunu katalize eder. Bunun sonucu olarak aktinin miyozin  $Mg^{++}$ -ATPaz aktivitesi uyarılarak ATP'nin yıkılmasına ve düz kasların boyunun kısılmasını sağlarnır(22).

Kalsiyum konsantrasyonu düşük olduğu durumlarda kalmodulin enziminin aktivasyonu için miyozin hafif zincir kinaz aktif değildir. Miyozin hafif zincir kinazın aktif olmaması düz kasın kasılma alt birimlerini engeller. Hücrede

gerginliğin oluşması için miyozin hafif zincir kinaz fosforile edilemez. Bundan dolayı fosfotaz, miyozin hafif zincirinden fosfatı ayırarak, miyozin ATPaz aktivitesini engeller ve gevşeme oluşur(26).

Düz kasta biri sarkolemmada diğeri sarkoplazmik redikulumda (SR) bulunan kalsiyum havuzları aktivasyon ile kasılma arasındaki bağlantıyı sağlarlar(22). Sarkolemma extraselüler sıvıdaki kalsiyumun giriş çıkışını düzenlerken, SR hücre içindeki kalsiyumun hareketini düzenler(22). Düz kasta iskelet kasındaki tersine hücre dışı kalsiyum kasın kasılmasında önemli rol oynar. Oysa iskelet kası kasılması için hücre dışı kalsiyuma ihtiyaç duyulmaz(22). Bundan dolayı miyoplazmik kalsiyum konsantrasyonunun düzenlenmesi hem SR hemde sarkolemma ile bağlantılıdır (22).Düz kaslarda miyoplazmik kalsiyum konsantrasyonu farklı sebeplerle değişebilir(22).

#### **3.3.1.4. Sarkolemma**

Düz kas hücresinden kalsiyumun hücre içinden hücre dışına çıkışı sarkolemmal kalsiyum-ATPaz aktivitesiyle ve bir  $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$  antiporterleri (dışarıya çıkan herbir kalsiyum için hücreye üç sodyum girer) vasıtası ile gerçekleşir(22). SR'de kalsiyum konsantrasyonunun azalmasının ardında SR'ye yakın sarkolemmadaki "depo" işlevli kalsiyum kanallarını aktive olur. Kalsiyum giriş faktörünün (CIF) SR'den salınmasıyla SR hücre dışı sıvıdan gelen kalsiyumla dolması sağlanır(22). CIF' in ve depo işlevli kalsiyum kanalının yapısı henüz tam olarak bilinmemektedir (22). Düz kasın sürekli olarak kasılması hücre dışı kalsiyuma ihtiyaç duyduğu gerçeğini ortaya çıkarır(22).

### **3.3.2. Düz Kasta Zar Potansiyelleri**

Düz kasın o anki durumuna göre zar potansiyelinin nicel değeri farklılık gösterir. İstirahat halindeki düz kasta hücre içi zar potansiyeli ortalama -50 ile -60 milivolt civarındadır. Buda iskelet kasındakine göre yaklaşık 30 milivolt daha azdır(22).

#### **3.3.2.1 Düz Kas Aksiyon Potansiyellerinin Oluşmasında Kalsiyum Kanallarının Önemi**

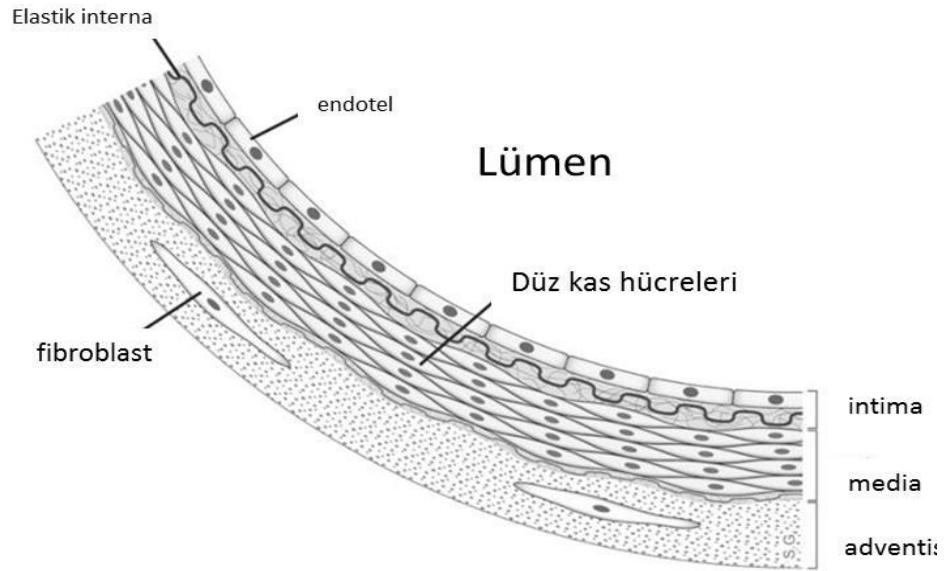
Voltaj kapılı kalsiyum kanalı düz kas hücre zarında daha fazla bulunurken, voltaj kapılı sodyum kanalları iskelet kası hücre zarında daha fazladır(22). Bundan dolayı düz kaslarda aksiyon potansiyeli oluşumunda sodyumun katkısı daha azdır. Sodyumun yerine aksiyon potansiyelin oluşmasında asıl sorumlu olan kalsiyum iyonlarıdır(22). Sodyum kanalları kalsiyum kanallarından çok daha hızlı açılır ve kalsiyum kanallarına göre daha kısa süre açık kalır. Düz kaslarda uzamış aksiyon potansiyelleri kapıların açık kalma süreleri ile alakalıdır(22).

Düz kas hücrelerinde aksiyon potansiyeli oluşumu sırasında hücreye giren kalsiyum düz kas kasılma mekanizması üzerine doğrudan etki ederek kasılmasını sağlar böylece kalsiyum aynı anda iki iş görmüş olur(27).

### **3.3.3 Vasküler Düz Kas Yapısı Ve Vasküler Düz Kas Hücreleri**

HücreSEL ve hücreSEL yapılardan oluşan damar duvarı esnek ve aktif bir yapıdır. Vasküler yapıyı oluşturan hücreler temel olarak entotel hücreleri, vasküler düz kas hücreleri ve fibroblastlardır (28). Şekil-1 de görüldüğü gibi içten dışa intima, media ve adventisya olarak üç tabakadan oluşan vasküler yapı kanı

kalpten periferik dokulara taşımaya uygun olarak elastik bir yapıya sahiptirler. Damarlar patofizyolojik uyarılmaya karşı yeniden yapılanma veya damar kütlesinde artma-azalma şeklinde yanıt verirler(28). İntakt arteriyel media aterosklerozis, restenoz ve hipertansiyon gibi kardiyovasküler hastalıkların patogenezinde, damar duvarının kasılma-gevşeme, büyüme, gelişme, yeniden düzenlenme ve onarımını içeren birçok yapısal ve fonksiyonel özelliklerinden sorumludur (28).



**Şekil 2.** Arter duvarının yapısı (29).

Temel görevleri kontraksiyon, damar gerilimi, kan basıncını düzenleyerek kan akımını sağlamak olan vasküler düz kas hücreleri (VDKH) yüksek derecede özgülendir. Erişkinlerde kan damarındaki VDKH'leri diğerlerine kıyasla düşük proliferasyon hızına ve sentetik aktiviteye sahiptirler. VDKH'leri kontraktil aktiviteleri için kendine özgü kontraktil proteinleri, iyon kanallarını ve sinyal proteinlerini ekspres ederler. Ayrıca VDKH'leri ortam değişikliğine,

geriye dönüşümlü şekilde hücre boyutunda, ekstraselüler matriks üretiminde, kontraktıl protein ekspresyonunda ve migrasyon yeteneklerinde değişiklik yapabilme şeklinde yanıt verebilme özelliğine sahip olan hücrelerdir (30-32). Hasar durumunda VDKH'lerinde proliferasyon ve migrasyonun yanı sıra kollajen, elastin ve proteoglikanları içeren ekstraselüler matriks komponentlerinin sentez hızında artışla karakterize olan yeniden farklılaşma süreci başlar. Yeniden farklılaşma ateroskleroz, stent takılması veya by-pass sonrası restenoz ve hipertansiyon gelişiminde rolü olan temel patofizyolojik mekanizmadır (30, 33).

Arter hücreleri genellikle mediada bulunur fakat intimadada düz kas hücrelerine rastlanır. Düz kas hücreleri insan vücudunda iki şekilde görülür (34-36).

1-Sentetik yapı olarak bilinen erken çocukluk döneminde ve fetüste bulunan hücreler. Bu hücreler bölünme, çoğalma ve hücreler arası matriks bileşiğinin sağlanması gibi iki temel görevi vardır.

2-Kontraktıl tip olarak bilinen ve yetişkinlerde bulunan hücrelerdir. Kontraktıl tip düz kaslarda stoplazmanın tamamı myofibrille doludur.

Düz kas hücreleri bazı etkilere maruz kalarak mediadan intimaya göç eder ve orada lipit fagositozu ve matriks sekresyonu başlar ve hücrelerin dönüşümünü stimüle eder(34).

### **3.4. Nesfatin-1**

Nesfatin-2006 yılında OH-I ve arkadaşları tarafından bulunmuştu(37). Nesfatin/NUCB2, 396 aminoasitten oluşan ve 24 amino asitlik sinyal peptidi dizisi içeren bir protein yapısıdır(38,39).

Daha önce beynin birçok bölgesinde sentez edildiği tespit edilen nesfatin-1'in daha sonra yapılan çalışmalarda adipoz doku, mide, pankreas adacıkları, kolon, karaciğer, testis gibi periferik dokularda da tesbit edilmiştir (40, 41).

Nesfatin-1'in beyinin enerji metabolizması ile ilgili alanlarda da salgılandığı tespit edilmiştir. (42, 43, 44).

NEFA/NUCB2 proteini iştah üzerine olan etkisinin dışında tam olarak bilinmemektedir. NUCB2 proteini Prohormon Convertase (PC) tarafından işlenenmiş olup şu ana kadar tespit edilen 3 ürün içermektedir. Bunlar, nesfatin-1 (1-82 aminoasit), nesfatin-2 (85-163 aminoasit) ve nesfatin-3 (166-396 aminoasit) olarak bilinmektedir(37).

Yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda nesfatin/NUCB2'nin nöronal hücrelerin sitoplazmasında varlığı ortaya konmasına karşın bu hücrelerin çekirdeklerindeki varlığı tam olarak tespit edilememiştir(45).

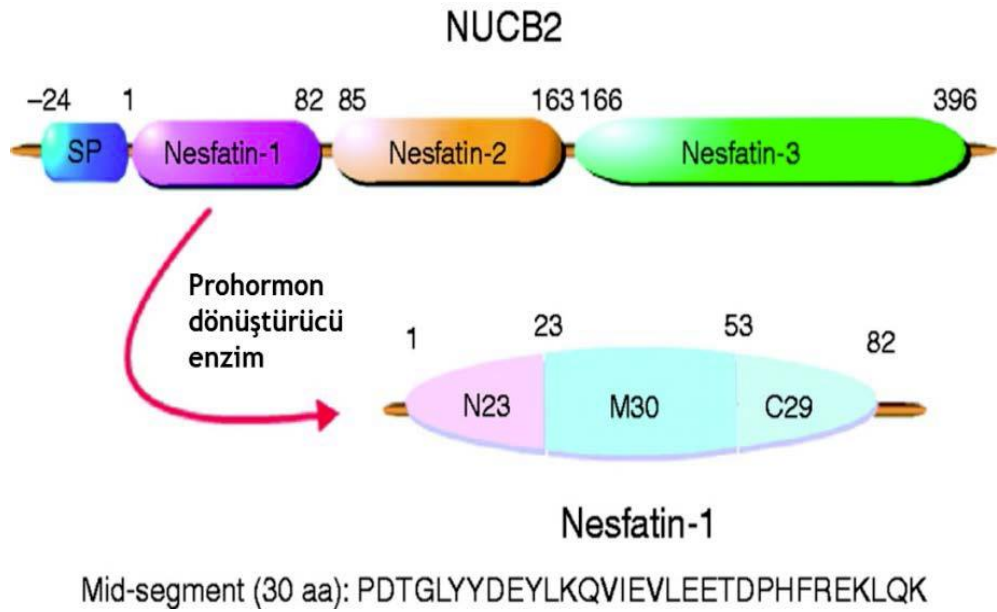
### **3.4.1. Nesfatinin Biyokimyası ve Metabolizması**

9.7 kDa moleküler ağırlığında 82 aminoasitten oluşan nesfatin-1'in ilk olarak 2006 yılında hipotalamusta tespit edilen bir tokluk hormonu olduğu ortaya konmuştur. Yapılan başka bir çalışmada nesfatin-1'in, NEFA/NUCB2'den meydana gelen bir amino terminal fragmeti olduğu gösterilmiştir (43).

NUCB2 ise toplam 396 aminoasitten oluşan bir proteindir. NUCB2 iştah kontrolünde görev almakla beraber 24 aminoasitlik bir sinyal peptidini oluşturur(43, 46).

NUCB2'nin 396 aminoasidinden ilk 1– 82 aminoasit arası nesfatin-1'i, 85– 163 aminoasit arası nesfatin-2'yi, 166–396 aminoasit arası ise nesfatin-3'ü oluşturmaktadır (43).

Nesfatin-1 üç alt segment içermekte olup, bunlar; N23 (1-23), M30 (24- 53), C29 (54-82) şeklindedir (47).



**Şekil 3.** Nesfatin-1'in alt segmentleri (46,48).

Nesfatin-1 tokluk hormonu olarak bildirilmesine rağmen karbonhidrat metabolizması üzerine herhangi bir etkisi bilinmemektedir. Bununla beraber NUCB2 mRNA'sının pankreatik beta hücreleri içinde eksprese edildiğinin gösterilmesinden beri nesfatin-1'in anti-hiperglisemik olabileceği düşünülmüştür. Bu düşüncenin doğruluğunu test etmek için rekombine nesfatin-1 genetik olarak yapılandırılmış hiperglisemik sıçanlara intravenöz(i.v.)olarak uygulanmıştır. Bu çalışmalar göstermiştir ki nesfatin-1'in anoreksijenik etkisine ilave olarak

metabolik kontrolde önemli rol aldığı ve anti-hiperglisemik etkisi olduğu tespit edilmiştir (49).

İnsanlarda, farelerde ve ratlarda NUCB2'nin amino asit diziliminin homolojisi büyük ölçüde benzerlik göstermektedir.(insanların homolojisi % 87,4 ve farelerin % 95,7)(50).

### **3.4.2. Nesfatin Reseptörü**

Gıda alımını melanokortin reseptör bağımlı bir mekanizma ile baskıladığı düşünülen nesfatin-1'in merkezi melanokortin ve sempatik sinir sistemi aktivitesini artırarak arteriyel kan basıncını artırdığı tespit edilmiştir (51).

Ayrıca nesfatin-1'in gıda alımını da leptine bağımlı olmayan bir mekanizma ile gıda alımını baskıladığı gösterilmiştir (46).

Nesfatin-1'in sahip olduğu antiinflamatuvar etkisinin melanokortin reseptörleri aracılığı ile olup olmadığı tam olarak bilinmemektedir. Oksitosin salınımı hipotalamusun paraventricüler çekirdeğinin uyarılması ile başlar (52, 53).

Nesfatin-1 ve oksitosin salınımını serbestleyen nöronların her ikisinde paraventricüler çekirdekte (PVN) bulunduğu gösterilmiştir (54, 55).

Nesfatin-1'in anoreksijenik, antidipsojenik ve hipertansif etkilerini oksitosin aracılığı ile yaptığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (56, 57).

İntraserebroventriküler(İcv)olarak verilen oksitosin reseptör antagonistinin nesfatin-1'in tersi bir etki göstererek su ve gıda alımını artırırken, oksitosin uygulanan sıçanlardanesfatin-1'e benzer bir etki ile su ve gıda alımını azalttığı aynı çalışmada gösterilmiştir (57).

Nesfatin-1 arkuat çekirdekdeki (ARC) immünpozitif hücrelerde bulunmaktadır. Peroksizom proliferatör aktive edici reseptör üzerinde üretildiği kabul edilmesine rağmen beyindeki reseptörleri henüz tam olarak bilinmeyen nesfatin-1 tek çekirdek bölgesinde ve hipotalamusta yer aldığı düşünülmektedir. Sıçanlarda eş zamanlı olarak yapılan ghrelin ve des-acylghrelin icvenjeksiyonuARC'deki nesfatin-1 immünreaktif nöronlarını aktifleştirmektedir(44).Normal diyetle beslenen veperiferik ghrelin enjeksiyonu yapılmış sıçanlarda nesfatin-1 aracılığı ile desaçil ghrelinin indüklediği oreksijenik inhibisyonunolduğu düşünülmektedir(44).

Henüz ispatlanmamış olmasına rağmen nesfatin-1'in etkileri bilinmeyen bir metabotropik G-protein kenetli reseptör ile ilişkisi olduğu düşünülmektedir(58) .

Nesfatin-1 cAMP oluşumunu ve melanokortin-3 ya da -4 reseptörlerinin ekspresinin hücrelerindeki kalsiyum akışını uyarmadığı ortaya konulmuştur. Bu bilgi ışığında obez insanların tedavisinde nesfatin-1'in ilaç terapisinde kullanılabileceği gösterilmiştir(59,60).

### **3.4.3. Nesfatinin Etkileri**

İlk olarak 2006 yılında tanımlanan 9.7kDa moleküler ağırlığında ve 82 aminoasitten oluşan nesfatin-1'in hipotalamusta bulunan bir tokluk hormonu olduğu ortaya konulmuştur(43). Nesfatin-1 NEFA/NUCB2'den türeyen bir amino grup termal fragment olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (43).

NUCB2 ise iştahın kontrolünde görev alan toplam 396 aminoasitten oluşan bir protein olup 24 aminoasitlik bir sinyal peptidini oluşturur (43, 46).

İştahı düzenleyici bu etkinin melanokortin sistemi ile ilgili olduğu ancak diğer birçok transmitter sisteminden bağımsız olduğu ortaya konmuştur (63, 64,43).

Sıçan beyninde yer alan tuberal hipotalamik nöronlarda melanin konsantrasyonunu düzenleyen hormon (MCH)'un nesfatin-1 ile birlikte salındığı gösterilmiştir. Nesfatin-1'in MCH ile birlikte salınması gıda alımının düzenlenmesi ile beraber MCH sinyalleşmesi ile alakalı beyin fonksiyonlarının düzenlenmesinde, otonom düzenlenmede, stres, ruh hali ve bilinçli uykuda rol alabileceği düşünülmüştür. Beyinde nesfatin-1 konsantrasyonunun artmasının iştah kaybı, daha az sıklıkta acıkma, doyumluk hissi verdiği bulunmuştur(43,46). Bu durum gıda alımını azalttığı için vücut yağ kitlesi ve total ağırlığında bir düşüşe yol açar. Nesfatin-1'in bu anoreksijenik etki mekanizmasının aydınlatılması için yapılan bir çalışmada, leptin gen defekti bulunan zucker sıçanlara icv yoldan nesfatin-1 uygulanması besin alımında anlamlı oranda azalmaya neden olurken bu hayvanlara nesfatin-1 antikorlarının verilmesi ise leptin enjeksiyonu ile birlikte azalması beklenen besin alımında herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır (43,46).

Leptin dirençli zucker yağlı sıçanlarda ve erkek Wistar sıçanlarda yapılan başka bir çalışmada ise icv olarak uygulanan nesfatin-1'in doz bağımlı şekilde 6 saat boyunca gıda alımını inhibe ettiği gösterilmiştir (65).

Nesfatin-1 aynı zamanda satüre olmadan kan-beyin bariyerini geçebildiği gösterilmiştir (66).

Ekzojen nesfatin-1'in beyine ulaşması hem endojen hem de periferik olarak nesfatin-1 uygulanması aracılığı ile olur. Böylece beslenme davranışını

inhibe eder(67). Yapılan çalışmalarda nesfatin-1'in icv olarak Wistar sıçanlara uygulanmasının gıda alımını doz bağımlı olarak baskıladığı gözlenmiştir (67).

ARC'deki nesfatin-1 immünreaktif nöronları eş zamanlı ghrelin ve des-acyl ghrelin enjeksiyonu ile aktiflenmektedir. Serbestçe beslenen periferik ghrelin enjeksiyonu yapılmış sıçanlarda des-acyl ghrelin indüklü oreksijenik inhibisyonu nesfatin-1 aracılı olabilir(44).

Beyinde birçok bölgeden sentezlendiği tespit edilen nesfatin-1'in hipotalamusta diğer bölgelere göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bu durumnesfatin-1'in hipotalamusta bağlanma bölgelerinin var olabileceğini göstermektedir(43, 46).

Her ne kadar tokluk molekülü olarak bildirilse de nesfatin-1'in karbonhidrat metabolizması üzerine herhangi bir etkisinden söz edilmemektedir. Fakat nesfatin-1,NUCB2'nin mRNA'sının pankreatik beta hücreleri içinde eksprese edildiği gösterilmesinden beri anti-hiperglisemik olabileceği düşünülmüştür(49).Bu varsayımın doğruluğunu ortaya koymak için rekombine nesfatin-1, genetik olarak yapılandırılmış *Escherichia coli*'den arındırılmış ve hiperglisemik sıçanlara intravenöz olarak enjekte edilmiştir. Bu çalışma ile nesfatin-1'in anoreksijenik etkisinin yanındametabolik kontrolde önemli rol oynayan anti-hiperglisemik etkisi ortaya konmuştur (49).

Başka bir çalışmada ise tip 2 diabetli hastalarda, beden-kitle indeksi, plazma insülin ve insülin direnci ile ilişkili olarak plazma nesfatin-1 seviyelerinin arttığı gösterilmiştir(68, 69).

Nesfatin-1'in gıda alımı ve kan şekerregülasyonundaki etkilerine ilaveten kardiyak fonksiyon, su alımı, mide boşalması, stres yanıtları ve anksiyete kontrolünde de büyük rol aldığı gösterilmiştir(70).

Beslenme, duygusal durum ve NUCB2/nesfatin-1 arasındaki karmaşık etkileşimi aydınlatmak için farklı anksiyete seviyelerindeki obezinsanlarda NUCB2/nesfatin-1 düzeylerinin araştırıldığı çalışmada nesfatin-1'in vücut ağırlığına olan etkisine ek olarak duygu değişiminde de etkisinin olduğu, artan nesfatin-1 seviyelerinin anksiyeteyi indüklediği bildirilmiştir (71). Sıçanlar üzerinde yapılan başka bir çalışmada icv olarak uygulanan 5 ve 25 pmol/3 µl dozajlarda nesfatin-1'in, doz bağımlı olarak artmış anksiyete ve/veya korku tipi davranışlarda rol aldığı gözlenmiştir (72).

Hipotalamus ve adipositlerdeki varlığı gösterilen nesfatin-1'in bağırsak hareketliliği üzerindeki etkisine dair çok fazla bilgi yoktur. Merkezi olarak nesfatin-1 uygulanan normal diyetle beslenen sıçanlarınmidenin antral ve duodenum hareketliliği manometrik yöntemler ile değerlendirildiğinde nesfatin-1'in gastroduodenal motiliteyi inhibe ettiği gözlenmiştir (73).

Karanlık fazda merkezi olarak uygulanan nesfatin-1'in besin alımına ve mide boşalmasına etkisinin araştırıldığı bir çalışmada ise, nesfatin-1 icv enjeksiyonunun CRF2 (kortikotropin salgılatıcı faktör 2) reseptör aktivasyonu ile ilişkili olarak karanlık fazda yeme davranışının inhibisyonunu geciktirmekte olduğu görülmüştür(74). Bu verilerle, beslenme davranışını düzenleyen hipotalamus ve arka beyin çekirdeklerinde nesfatin-1 immünpozitif hücrelerin varlığı tespit edilmiş olup ayrıcaarka ve ön beyindedede nesfatin-1 varlığı gözlenmiştir. Buna ek olarak ise, nesfatin-1'in icv enjeksiyonunun iç organları

etkilediğini ve bunu mide boşalmasının seçici inhibisyonu ile sağladığını ve icv enjeksiyon ile yemek alımının CRF2'den bağımsız olarak düzenlendiği belirtilmiştir(74). İcv nesfatin-1 ile indüklemiş sıçanlarda karanlık faz gıda alımının ve gastrik motor fonksiyonu inhibisyonunun ayrı bir mekanizması olduğunu ve astressin 2-B'nin gecikmeye etki etmeksizin gıda alımındaki azalmayı bloke ettiği görülmüştür. Sıçanlarda icv ya da 4. ventriküle enjekte edilen nesfatin-1 mide boşalmasını etki etmediği, ön beyin bölgesi fonksiyonlarının icv nesfatin-1'in gastrik itici motor fonksiyonlarının düzenlenmesini desteklediği görülmüştür(74). Bu verilerde mide boşalmasının gecikmesinde icv ya ic (intrakutan) nesfatin-1 ile indüklenmiş gıda alımının azalmasının etkisi olabileceği düşünülmüştür (74).

Literatürde icv nesfatin-1'i uygulanan sıçanlarda, uygulamayı takiben ortalama arteriyel basınçta önemli artışlar gözlenmiştir. Tedavi öncesi melanokortin-3/4 reseptör antagonisti (SHU9119-icv) veya  $\alpha$ -adrenerjik antagonist (fentolamin-intraarteriyel) uygulanması nesfatin-1 ile indüklenen ortalama arteriyel basınçtaki artışı ortadan kaldırır ve bu da nesfatin-1'in merkezi melanokortin sistemi ile etkileşime girerek sempatik sinir sistemi aktivasyonunu arttırdığını ve bu yolla ortalama arteriyel basınçta artışa neden olduğunu düşündürmüştür (51).

Bir başka çalışmada gestasyonel diyabetes mellitus (GDM)'lu emziren kadınların serum, süt ve kolostrumundaki nesfatin-1 'in normal bayanlara göre daha düşük seviyede olduğu bulunmuştur (75).

Nesfatin-1'in erkek sıçanlarda burun içi olarak uygulanmasının da etkili olup olmadığı araştırılmıştır. Çünkü burun içi yol leptin direnci gibi durumlarda

ortaya çıkan kan-beyin bariyerinde oluşan değişikliklerden bağımsızdır ve böylece nesfatin-1 beyine kolayca giriş yapabilir(76).

Bu amaçla, Nesfatin-1 sıçanların her iki burun içi bölgesine 10 nmol/sıçan dozda uygulanmıştır. Nesfatin-1'in burun içi uygulaması neticesinde 6 saat süresince gıda alımının azaldığı belirlenmiştir. Uygulamadan 6 saat sonra anoreksijenik etki ortadan kalkmıştır. Bu durum, insanlarda obezitenin tedavisine yönelik olarak ileride nesfatin-1'in burun içi olarak uygulanabileceği ihtimalini ortaya koymaktadır (45).

Anti-obezite etkili ilaç üretilmesi amacıyla, nesfatin-1 analoglarının geliştirilmesine yönelik çalışmalarda, nesfatin-1'in aktif segmentinin belirlenmesine de çalışılmıştır. Nesfatin-1'in üç ayrı segmente sahip olduğu ortaya konulmuştur. Bu segmentlerden 1-23 aminoasitlik bölüm N23, 23-53 aminoasitlik bölüm M30 ve 53-82 aminoasitlik bölüm ise C29 olarak adlandırılmıştır. Nesfatin-1'in bu üç segmentinin beslenme davranışı üzerine etkilerini belirlemeye yönelik yapılan çalışmalarda, orta segmentin yani M30'un iştah üzerine etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (77) İp (IC<sub>50</sub>=0.35 nmol/gr vücut ağırlığı)

Çeşitli fonksiyonları keşfedilen nesfatin-1'in kardiyovasküler kontrolde de rol aldığı düşünülmektedir. Ancak doğrudan kalp performansını etkileyip etkilemediği bilinmemektedir. İzole ve Langendorff perfüze sıçan kalp preparatlarında, ekzojen nesfatin-1'in koroner hareketliliği etkilemeden kasılma ve gevşemeyi bozduğu gözlenmiştir(58). Aynı zamanda hipertansif olduğu doğrultusundaki çalışmaları destekler şekilde nesfatin-1'in, periferik arterlerin NO- bağımlı damar genişlemesine karşı koyduğu bulunmuştur (58).

Nesfatin-1'in apoptozu ve nötrofil infiltrasyonunu inhibe ettiği, sitokinlerin salınımını düzenleyerek sıçanlardasubaraknoid kanama(SAK)kaynaklı yaralanmalarda nöroprotektif rol aldığı ortaya konmuştur (78).

Nesfatin-1'in kan-beyin bariyerini geçebildiği ve yarılanma süresinin yaklaşık 10 dakika sürdüğü daha önce belirtilmiştir. Ancak antiinflamatuvar etkisinin saatlerce sürmesi hücre içi ve sistemik etkilerinin uzun süreli olduğunu düşündürmektedir (66, 79).

Nesfatin-1'in kan beyin bariyerini geçmesi sebebiyle SAK kaynaklı oksidatif beyin hasarında yeni birtedavi edicijajan olabileceği ileri sürülmektedir (78).

Travmatik beyin hasarı sonrası inflamatuvar yanıt ve nöronal hücre apoptozu üzerine nesfatin-1'in etkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada nesfatin-1'in nükleer faktör kapp $\beta$  bağımlı inflamatuvar yanıtları inhibe ettiği ve sıçanlarda travmatik beyin hasarı sonrası kaspaz 3 aracılı nöronal hücre apoptozunu azalttığı gözlenmiştir. İlk defa bu çalışmada travma sonrası nesfatin-1 uygulanmasıyla zayıflamış apoptotik sinir hücresi ve kaspaz 3 aktivitesinde azalma olduğu gösterildi. Verilere göre nesfatin-1'in akut faz reaksiyonları sırasında meydana gelen inflamasyona müdahale edebileceği düşünülmektedir (80).

Ratlarda nesfatin-1 i.v. enjeksiyonunun subkutanöz epididimal ve mezenterik yağkitesini ciddi miktarda azalttığı fakat gastrokinemius kas kitlesinde değişiklik yapmadığı belirtilmiştir(82). Bunun aksine NUCB2 antiense morfolin oligonükleotidinin icv enjeksiyonunun hipotalamustaki NUCB2 içeriğini azalttığı ve iştahı artırdığı tespit edilmiştir. Bunun sonucunda ilk beş günde kilo

alımında herhangi bir değişiklik olmadığı, beşinci günden sonra önemli bir artış olduğu saptanmıştır(82).

Troglitazonelar, kan beyin bariyerini geçemedikleri için kemiricilerin yeme alışkanlıklarını değiştiremezler ve buna bağlı olarak vücut ağırlığı üzerine etki etmezler(83). Bu bilgiler göz önüne alınarak bu proteinin hipotalamustaki bir gen aracılığı ile meydana gelip gelmediği hakkında ileri çalışmalar yapılmıştır. Bu amaç doğrultusunda ratlarda immunohistokimyasal analizler için bir anti-NUCB2 antikoru kullanılmıştır. Bu analizle NUCB2'nin yapısında kianti-NUCB2 antikoru tamamen ortaya çıkarılmıştır. Böylece hipotalamusta yemek yeme alışkanlığını düzenleyen arkuat, paraventriküler, supraoptik nükleus ile nükleus tractus solitariusun çekirdeklerinde NUCB2 var olduğu tesbit edilmiştir(84).

Ratlarda yiyecek alımı NUCB2'den türeyen bütün fragmentlerin icv enjeksiyonu sonucu ayrı ayrı tesbit edilmiştir. Ratlarda yiyecek alımının baskılandığı ya da azaldığı icv enjeksiyonların nesfatin-1 ile aynı sentetik yapıda peptitlerin olduğu belirlenmiştir. Bunun etkisinin ortalama 6 hafta boyunca devam ettiği görülmüştür. Bunun tam tersi olarak yemek alışkanlığını etkilenmediği icv enjeksiyonlarının nesfatin-2, nesfatin-3 ve nesfatin-2/3'ün yerini tutan diğer fragmanlar olduğu tesbit edilmiştir. Ayrıca IgG kaynaklı nesfatin Ab24 yemeyi yüksek düzeyde uyardığı, yine IgG den türeyen nesfatin Ab3012'in ise iştahi etkilemediği tesbit edilmiştir(84).

Ratlarda immün boyama çalışmalarında yiyecek alımının düzenlenmesinde önemli rol oynayan hipotalamusun paraventriküler ve arkuat çekirdeklerinde önemli miktarda NUCB2/nesfatin-1 içeren proteine rastlanmıştır. Nesfatin-1 varlığında paraventriküler nükleus (PVN) nöronlarının membran potansiyellerinin

değiştigi gözlenmiştir. Şöyle ki; ratlarda 24 saatlik bir açlık sonrası PVN nöronlarındaki NUCB2 proteinlerindeki mRNA sayısı azalmış, yeniden beslenme ile PVN nöronları aktive olur ve bunun sonucunda nesfatin-1 immunoreaktif nöronların sayısında ciddi bir artış olmuştur. Bu da bize hipotalamik nesfatin-1'in yiyecek alımında fizyolojik olarak rolünün olduğunu gösterir(85).

Yapılan başka bir immunohistokimyasal çalışmada nesfatin/NUCB2'nin pankreasın ekzokrin hücrelerinde bulunmadığı fakat pankreatik keselerin orjininde çok miktarda bulunduğu tesbit edilmiştir(86). Pankreastaki Langerhans hücreleri kandaki glikoz düzeyinin düzenlenmesinden sorumludur. Pankreatik keselerin içerisinde farklı hücre tipleri rastgele dağılmamışlardır. Beta hücreleri merkez kısmında bulunurken alfa ve gama hücreleri dışa doğru bir halka şeklinde dizilmişlerdir(86).

Nesfatin-1/NEFA/nucleobindin2 geninin bir ürünüdür. Nesfatin-1'in stres adaptasyon cevabı için ratlarda uygulanan icv enjeksiyonu sonrası güçlü bir anksiyolitik cevap sağladığı belirtilmiştir(87).

Omurgalı canlılarda stres cevaplarının düzenlenmesi farklı nöropeptidler aracılığı ile sağlanır. Periferal stres cevabı açısından bu nöropeptitlerin başında CRF ve ürokortin nöropeptidleri gelir. Ürokortin nöropeptidi en çok Edinger-Westphal çekirdeğinde tesbit edilmiştir. EW çekirdeği npEW, Ucn1 diye iki farklı nöron gurubunda oluştuğu tesbit edilmiştir. Farenin npEW'sinde, bulunan nesfatin-1'inkokain ve amfetamin regulated transcript (CART) ve Ucn1 üreten nöronların akut stresin aktivitesini etkilediği belirtilmiştir(87).

Bu alanda yapılan çalışmalarda elde edilen veriler birlikte ele alınıp değerlendirildiğinde, nesfatin-1'in merkezi veya periferik uygulanması sonucunda kendini gösteren gıda alımındaki baskılanma, periferik kolecystokinin(CCK)yanıtı ile bağlantılı olabileceği düşünülmektedir(88).

NUCB1 ve NUCB2 salgı proteinleridir(89, 90).Fonksiyonları ve etki mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir (91, 92).

## 4. GEREÇ VE YÖNTEM

### 4.1. Deney Hayvanlarının Bakım ve Beslenmeleri

Çalışmada Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden temin edilen, 200-250 g ağırlığında 41 adet Wistar cinsi intak erkek sıçan kullanıldı.

Sıçanlar 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamda,  $21\pm 1^{\circ}\text{C}$  oda sıcaklığında, plastik kafeslerde tutuldu. Cam şişelerdeki çeşme suyuyla ve Elazığ Yem Fabrikası'nda hazırlanan pelet halindeki özel sıçan yemleriyle beslendi.

### 4.2. Deney Hayvanlarının Hazırlanması

Altı-yedi aylık 200-250 gr ağırlığındaki erkek sıçanlara herhangi bir ön muameleye tabi tutulmadan ve herhangi bir stres faktörüne maruz kalmamasına dikkat edilerek anestezi yapılmaksızın dakapite edildi. Daha sonra toraks hızlı bir şekilde açılarak aort krebs solisyonunun içine alınarak mümkün olan en kısa sürede organ banyosunda işleme tabi tutuldu.

### 4.3. Krebs Solusyonu

Krebs çözeltisi in vivo ortamdaki fizyolojik şartları in vitro ortamda da belli ölçülerde sağlayan bir çözeltidir. İçeriği itibariyle uterus düz kas hücrelerinin kasılabilirlik özelliklerini optimal düzeyde in vitro olarak sürdürebilmelerine imkan sağlamaktadır. Çalışmada kullanılan çözeltinin pH'ı 7.4' e ayarlanmıştır. Krebs solusyonu içeriği mM/L olarak aşağıdaki tabloda belirtilmiştir:

**Tablo 1.** Krebs solusyonu içeriği mM/L

NaCl	118
KCl	4,7
MgSO <sub>4</sub>	1,2
Glikoz	11,5
CaCl <sub>2</sub>	2,4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,18
NaHCO <sub>3</sub>	15,8
EDTA	0,016

#### **4.4. Deney Düzeneği**

Çalışmada kullanılan organ banyosu iki hazneli bir sistemdir. Bu sistemde iki ayrı düz kas şeridiyle aynı anda çalışlabilmektedir. Sistemin üniteleri şunlardan oluşmaktadır:

1. Oksijen karbondioksit kaynağı
2. Organ banyosu
3. Termostatlı dolaşım pompası
4. Amplifikatör
5. Kayıt ünitesi

##### **4.4.1. Oksijen karbondioksit kaynağı:**

Düz kasların kasılabilmesi için gereken gaz karışımı in vitro ortamda optimal olarak %95 O<sub>2</sub> ve %5 CO<sub>2</sub>' den oluşmaktadır. İzole organ banyosu ve

kayıt sisteminde de bu karışımda hazırlanmış O<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub> içeriği hazneye sürekli olarak sirküle edildi.

#### **4.4.2. Organ banyosu**

İçerisinde %95 oksijen ve %5 karbondioksitle sürekli gazlandırılan termostat kontrolü ile 37 °C'de sabit tutulan, Krebs solüsyonu bulunan ısı çeketli çift çeperli bir cihazdır. Dört kısımdan oluşmaktadır.



##### **4.4.2.1. Krebs Solüsyonunun Depolandığı Kısım**

500 ml'lik hacme sahiptir ve iç içe iki katmandan oluşur. Bunların arasındaki boşlukta termosirkülatörden gelen su bulunur. İç katmanın içinde ise krebs solüsyonu mevcut olup, buradan istenilen miktarda alınıp kullanılabilir.

#### **4.4.2.2. Organ Banyosu Hazneleri**

Değişken kapasiteli haznelere (5,10,50 ml'lik) sahiptir. Bunlarda iç içe iki katmandan oluşmaktadır. Yine iki katman arasında termosirkulatörde ısıtılmış su bulunmaktadır. İç katmanın içinde ise Krebs solüsyonu ve çalışmalarda kullanılan düz kas şeritlerinin asılacağı düzenek mevcuttur. Aort halkaları biri hazne içinde diğeri dışında yer alan iki çengel arasına ipek iplik yardımıyla asılmaktadır.

#### **4.4.2.3. Kanal ve Kapak Sistemi**

Bu sistem yardımıyla Krebs solüsyonunun tüm organ banyosu boyunca dolaşımı sağlanmaktadır.

#### **4.4.2.4. İzometrik Transduser**

Bu donanım sayesinde hazneler içinde yer alan düz kas şeritlerinde meydana gelen izometrik kontraksiyonlardan kaynaklanan fiziksel kuvvetler algılanır ve bu fiziksel kuvvetler elektriksel sinyallere çevrilerek, ölçümler değerlendirme ünitesine sevk edilir.

#### **4.4.2.5 Termosirkulatör**

İçerisinde distile su bulunmakta olup, termosirkulatör mevcut suyu istenilen ısı derecesine kadar ısıtmaktadır. Isıtılan su krebs solüsyonunun depolandığı alana ve haznelere çeşitli yollarla gitmektedir. Krebs solüsyonunun depolandığı alan ve hazneler iç içe iki katmandan oluştuğundan, katmanlar arasında bir boşluk yer almaktadır. Termostat hassasiyet aralığı  $36,7 \pm 0,1$  °C' dir. Termosirkulatörden gelen ısıtılmış su bu boşlukta dolaşmakta ve böylece ortamın vücut sıcaklığında olması sağlanmaktadır.

#### **4.4.2.6. Amplifikatör**

Transduserden gelen elektriksel sinyalleri alır ve bunları amplifiye eder. Yani bu elektriksel sinyaller daha da büyütülür.

#### **4.4.2.7. Kayıt ünitesi**

Bilgisayar, veri kazanım ve yazılım programından (Biopac) oluşmaktadır. Yapılan çalışma sonuçlarının kişiler tarafından gözlenmesini sağlamaktadır. Bu sonuçlar pikler şeklinde monitöre yansımaktadır. Piklerin entegre alan, frekans ve amplitütlerine hesaplanarak yorumlar yapılmaktadır.

#### **4.5.İmmunohistokimyasal Boyama**

Dekapitasyonun ardından midsaggital insizyon yapılarak sıçanların torasik aorta örneklerinin bir kısmı hızlıca çıkarılıp %10'luk formaldehit solüsyonu ile tespit edildi. Rutin histolojik doku hazırlama prosedürü ile parafin bloklar hazırlandı. Parafin bloklardan polilizinli lamlara 5-6 µm kalınlığında kesitler alındı. Deparafinizasyonun ardından dokular dereceli alkol serilerinden geçirilerek antijen retrieval için sitrat tampon solüsyonunda pH:6'da mikrodalga fırında (750 W) 7+5 dakika olmak üzere toplam 12 dakika kaynatıldı. Zemin boyasını önlemek için Ultra V Block (TA-125-UB, Lab Vision Corporation, USA) solüsyonu uygulamasını takiben primer antikor ( nesfatin-1 rat primary antibody, phoenix pharmaceuticals) için 60 dakika inkübe edildi. Primer antikor uygulanmasının ardından sekonder antikor (biyotinli goat anti- polyvalent) uygulandı. Sonra streptavidin horseradish peroksidaz'e 30 dakika maruz bırakıldı ve 3-Amino-9-ethyl carbazole kromojeni uygulanıp zıt boyama için Mayer's hematoksilen ile

muamele edildi. Negatif kontrol için hazırlanan dokularda primer antikor yerine fosfat tamponlanmış tuzlu su (PBS) kullanıldı, diğer basamaklar aynı şekilde uygulandı. PBS ve distile sudan geçirilen dokular uygun kapatma solusyonu ile kapatılıp, hazırlanan preparatlar Novel N-800M mikroskobunda incelendi.

İstatistiksel değerlendirme SPSS 10.0 programı ile yapıldı. İstatistiksel değerlendirmede tek yönlü varyans analizi yapıldı. One Way Anova ile paired T-testi analizi yöntemleri kullanıldı.  $p < 0,05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 5. BULGULAR

### 5.1. Kasılma Protokolü Bulguları

Aort kesitleri Krebs solüsyonu içeren organ banyosu haznesine yerleştirildi. İki gram gerim altında aort gerime uyum sağlayana kadar yaklaşık 90 dakika takip edildi. Daha sonra kontrol amaçlı organ banyosu haznesine 30 sn aralıklarla  $10^{-8}$  M'dan başlayıp  $10^{-3}$  M'a kadar artan konsantrasyonda felinefrin (FNF) uygulandı.  $10^{-8}$  M'dan başlayarak kasılma gerilimleri yüzde olarak sırası ile % 33±4, 47±8, 61±9, 75±6, 87±5, 100±0 olarak belirlendi. En yüksek doz olan  $10^{-3}$  M'daki kasılma %100 kabul edilerek diğer dozlardaki kasılmalar % olarak kayıt altına alınarak kontrol değerleri belirlendi.

FNF'nin artan dozuna karşılık aort damar halkasında gerilim doz bağımlı olarak artmıştır. Gerilim artımı  $10^{-6}$  M'dan sonra istatistiksel olarak anlamlıydı ( $P < 0.05$ ) (n=8).

Kontrol kasılma protokolünün ardında FNF'nin ortamdan uzaklaştırılması ve kasılmanın normal duruma gelmesi için yaklaşık 60 dk. yıkama yapıldı. Nesfatinin kasılma üzerindeki etkisine bakılmak için izole organ banyosu haznesine 0.1 nM nesfatin ilave edildi ve 10 dk. sonra  $10^{-8}$  M'dan başlayıp  $10^{-3}$  M'e kadar FNF (kasılma protokolü) 30 sn bir uygulandı. Kasılma genlikleri  $10^{-8}$  M'dan başlayarak sırası ile % 30±6, 42±7, 58±6, 72±7, 85±5, 100±0 olarak tespit edildi.

Kontrol grubu ile 0,1 nM nesfatin-1 verilen grup incelendiğinde bu iki grup arasında kasılmagenliklerinin yüzdeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı

farklılık olmadığı yani nesfati-1'inbu grupta kasılmayı anlamlı bir şekilde etkilemediği ortaya konmuştur ( $P < 0.05$ ) ( $n=8$ ).

0.1nM nesfatin-1 verilmesinin ardında aynı işlemler 1nM ve 10nM nesfatin-1 için ayrı ayrı tekrar edildi.

1nM nesfatin-1 verilen grupta kasılma genlik yüzdeleri  $10^{-8}$  M'dan başlayarak sırası ile %  $26 \pm 5$ ,  $35 \pm 4$ ,  $43 \pm 7$ ,  $59 \pm 6$ ,  $79 \pm 8$ ,  $100 \pm 0$  olarak tespit edildi.

1nM nesfatin-1 verilen grup ile kontrol ve 0,1 nM nesfatin-1 verilen grup arasında kasılma gerilim yüzdeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmiş olup nesfatin-1'in kasılmaları inhibe ettiğini ortaya konmuştur. ( $P < 0.05$ ) ( $n=8$ ).

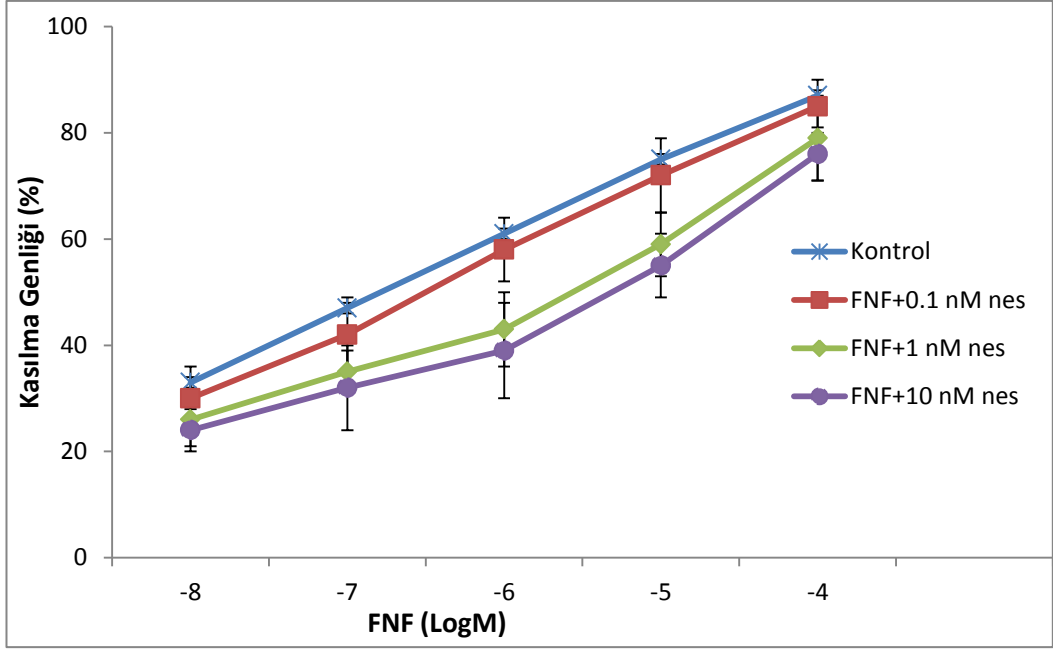
10 nM nesfatin-1 verilen grupta kasılma gerilim yüzdeleri  $10^{-8}$  M'den başlayarak sırası ile %  $24 \pm 5$ ,  $32 \pm 6$ ,  $39 \pm 5$ ,  $55 \pm 6$ ,  $76 \pm 6$ ,  $100 \pm 0$  olarak tespit edilmiştir.

10nM nesfatin-1 verilen grup ile kontrol ve 0,1 nM nesfatin-1 verilen grup arasında kasılma yüzdesi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık varken 1nM nesfatin-1 verilen grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı gözlenmiştir. Burada da nesfatin-1'in 1ve 10 nM uygulanan grupta kasılmayı baskıladığı 0.1 nM uygulanan grupta kasılma üzerinde anlamlı bir etki göstermediği ortaya konmuştur ( $P < 0.05$ ) ( $n=8$ ).

**Tablo 2.**Felinefrinin aortkesiti üzerindeki (kontrol, 0.1, 1, 10 nM nesfatin uygulanan guruplar ) kasılma yüzde değerleri. Değerler en yüksek kasılma gerilimi %100 alınarak  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.  $P<0.05$  Tek Yönlü Varyans Analizi.

<b>Feninefrin (logM)</b>	<b>Kontrol (%)</b>	<b>0.1 nM Nesfatin (%)</b>	<b>1 nM Nesfatin (%)</b>	<b>10 nM Nesfatin (%)</b>
<b>10<sup>-8</sup></b>	33 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	30 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	26 $\pm$ 5 <sup>b</sup>	24 $\pm$ 5 <sup>b</sup>
<b>10<sup>-7</sup></b>	47 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	42 $\pm$ 7 <sup>a</sup>	35 $\pm$ 4 <sup>b</sup>	32 $\pm$ 6 <sup>b</sup>
<b>10<sup>-6</sup></b>	61 $\pm$ 9 <sup>a</sup>	58 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	43 $\pm$ 7 <sup>b</sup>	39 $\pm$ 5 <sup>b</sup>
<b>10<sup>-5</sup></b>	75 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	72 $\pm$ 7 <sup>a</sup>	59 $\pm$ 6 <sup>b</sup>	55 $\pm$ 6 <sup>b</sup>
<b>10<sup>-4</sup></b>	87 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	85 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	79 $\pm$ 8 <sup>b</sup>	76 $\pm$ 6 <sup>b</sup>
<b>10<sup>-3</sup></b>	100 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	100 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	100 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	100 $\pm$ 0 <sup>a</sup>

Tablo 2' deki veriler incelendiğinde aort kontraksiyonu kontrol gurubu ile 0.1nM nesfatin uygulanan gurup arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı değilken kontrol gurubu ile 1, 10 nM nesfatin eklene guruplardaki kasılma yüzdelerinin azalması istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Veriler 1nM ve 10nM nesfatinin uygulanan gruptakasıma yüzdelerinde azalmaya sebep olduğunu açıkça göstermektedir. Buda 1 nM ve 10 nM nesfatin-1 uygulanan grupta kasılmaların baskılandığını gösterir yani nesfatin-1'in kasılmayı inhibe ettiği söylenebilir.



**Şekil 4.** Nesfatin-1 yokluğunda (kontrol) ,0.1, 1, 10 nM Nesfatin-1 ilave edilen aort halkalarının artan dozlarda FNF ile kasılma yüzdeleri eğrisi.  $P < 0.05$  Tek Yönlü Varyans Analizi.(kontrol n=8, 0,1nes. n=8, 1 nes. n=8, 10 nes. n=8)

## 5.2. Gevşeme Protokolü Bulguları

Aort kesitleri tıpkı kasılma protokolü gibi Krebs solüsyonu içeren organ banyosu haznesine yerleştirildi. iki gr. gerilim altında kasılmalar stabil olana kadar yaklaşık 90 dakika yıkama yapılarak izlendi. Gevşeme protokolü sodyumnitroprosyd (SNP) ve asetilkolin (Ach) ile uygulandı.

İki gr gerilim altında stabil kasılmalarla seyreden aort kesiti maksimum kasılma dozu olan  $10^{-3}$  M FNF'in bir alt dozu olan  $10^{-4}$  M FNF (submax doz) ile kasıldı daha sonra iki ayrı gevşeme protokolü olan SNP  $10^{-8}$  M'dan başlayıp  $10^{-3}$  M'a kadar ve Ach  $10^{-8}$  M'dan başlayıp  $10^{-3}$  M'a kadar farklı ort kesilerinde 30 sn aralılarla uygulandı. Maksimum gevşeme elde edilen  $10^{-3}$ M deki gevşeme gerginliği %100 kabul edilerek kayıt altına alındı.

SNP ve Ach gevşeme protokolü uygulanan organ banyosu hazneleri SNP ve Ach uzaklaştırılması için 60 dk boyunca yıkandı ve 60 dk sonunda organ banyosu haznelerine 0,1 nM nesfatin-1 ilave edilerek 10 dk sonra aynı şekilde submax FNF ve ardında ayrı ayrı SNP ve ACH gevşeme protokolleri uygulandı. Bu işlem 1nM ve 10 nM nesfatin-1 içinde uygulandı.

### **5.2.1.Sodyum Nitroprosyd Gevşeme Protokolü Bulguları**

Nesfatin-1 verilmeyen (kontrol) gurubunda SNP'nin  $10^{-8}$  M'dan başlayarak  $10^{-3}$  M'a kadar uygulanması sonucu elde edilen gevşeme gerilim yüzdeleri sırası ile %  $19\pm3$ ,  $27\pm3$ ,  $37\pm6$ ,  $49\pm5$ ,  $69\pm8$ ,  $100\pm0$  olarak tespit edildi ve kontrol gurubu olarak değerlendirildi. SNP'nin artan dozuna karşılık gevşeme yüzdelerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdi ( $P < 0.05$ ) ( $n=7$ ).

0.1 nM nesfatin-1 uygulanan guruba aynı şekilde  $10^{-8}$  M'dan başlayarak  $10^{-3}$  M'a kadar artan dozlarda SNP uygulandı. Gevşeme gerilim yüzdeleri sırası ile %  $16\pm4$ ,  $23\pm5$ ,  $32\pm6$ ,  $42\pm5$ ,  $63\pm8$ ,  $100\pm0$  olarak kayıt altına alındı.

0,1 nM nesfatin uygulanan gurupta SNP'nin artan dozuna karşılık gevşeme yüzdelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenirken kontrol gurubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Bu da 0,1 nM nesfatinin gevşeme üzerinde anlamlı bir etki göstermediğini ortaya çıkarmıştır ( $P < 0.05$ ) ( $n=7$ ).

1nM nesfatin uygulanan gurupta  $10^{-8}$  M'dan  $10^{-3}$  M'a kadar artan dozlarda SNP uygulanması sonucu elde edilen gevşeme gerilimi yüzdeleri sırası ile %  $13\pm2$ ,  $17\pm3$ ,  $22\pm3$ ,  $27\pm4$ ,  $59\pm6$ ,  $100\pm0$  şeklinde kayıt altına alındı.

1nM nesfatin uygulanan grupta da SNP' nin artan dozuna karşılık gevşeme gerilim yüzdelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlenmiştir. 1 nM nesfatin-1 verilen gurupla kontrol gurubu ve 0.1nM nesfatin-1 verilen gurupla kıyaslandığında gevşeme gerilim yüzdelerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmüştür. Bu da 0,1 nM nesfatin-'in gevşemeyi anlamlı bir şekilde baskıladığını ortaya koymuştur(P< 0.05) (n=7).

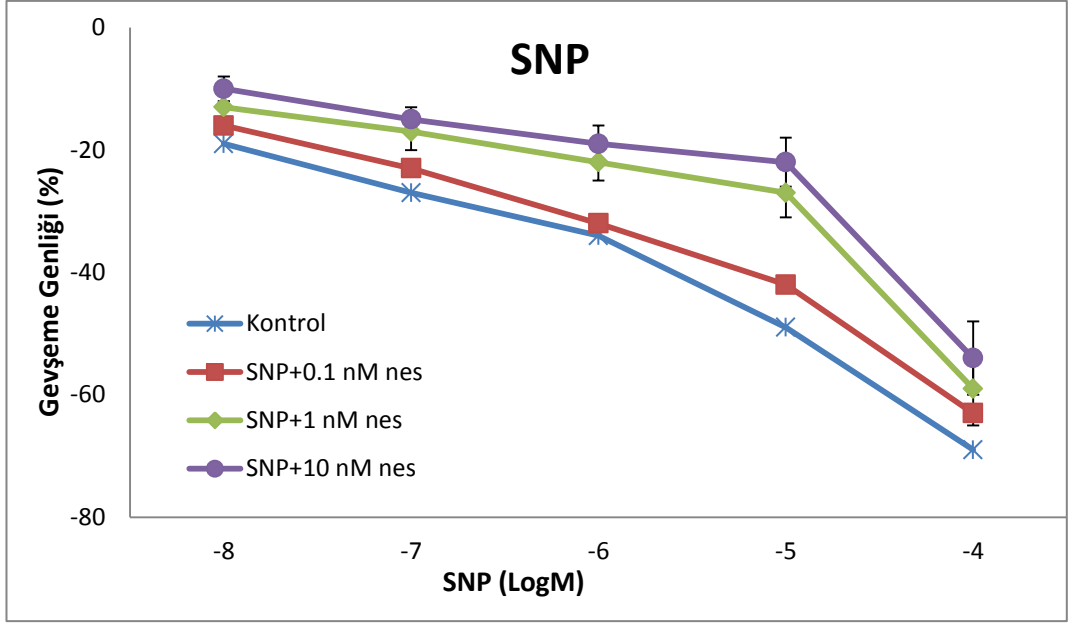
10 nM nesfatin verilen guruba SNP uygulanması sonucu elde edilen gevşeme gerilimi yüzdeleri  $10^{-8}$  M'dan itibaren sırası ile %  $10\pm 2$ ,  $16\pm 2$ ,  $19\pm 3$ ,  $22\pm 4$ ,  $54\pm 6$ ,  $100\pm 0$  olarak bulunmuştur.

10 nM nesfatin uygulanangurupta SNP' nin artan dozuna karşılık olarak gevşeme yüzdelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlenmiştir. 10nM nesfatin uygulanan gurup ile 1nM nesfatin uygulanan gurup arasında gevşeme gerilim yüzdeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yok iken kontrol ve 0.1nM nesfatin uygulanan guruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Burada da 10 nM nesfatin-1'in kontrol ve 0,1 nM nesfatin verilen guruba göre gevşemeyi baskıladığı 1 nM nesfatin-1 verlen guruba göre gevşemeye etki etmediği ortaya konmuştur (P< 0.05) (n=7).

**Tablo 3.** SNP'nin aort kesiti üzerindeki (kontrol, 0.1, 1, 10 nM nesfatin uygulanan guruplar )gevşeme değerleri. Değerler en yüksek gevşeme gerilimi %100 alınarak  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. P<0.05 Tek Yönlü Varyans Analizi.

SNP	Kontrol	0.1 nM Nesfatin-1	1 nM Nesfatin-1	10 nM Nesfatin-1
M	(%)	(%)	(%)	(%)
$10^{-8}$	19 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	16 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	13 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	10 $\pm$ 2 <sup>b</sup>
$10^{-7}$	27 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	23 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	17 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	16 $\pm$ 2 <sup>b</sup>
$10^{-6}$	37 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	32 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	22 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	19 $\pm$ 3 <sup>b</sup>
$10^{-5}$	49 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	42 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	27 $\pm$ 4 <sup>b</sup>	22 $\pm$ 4 <sup>b</sup>
$10^{-4}$	69 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	63 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	59 $\pm$ 6 <sup>b</sup>	54 $\pm$ 6 <sup>b</sup>
$10^{-3}$	100 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	100 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	100 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	100 $\pm$ 0 <sup>a</sup>

Tablo 3'deki verilere bakıldığında aorttaki gevşeme yüzdeleri SNP 'nin artan dozuna karşılık arttığı, artış oranlarının farklılık gösterdiği görülmektedir. Kontrol gurubu ile 0,1 nesfatin-1 uygulanan gurup arasında istatistiksel olarak farklılık olmadığı, kontrol gurubu ile 1nM ve 10 nM nesfatin-1 uygulanan guruplarda  $10^{-5}$  M SNP uygulanan seviyeye kadar kasılma yüzdelerini azalttığı açıkça görülmektedir. 1 nM nesfatin-1 uygulanan gurup ile 10 nM nesfatin-1 uygulanan gurup arasında farklılık bulunmamıştır.



**Şekil 5.** Nesfatin-1 olmaksızın (kontrol) , 0.1, 1, 10 nM Nesfatin-1 ilave edilen aort kesitlerinin artan dozlarda SNP ile gevşeme eğrisi.  $P < 0.05$  Tek Yönlü Varyans Analizi. (kontrol  $n=7$ , 0,1nes.  $n=7$ , 1 nes.  $n=7$ , 10 nes.  $n=7$ )

### 5.2.2. Ach Gevşeme Protokolü Bulguları

Ach ile uygulanan gevşeme protokolünde kontrol gurubunda elde edilen gevşeme gerilim yüzdeleri  $10^{-8}$  M'dan itibaren sırası ile %  $17 \pm 2$ ,  $20 \pm 3$ ,  $24 \pm 4$ ,  $42 \pm 6$ ,  $72 \pm 8$ ,  $100 \pm 0$  olarak tesbit edildi. Kontrol gurubunda artan Ach konsantrasyonuna karşılık gevşeme gerilim yüzdelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ( $P < 0.05$ ) ( $n=7$ ).

0.1nM nesfatin uygulanan guruba  $10^{-8}$  M'dan başlayarak Ach uygulanması sonucu elde edilen gevşeme gerilimi yüzdeleri sırası ile %  $12 \pm 3$ ,  $13 \pm 2$ ,  $21 \pm 3$ ,  $39 \pm 4$ ,  $67 \pm 6$ ,  $100 \pm 0$  şeklindedir. 0.1 nM nesfatin uygulanan gurupta artan konsantrasyonda Ach uygulanması sonucunda gevşeme gerilimi yüzdelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalış gözlenirken kontrol grubu ile

karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Yani 0,1nM nesfatin uygulanması aortun Ach ile gevşemesi üzerine anlamlı bir etki göstermemiştir ( $P < 0.05$ ) ( $n=7$ ).

1nM nesfatin-1 uygulanan guruba Ach uygulanması sonucu elde edilen gevşeme gerilim yüzdeleri  $10^{-8}$  M'dan başlayarak sırası ile %  $9 \pm 2$ ,  $11 \pm 3$ ,  $17 \pm 3$ ,  $25 \pm 4$ ,  $55 \pm 6$ ,  $100 \pm 0$  olarak bulunmuştur.

1nM nesfatin-1 uygulanan grupta artan konsantrasyonda Ach uygulanması sonucunda gevşeme gerilimi yüzdelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalış gözlenmiştir. Kontrol gurubu ve 0,1 nM nesfatin-1 uygulanan grup karşılaştırıldığında gevşeme yüzdeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren veriler elde edilmiştir. Elde edilen veriler 1 nM nesfatin-1 uygulaması aortun Ach ile gevşemesini bloke ettiğini, gevşemeyi baskıladığını ortaya koymuştur ( $P < 0.05$ ) ( $n=7$ ).

Son olarak 10nM nesfatin uygulanan grupta  $10^{-8}$  M'dan başlayarak artan konsantrasyonda Ach uygulanması sonucunda gevşeme gerilimi yüzdeleri sırası ile %  $6 \pm 2$ ,  $8 \pm 2$ ,  $12 \pm 3$ ,  $23 \pm 3$ ,  $53 \pm 5$ ,  $100 \pm 0$  olarak bulunmuştur. 10nM nesfatin-1 uygulanan grupta  $10^{-8}$  M'dan başlayarak artan konsantrasyonda Ach uygulanması sonucunda gevşeme gerilim yüzdelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalış gözlenmiştir. Kontrol gurubu ve 0.1 nM nesfatin-1 uygulanan grup ile karşılaştırıldığında gevşeme yüzdeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren veriler elde edilirken 1nM nesfatin uygulanan grup ile karşılaştırıldığında gevşeme yüzdeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık elde edilmemiştir. Burada da 10 nM nesfatin-1 uygulaması kontrol ve 0,1nM nesfatin uygulanan guruba göre gevşemeyi inhibe ettiği, 1 nM nesfatin-1

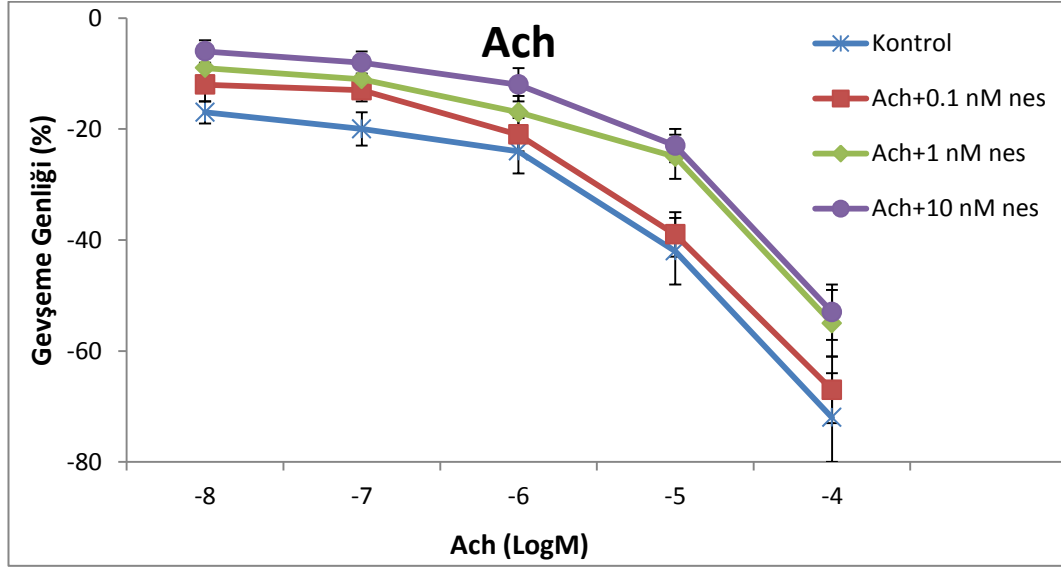
uygulanan guruba göre gevşeme üzerine anlamlı bir etki göstermediği ortaya konmuştur ( $P < 0.05$ ) ( $n=7$ ).

**Tablo 4.**ACH'nin aort kesiti üzerindeki (kontrol, 0.1, 1, 10 nM nesfatin uygulanan gruplar) gevşeme değerleri. Değerler en yüksek gevşeme gerilimi %100 alınarak  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.  $P < 0.05$  Tek Yönlü Varyans Analizi.

Ach M	Kontrol (%)	0.1 nM Nesfatin-1 (%)	1 nM Nesfatin-1 (%)	10 nM Nesfatin-1 (%)
$10^{-8}$	17 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	12 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	9 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	6 $\pm$ 2 <sup>b</sup>
$10^{-7}$	20 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	13 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	11 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	8 $\pm$ 2 <sup>b</sup>
$10^{-6}$	24 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	21 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	17 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	12 $\pm$ 3 <sup>b</sup>
$10^{-5}$	42 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	39 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	25 $\pm$ 4 <sup>b</sup>	23 $\pm$ 3 <sup>b</sup>
$10^{-4}$	72 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	67 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	55 $\pm$ 6 <sup>b</sup>	53 $\pm$ 5 <sup>b</sup>
$10^{-3}$	100 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	100 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	100 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	100 $\pm$ 0 <sup>a</sup>

Tablo 4'deki verilere bakıldığında aorttaki gevşeme yüzdeleri ACH 'nin artan dozuna karşılık arttığı, artış oranlarının farklılık gösterdiği görülmektedir. Kontrol gurubu ile 0,1 nesfatin-1 uygulanan gurup arasında istatistiksel olarak farklılık olmadığı, kontrol gurubu ile 1nM ve 10 nM nesfatin-1 uygulanan guruplarda  $10^{-5}$  M Ach uygulanan seviyeye kadar kasılma yüzdeleri azalttığı

açıkça görülmektedir. 1 nM nesfatin-1 uygulanan gurup ile 10 nM nesfatin-1 uygulanan gurup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır.



**Şekil 6.** Nesfatin-1 olmaksızın (kontrol) , 0,1, 1, 10 nM Nesfatin-1 ilave edilen aort kesitlerinin artan dozlarda Ach ile gevşeme eğrisi. P<0.05 Tek Yönlü Varyans Analizi.

### 5.3.İmmünohistokimyasal Bulgular

Boyamada immün reaktivitenin yaygınlığı (0,1: <%25, 0,4:%26-50, 0,6:%51-75, 0,9:%76-100) ve şiddeti (0:yok, +0,5: çok az, +1:az, +2: orta, +3:şiddetli) esas alınarak histoskor oluşturuldu ( Histoskor= yaygınlık x şiddet).

**Tablo 5.**Histoskor (yaygınlık x şiddet)

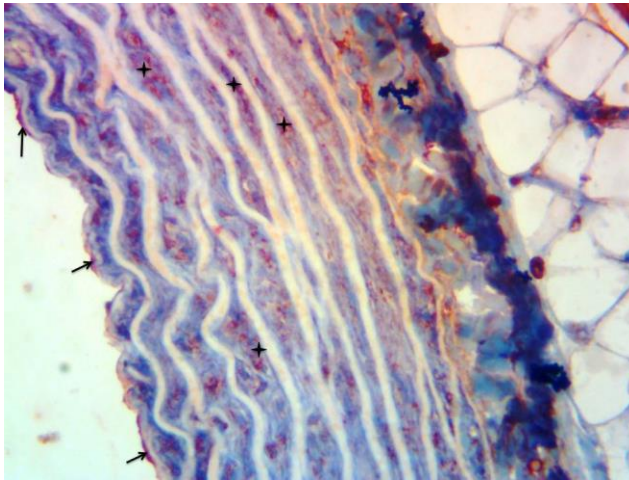
<b>DAMAR</b>		
<b>Grup</b>	<b>Endotel</b>	<b>Media</b>
<b>Nesfatin +</b>	<b>1.74±0.74</b>	<b>1.02±0.21</b>
<b>Nesfatin -</b>	<b>0.58±0.72<sup>a</sup></b>	<b>0.42±0.44<sup>a</sup></b>

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

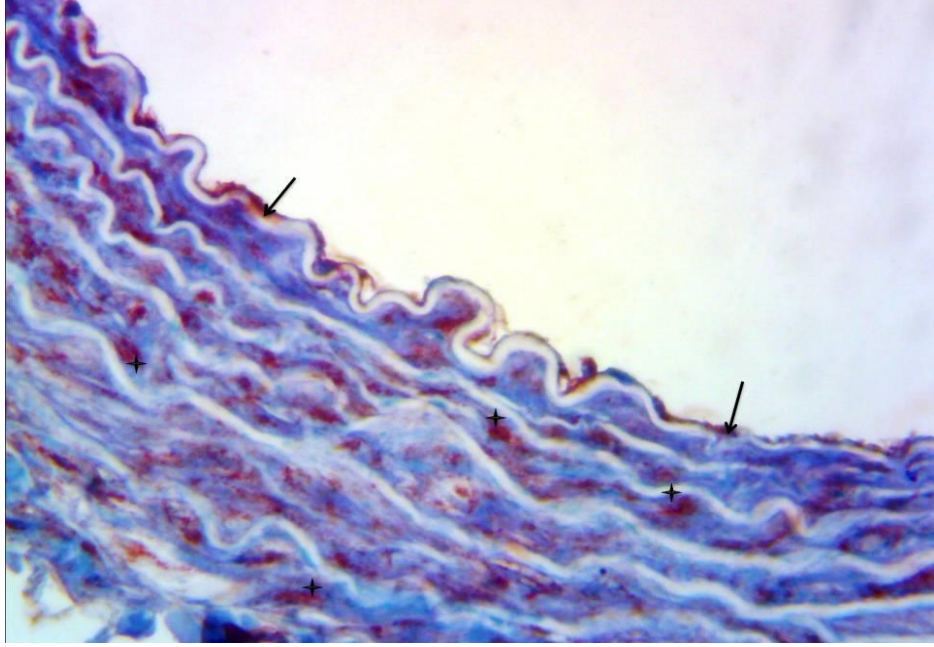
<sup>a</sup>NESFATİN – grubuna göre karşılaştırıldığında, (p<0.05).

Sıçanlardan alınan torasik aortaya ait doku kesitlerine, primer imgG nesfatin antikoru uygulanarak yapılan immünboyama sonucu; her iki deney grubunda hem yaygınlık ve hem de şiddeti farklılık gösteren boyanma tesbit edildi.

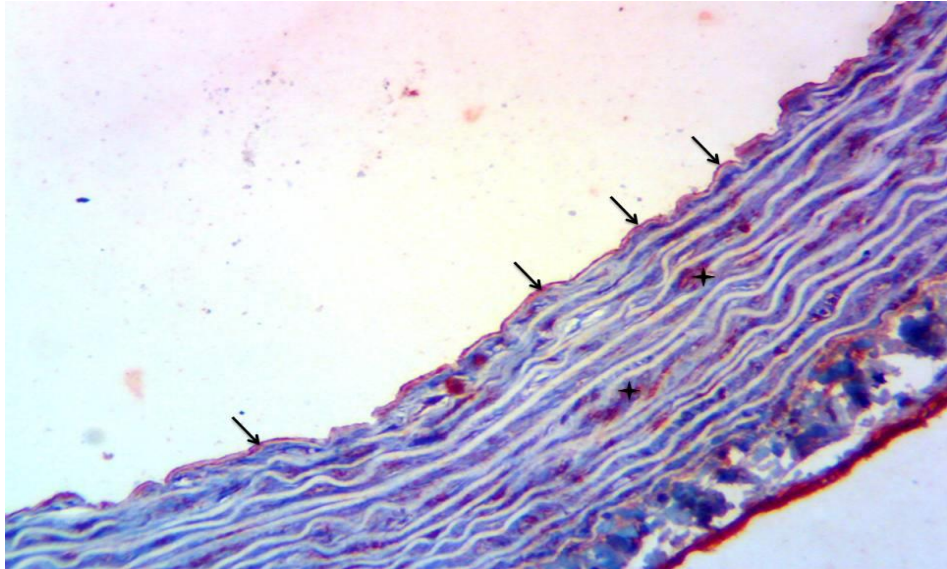
Dışardan nesfatin uygulanmayan sıçanların aort dokularına ait kesitler incelendiği zaman; damarların intima, mediya ve adventisya tabakalarında boyanma görüldü. Boyanma, musküler tabaka da diye adlandırılan mediya tabakasında (yıldız) ve intima'nın endotel kısmında (siyah ok) daha fazla izlendi (şekil 6-7-8).



**Şekil 7.**(Grup I) Asılmayan grup sıçan damar dokusu endotel (ok) ve media tabakasına (yıldız) ait nesfatin immunreaktivitesi ayırtedilmekte. X400

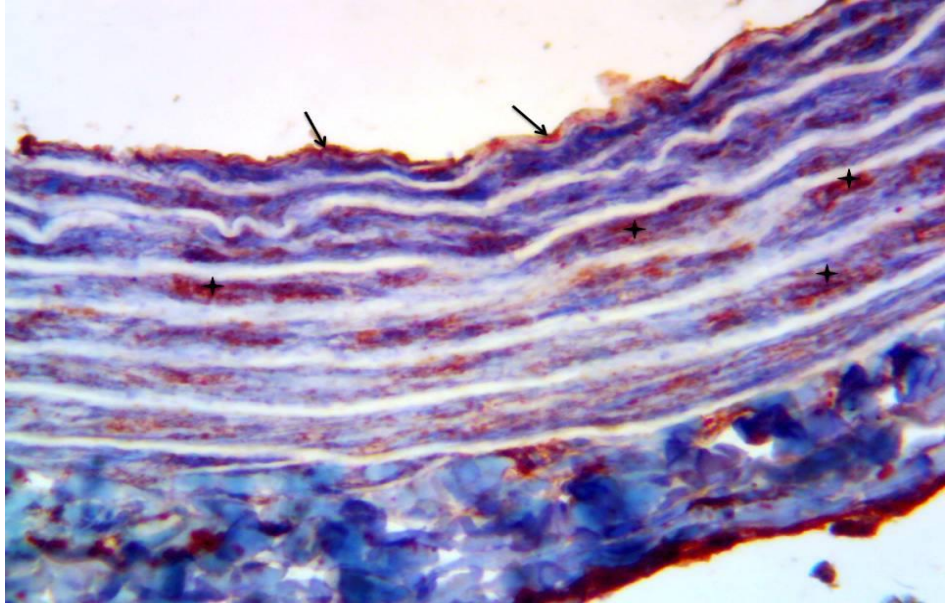


**Şekil 8.**(Grup I) Asılmayan grup sıçan damar dokusu endotel (ok) ve media tabakasına (yıldız) ait nesfatin immunreaktivitesi izlenmekte. X400

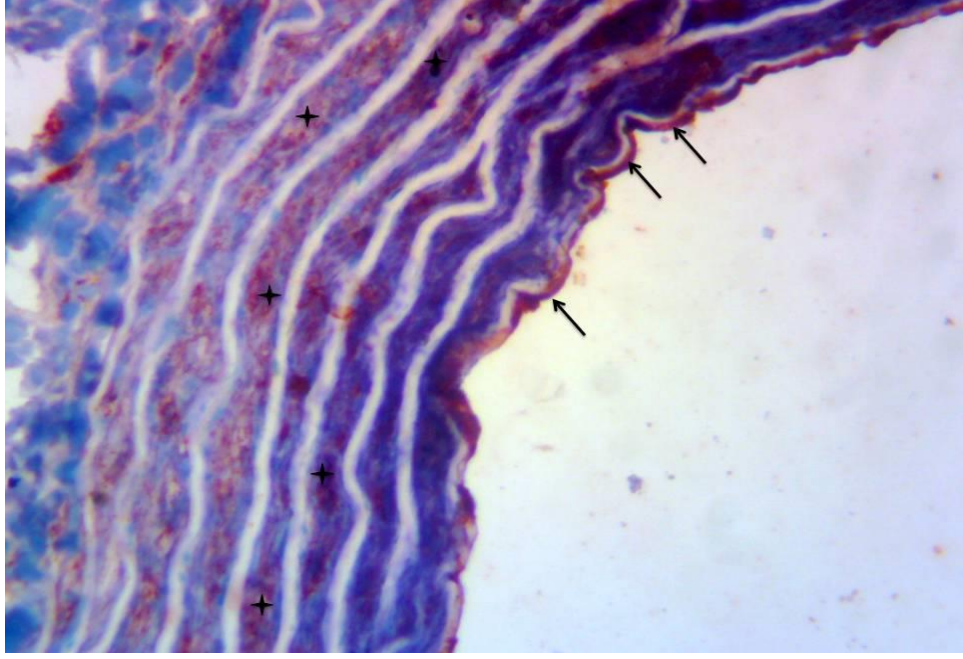


**Şekil 9.** (Grup I) Asılmayan grup sıçan damar dokusu endotel (ok) ve media tabakasına (yıldız) ait nesfatin immunreaktivitesi gözlenmekte. X200

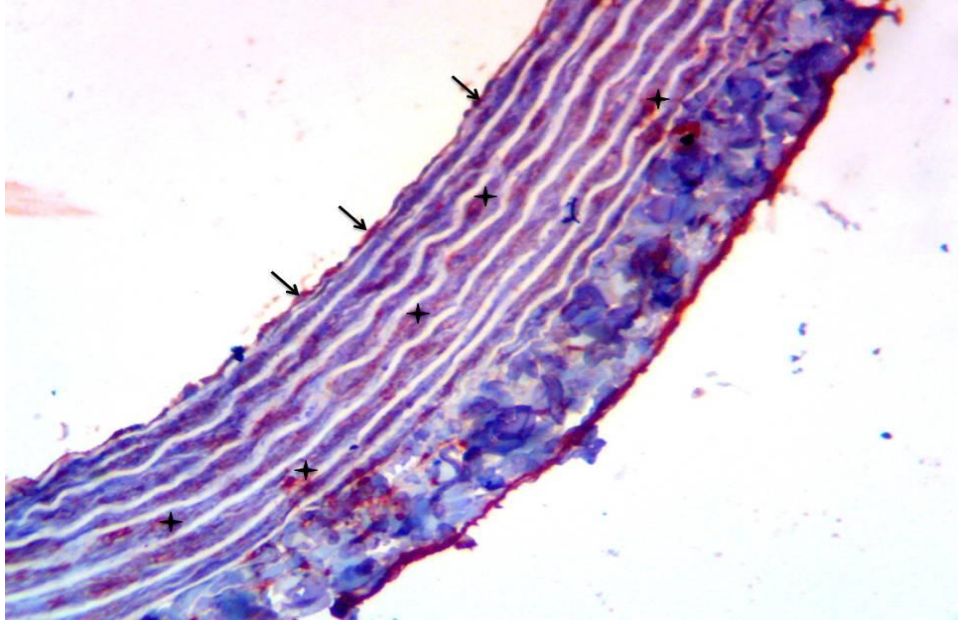
Nesfatin uygulanan gruba ait aort doku örneklerinde ise özellikle endotel (siyah ok) ve müsküler ksmde (yldz) daha fazla olmak üzere tüm tabakalarda immunboyanma tesbit edildi (ekil 9-10-11). Ancak, diğer grup ile kıyaslandığında nesfatin uygulanan gruba ait damar kesitlerin, nesfatin immunreaktivitesinde anlamlı derecede artış olduğu tesbit edildi.



**Şekil 10.**(Grup I) Asılmayan grup sıçan damar dokusu endotel (ok) ve media tabakasına (yldz) ait nesfatin immunreaktivitesi gözlenmekte. X400

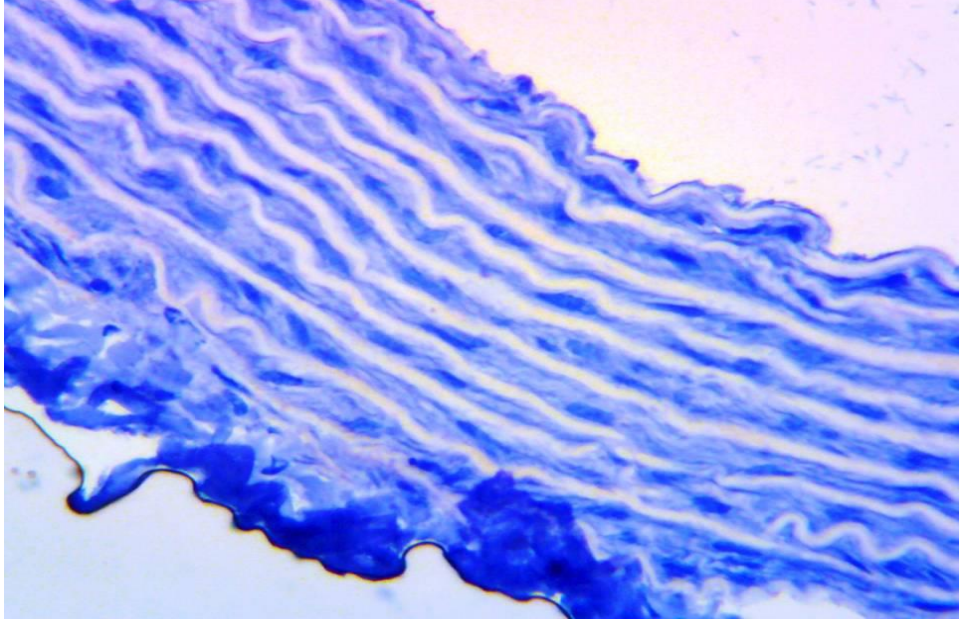


**Şekil 11.** (Grup I) Asılan grup sıçan damar dokusu endotel (ok) ve media tabakasına (yıldız) ait nesfatin immunreaktivitesi izlenmekte. X400



**Şekil 12.** (Grup II) Asılan grup sıçan damar dokusu endotel (ok) ve media tabakasına (yıldız) ait nesfatin immunreaktivitesi gözlenmekte. X400

Negatif kontrol için yapılan immunboyamada ise primer antikor basamağı atlanmış olup, damardokukesitlerinde boyanma görülmedi (şekil 12).



**Şekil 13.** (Grup II) Asılan grup sıçan damar dokusu endotel (ok) ve media tabakasına (yıldız) ait nesfatin immunreaktivitesi ayırtedilmekte. X400

## 6.TARTIŞMA

Kas kasılması ve gevşemesi birbirini tetikleyen birçok karmaşık fizyolojik mekanizmanın rol aldığı ve hala bütün mekanizmaların birbirleriyle olan ilişkilerinin tam olarak aydınlatılmadığı fizyolojik olaylardır. Biz yapmış olduğumuz bu çalışmayla kasların kasılma ve gevşeme mekanizmaları üzerine yeni bir adipositokin olan nefstatin-1' in sıçan aortundaki kasılma ve gevşeme mekanizması üzerine olan etkilerini literatüre kazandırmayı amaçladık. Bizden önce yapılan çalışmalarda nefstatin-1 in anoreksijenik davranış gösterdiği tespit edilmiştir (93). Takip eden çalışmalarda ise nefstatin-1 in anoreksijenik davranışının yanısıra, nefstatin-1 in intraserebroventriküler olarak enjekte edilen bilinci açık sıçanlarda ortalama KB artışı indükte eden etkenler arasında gösterilebileceği tezi savunulmuştur (93). Ayrıca nefstatin-1 in hipertansif etkisinin melanokortin sisteminin aşağı akımı kabul edilen hipotalamus oksitosin reseptörü üzerine etkiyle aracılık ettiğini gösteren çalışmalar da vardır (94). Birbirinden bağımsız bu çalışmalar göstermiştir ki nefstatin-1 in hipertansif etkisi sadece periferel kan damarları üzerindeki davranışları aracılığı ile değil aynı zamanda santral sinir sistemi üzerindeki etkileri aracılığıyla da ortaya çıkmaktadır (95).

Biz ise yapmış olduğumuz bu çalışmada Yamawaki'nin tezini destekler şekilde nefstatin-1' in spesifik olarak NO donörünü ve cGMP üretimini bozarak damarda kasılma ve gevşemeyi bloke ettiğini literatür ile uyumlu olarak bulduk (95). Ayrıca yapmış olduğumuz çalışmada sıçan izole aortunda SNP ile indüklenen gevşemeyi spesifik olarak inhibe ettiğini bulduk. Bulduğumuz bu

sonuç ilk olarak mezenterik arter üzerinde literatüre kaydedilmiş ve mezenterik arterde de tıpkı aort gibi gevşemeyi inhibe etmiştir (95). Fakat bu iki çalışma bir arada incelendiğinde tek başına uygulandığında düz kasta gevşeme oluşturduğu literatürce ispatlanmış SNP, ACH, 8-Br-cGMP'nin nefstatin-1 ile birlikte verildiğinde farklı istatistiksel veriler ortaya koymuştur. Daha önce yapılan çalışmalarda SNP ile nefstatin-1 bir arada uygulandığında gevşemeyi inhibe ettiği 8-Br-cGMP ile verildiğinde ise anlamlı bir etkinin oluşmadığı rapor edilmiştir (95). Biz ise bu çalışmada ilk olarak Ach ile birlikte nefstatin-1 vererek düz kas üzerine endotel bağımlı etkilerini literatüre kazandırmayı amaçladık ve tıpkı endotel bağımsız SNP gibi gevşemeyi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde inhibe ettiğini bulduk. Ayrıca yapmış olduğumuz bu çalışmada nefstatin-1'in periferik doğru gittikçe etkisinin azaldığı göz önünde bulundurularak kalbe en yakın damar olan aort üzerinde incelemelerimizi yaptık. KB hem kan damarlarının hem de kalbin kontraktıl reaktiviteleri ile düzenlenmekte. Nefstatin-1'in hipertansif etkisi ise hem santral hem de periferik kan damarları üzerindeki davranışları aracılığı ile olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (95). Bu bilgiler ışığında nefstatin-1 in kalp fonksiyonu üzerindeki etkilerini belirlemek için kalbe uzaklığı farklı olan damarlarda ve kalp üzerinde direk ve indirek etkilerinin belirlenmesi için daha çok çalışma yapmak gerekmektedir. Yamawaki yapmış olduğu çalışmada nefstatin-1'in spesifik olarak NO donörünü ve cGMP üretimini bozarak damarda kasılma ve gevşemeyi bloke ettiğinin yanı sıra PDE inhibitörü IBMX varlığında nefstatin-1 in SNP ile indüklenen cGMP üretimini inhibe ettiğini açıklığa kavuşturmuştur (95). Bu bilgilere dayanarak nefstatin-1 in inhibitör

etkileri primer olarak PDE lerin aktivasyonundan ziyade sGC aktivasyonunun inhibe edilmesine bağlı olduğu hipotezini savunmuştur (95).

“cGMP düz kas gevşemelerine sitosolik  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunda düşmeler, ve/veya cGMP bağımlı protein kinaz aktivasyonu aracılığıyla kontraktıl protein üzerinde  $Ca^{+2}$  sensitivitesi gibi çoklu mekanizmalarla etkilidir (96,97).” Bu bilgi ışığında  $Ca^{+2}$  un kasılma ve gevşemede nesfatin-1 ile olan ilişkisinin açığa kavuşturulması için  $Ca^{+2}$  un farklı yoğunlukta bulunduğu ortamlarda nesfatin-1’ in etkilerinin incelenmesi ile ilgili çalışmalar literatüre kazandırılabilir.

Yapmış olduğumuz literatür taramasında nesfatin-1’e özgü bir reseptörün tanımlandığı bir çalışma bulamadık. Fakat nesfatin-1’e spesifik olamayan melanokortin-3 reseptörü üzerinde etkisinin gösterdiği çalışmalar mevcuttur (93). Melanokortin-3 reseptörünün, plasenta, bağırsak, kalp, testis, yumurtalık, meme bezi, iskelet kası, böbrek ve peritoneal makrofajlar dahil olmak üzere, periferik dokular içinde dağıtılmış olduğu bilinmektedir (43, 93). İlâveten, son zamanlarda, melanokortin-3 reseptörü mRNA nın bir kemirgen vasküler yatağından salgılandığı da doğrulandı (98). Böylece, nesfatin-1 in periferik arteriyel kontraktilite üzerine etkilerinin melanokortin-3 reseptörü aracılığıyla iletilmesi mümkün olduğu tezi savunulabilir. Ancak ilerleyen çalışmalarda nesfatin-1 e özgü reseptörün ve/veya reseptörlerin belirlenmesi ile nesfatin-1 in düz kas üzerindeki kasılma ve gevşeme mekanizması üzerindeki etkisi daha da açıklığa kavuşacaktır.

Bu çalışmada izole organ banyosunun yanı sıra ilk olarak üzerinde çalıştığımız dokularda histolojik boyama yapılmış olup dokuların histolojik incelemesi de yapılmıştır. Bu histolojik inceleme bize göstermiştir ki nesfatin-1 in

aort da kasılma ve gevşeme mekanizmasının gerçekleştiği tabakalarda kontrol gurubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde birikmiş olduğu rapor edildi. Bu ise nesfatin-1 in damar kasılma ve genişemesinde periferal olarak ta etki ettiğini göstermektedir.

Sonuçolarak; Bu çalışma da ilk aort üzerinde nesfatin-1 in histolojik olarak incelemesi yapılmıştır. Nesfatin-1 sıçan izole aortunu etkilemekte SNP ve ACh kaynaklı düz kas relaksasyonunu inhibe ettiği ortaya konulmuştur. Ayrıca FNF kaynaklı düz kas kontraksiyonunuda inhebe ettiği tespit edilmiştir. Verilerimiz nesfatin-1'in merkezi kontrole ek olarak, periferal kasılma mekanizmaları üzerinde de etki gösterdiği ve bu şekilde periferik kan basıncını düzenlediğini düşündürmektedir.

## 7. KAYNAKÇA

1. Oh-I S, Shimizu H, Satoh T, Okada S, Adachi S, Inoue K, et al. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature* 2006; 443: 709-7012.
2. Goebel M, Stengel A, Wang L, et al. (2009). Nesfatin-1 immunoreactivity in rat brain and spinal cord autonomic nuclei. *Neurosci Lett*, 452(3): 241–46.
3. Shimizu H, Oh-I S, Hashimoto K, et al. (2009). Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: The leptin-independent mechanism. *Endocrinology*, 150(2): 662-71.
4. Stengel A, Goebel-Stengel M, Wang L, et al. (2012). Nesfatin-1 (30-59) but not the N- and C-terminal fragments, nesfatin-1 (1-29) and nesfatin-1 (60-82) injected intracerebroventricularly decreases dark phase food intake by increasing inter-meal intervals in mice. *Peptides*, 35(2): 143-48.
5. Gonzalez R, Kerbel B, Chun A, Unniappan S. (2010). Molecular, cellular and physiological evidences for the anorexigenic actions of nesfatin-1 in goldfish. *Plos One*, 5(12):e15201.
6. Su Y, Zhang J, Tang Y, Bi F, Liu JN. The novel function of nesfatin-1: antihyperglycemia. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391: 1039-1042.
7. Price, T.O., Samson, W.K., Niehoff, M.L., Banks, W.A., Permeability of the blood–brain barrier to a novel satiety molecule nesfatin-1, *Peptides*, 28, 2372–2381, 2007.
8. Yavru N , Yavru S, Deneş Hayvanları, Birinci Basım, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayın Ünitesi, Konya 1996.
9. <http://www.biologycorner.com> .Rat - Circulatory System :08.05.2014  
[http://www.biologycorner.com/worksheets/rat\\_circulatory.html#.UxcgOGZWHcs](http://www.biologycorner.com/worksheets/rat_circulatory.html#.UxcgOGZWHcs)
10. National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Children and Adolescents. The fourth report on the diagnosis, evaluation, and treatment of high blood pressure in children and adolescents. *Pediatrics* ; 114, 555-576, 2004
11. Beth A: Hypertension in Children and Adolescent: Definition, Pathophysiology, Risk factors and Long-Term Sequelae. *Current Therapeutic Research Clinical Experience*; 62:283- 297, 2001.
12. Joint National Committee on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure. The sixth report of The Joint National Committee on Prevention, Detection and Treatment Of High Blood Pressure. *Arch Intern Med* 1997; 157: 2413-2446.

13. Guidelines Subcommittee of The World Health Organization. World Health Organization-International Society of Hypertension guidelines for the management of hypertension. *J Hypertens* 1999; 17: 151-183.
14. Hoffman JIE : Systemic Arterial Hypertension , Rudolph MA, Rudolph's Pediatrics, Appleton and Lange, Connecticut ; 1543-1551, 1996.
15. Prut AW : Systemic Hypertension, Nelson WE, Nelson Textbook of Pediatrics, Saunders Company, Philadelphia ; 1368-1374 , 2001.
16. Ramzi S. Cotran, Stanley L. Robbins, Vinay Kumar. Temel Patoloji Basic Pathology. Nobel Tıp Kitabevleri. 7. Baskı 2002; s:294-298
17. Ercan Göçgeldi, Mustafa Alparslan Babayiğit, Hür Hassoy , Cengiz Han Açikel , İlker Taşçı , Süleyman Ceylan . Hipertansiyon tanısı almış hastaların algıladıkları yaşam kalitesi düzeyinin ve etki eden faktörlerin değerlendirilmesi. *Gülhane Tıp Dergisi* 2008; 50: 172-179.
18. Harrap SB. Genetics. In: Oparil S, Weber MA, eds. Hypertension: Companion to Brenner and Rector's The Kidney. Philadelphia, PA: WB Saunders;1999; ch.4.
19. Heart Disease A Textbook of Cardiovascular Medicine 6th Edition Eugene Braunwald.
20. Weber MA. Angiotensin 2 receptor antagonist in the treatment of hypertension. *Cardiol Rev* 1997; 5: 72-80
21. Ahmetn KORKMAZ, Turgut TOPAL Fiziyojji AD, GATA, ANKARATürkiye Klinikleri *J Int Med Sci* 2007;3(18):1-16
22. Fowler JA, Whittam JT, Taylor Berne AE, Matthew L. Levy Reviewed Physiology. 2008: 122-128.
23. Ganong WF. Tıbbi Fiziyojji. 20. Baskı, Nobel Tıp Kitap Evleri, 2002; 97 (2), 78,79 81,95.
24. Guyton AC, Hall JE. Tıbbi Fiziyojji. Onbirinci Basım, Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara 2007.
25. Kuriyama H, Kitamura K, Itoh T, Inouge R. Physiological Features of Visceral Smooth Muscle Cells, With Special Reference to Receptors and Ion Channels. The American Physiological Society 1998; 811-918.
26. Walsh, Retik, Vaughan, Wein. Physiology and pharmacology of the renal pelvis and ureter. *Campbell's Urology* 8. Baskı, Saunders, 2002: 377-405.
27. Jackson MR, Carney EW, Lye SJ, Ritchie JW. Localization of two angiogenic growth factors (PDECGF and VEGF) in human placentae throughout gestation. *Placenta* 1994; 15: 341-353
28. Çetin, A., Rat Aortik Vasküler Düz Kas Hücre Kültüründe Yüksek Glukozlu Ortamda Anjiyotensin II Uyarımı İle Oluşan Hücre Proliferasyonu Üzerine Resveratrolün Etkileri. Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya A.D. Doktora Tezi, Antalya, 2011.

29. <http://news.softpedia.com/newsImage/Vascular-Diseases-and-Radiotherapy-Linked-Directly-2.jpg/>, Erişim Tarihi: 23.04.2013.
30. Oğuz, N., Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Ürik Asit İndüklü p44/42 MAPK, p38 MAPK ve PDGFRB Fosforilasyonu ve Bu Fosforilasyonlarla COX-2 ve NADPH Oksidaz Aktivitesinin İlişkisi. Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, 2011.
31. Owens, G.K., Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev*, 1995. 75(3): p. 487-517.
32. Muto, A., et al., Smooth muscle cell signal transduction: implications of vascular biology for vascular surgeons. *J Vasc Surg*, 2007. 45 Suppl A: p. A15-24.
33. Owens, G.K., M.S. Kumar, and B.R. Wamhoff, Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev*, 2004. 84(3): p. 767-801.
34. Ross, R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 362:801-809, 1993.
35. Stary, H.C.: The sequence of cell and matrix changes in atherosclerotic lesions of coronary arteries in the first forty years of life. *Eur. Heart J.*, 11 3-19, 1190
36. Thyberg J., Hedin U., Sjölund M., Palmberg L., Bottger B. A.: Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells. *Arteriosclerosis*, 10:966-990, 1990
37. 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* 443:709–712.
38. Barnikol-Watanabe, S. et al (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: 497–512.
39. Miura K, Titani K, Kurisawa 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: 375–380.
40. Stengel A, Goebel M, Yakubov I, et al. (2009). Identification and characterization of nesfatin-1 immunoreactivity in endocrine cell types of the rat gastric oxyntic mucosa. *Endocrinology*, 150: 232–38.
41. Zhang AQ, Li XL, Jiang CY, Lin L, Shi RH, Chen JD, Oomura Y. (2010). Expression of nesfatin-1/NUCB2 in rodent digestive system. *World J Gastroenterol*, 16(14):1735-41.

42. Kerbel B, Unniappan S. (2012). Nesfatin-1 suppresses energy intake, co-localises ghrelin in the brain and gut, and alters ghrelin, cholecystokinin and orexin mRNA expression in goldfish. *J Neuroendocrinol*, 24(2): 366-77.
43. Oh-I S, Shimizu H, Satoh T, Okada S, et al. (2006). Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature*, 443(7112): 709–712.
44. Stengel A, Taché Y. (2011). Minireview: Nesfatin-1 an emerging new player in the brain-gut, endocrine, and metabolic axis. *Endocrinology*, 152(11): 4033-38.
45. Shimizu H, Oh-I S, Okada S, Mori M. (2009a). Nesfatin-1: an overview and future clinical application. *Endocr J*. 56 (4): 537-43.
46. Shimizu H, Oh-I S, Hashimoto K, et al. (2009). Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: The leptin-independent mechanism. *Endocrinology*, 150(2): 662-71.
47. Gonzalez R, Kerbel B, Chun A, Unniappan S. (2010). Molecular, cellular and physiological evidences for the anorexigenic actions of nesfatin-1 in goldfish. *Plos One*, 5(12):e15201.
48. García-Galiano D, Navarro VM, Gaytan F, Tena-Sempere M. (2010). Expanding roles of NUCB2/nesfatin-1 in neuroendocrine regulation. *Journal of Molecular Endocrinology*, 45(5): 281–90.
49. Su Y, Zhang J, Tang Y, et al. (2010). The novel function of nesfatin-1: Anti-hyperglycemia. *Biochem Biophys Res Commun*, 391(1):1039–1042.
50. Schwartz, M., Woods, S.C., Porte, D. and Seeley, R.J., 2000. Central nervous system control of food intake, *Nature*, 404, 661–671.
51. Yosten GL, 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):R330-6.
52. Michelini LC, Marcelo MC, Amico J, Morris M. (2003). Oxytocinergic regulation of cardiovascular function: Studies in oxytocin-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 284(6):H2269-76.
53. Sabatier N, Caquineau C, Douglas AJ, Leng G. (2003). Oxytocin released from magnocellular dendrites: A potential modulator of alpha-melanocyte-stimulating hormone behavioral actions?. *Ann NY Acad Sci*, 994: 218–24.
54. Foo K, Brismar H, Broberger C. (2008). Distribution and neuropeptide coexistence of nucleobindin-2 mRNA/nesfatin-like immunoreactivity in the rat CNS. *Neuroscience*, 156(3): 563–79.
55. Pałasz A, Krzystanek M, Worthington J, Czajkowska B, Kostro K, Wiaderkiewicz R, Bajor G. (2012). Nesfatin-1, a unique regulatory neuropeptide of the brain. *Neuropeptides*, 46(3):105-12.

56. Maejima Y, Sedbazar U, Suyama S, et al. (2009). Nesfatin-1- regulated oxytocinergic signaling in the paraventricular nucleus causes anorexia through a leptin-independent melanocortin pathway. *Cell Metab*, 10(5):355-65.
57. Yosten GL, 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):R1642-7.
58. Angelone T, Filice E, Pasqua T, Amodio N, Galluccio M, Montesanti G, Quintieri AM, Cerra MC. (2013). Nesfatin-1 as a novel cardiac peptide: Identification, functional characterization, and protection against ischemia/reperfusion injury. *Cell Mol Life Sci*, 70(3):495-509.
59. Phillips, M.S., Kolaczynski, J., Nyce, M., Ohannesian, J., Opentanova, I., Goldman, W., Lynn, R., Zhang, P., Sinha, M. and Considine, R., 1996. Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat, *Nature Genet.*, 13, 18–19.
60. Fan, W., Bruce, A., Robert, A., Victor, J. and D. Cone., 1997. Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome, *Nature*, 385, 165–168.
61. Mountjoy, K.G., Mortrud, M.T., Low, M.J., Simerly, R.B., and D. Cone., 1994. Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain, *Mol. Endocrinol.*, 8, 1298–1308.
62. Liu, H., Kishi, T., Roseberry, A.G., Cai, X., Lee, C.E., Montez, J.M., Friedman, J.M., and Elmquist, J.K., 2003. Transgenic mice expressing green fluorescent protein under the control of the melanocortin-4 receptor promoter, *J. Neurosci.*, 23, 7143–7154.
63. Beckers S, Zegers D, Van Gaal LF, Van Hul W. (2009). The role of the leptin-melanocortin signalling pathway in the control of food intake. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 19(4):267-287.
64. Cui H, Sohn JW, Gautron L, et al. (2012). Neuroanatomy of melanocortin-4 receptor pathway in the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol*, 520(18): 4168-83.
65. Shimizu H, Ohsaki A, Oh-I S, Okada S, Mori M. (2009). A new anorexigenic protein, nesfatin-1. *Peptides*, 30(5):995-8.
66. Pan W, Hsueh H, Kastin AJ. (2007). Nesfatin-1 crosses the blood–brain barrier without saturation. *Peptides*, 28 (11): 2223–8.
67. Shimizu H, Oh-i S, Okada S, Mori M. (2009). Nesfatin-1: An Overview and Future Clinical Application. *Endocrine Journal*, 56 (4): 537–43.
68. Yang M, Zhang Z, Wang C, Li K, Li S, Boden G, Li L, Yang G. (2012). Nesfatin-1 Action in the Brain Increases Insulin Sensitivity Through Akt/AMPK/TORC2 Pathway in Diet-Induced Insulin Resistance. *Diabetes*, 61 (8): 1959–68.

69. Zhang Z, Li L, Yang M, Liu H, Boden G, Yang G. (2011). Increased plasma levels of nesfatin-1 in patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 120 (2):91-5.
70. Mimeo A, Smith PM, Ferguson AV. (2012). Nesfatin-1 influences the excitability of neurons in the nucleus of the solitary tract and regulates cardiovascular function. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 302(11):R1297-304.
71. Hofmann T, Stengel A, Ahnis A, Buße P, Elbelt U, Klapp BF. (2013). NUCB2/nesfatin-1 is associated with elevated scores of anxiety in female obese patients. *Psychoneuroendocrinology*, S0306-4530(13)00190-X.
72. Merali Z, Cayer C, Kent P, Anisman H. (2008). Nesfatin-1 increases anxiety- and fear-related behaviors in the rat. *Psychopharmacology*, 201(1): 115–23.
73. Atsuchi K, Asakawa A, Ushikai M, Ataka K, Tsai M, Koyama K, Sato Y, Kato I, Fujimiya M, Inui A. (2010). Centrally administered nesfatin-1 inhibits feeding behaviour and gastroduodenal motility in mice. *Neuroreport*, 21(15):1008-11.
74. 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(11):4911-9.
75. Aydın S. The presence of the peptides apelin, ghrelin and nesfatin-1 in the human breast milk, and the lowering of their levels in patients with gestational diabetes mellitus. *Peptides* 2010; 31: 2236-2240
76. Oh-I S, Shimizu H, Satoh T, Uehara Y, Okada S, Mori M. (2005). Molecular mechanisms associated with leptin resistance: n-3 polyunsaturated fatty acids induce alterations in the tight junction of the brain. *Cell Metab*. 1: 331–341.
77. Shimizu H, Oh IS, Hashimoto K, Nakata M, Yamamoto S, Yoshida N, Eguchi H, Kato I, Inoue K, Satoh T, et al. (2009b). Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: the leptin-independent mechanism. *Endocrinology* 150: 662-671.
78. Özsavcı D, Erşahin M, Şener A, Özakpınar ÖB, Toklu HZ, Akakın D, Şener G, Yeğen BÇ. (2011). The novel function of nesfatin-1 as an anti-inflammatory and antiapoptotic peptide in subarachnoid hemorrhage-induced oxidative brain damage in rats. *Neurosurgery*, 68(6):1699-708.
79. Price TO, Samson WK, Niehoff ML, Banks WA. (2007). Permeability of the blood-brain barrier to a novel satiety molecule nesfatin-1. *Peptides*, 28(12):2372-81.
80. Tang CH, Fu XJ, Xu XL, Wei XJ, Pan HS. (2012). The anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of nesfatin-1 in the traumatic rat brain. *Peptides*, 36(1):39-45.
81. Kojima M, Hosoda H, Date Y, et al. (1999). Ghrelin is a growth-hormone releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 402 Suppl 6762:656-660.

82. Petersson, U., Somogyi, E., Reinholt, F.P., Karlsson, T., Sugarsa, R.V. and Wendel, M., 2004. Nucleobindin is produced by bone cells and secreted into the osteoid, with a potential role as a modulator of matrix maturation, *Bone*, 34, 949–960.
83. Jia, D. and Otsuki, M., 2000. Troglitazone prevents and reverses dyslipidemia, insulin secretory defects, and histologic abnormalities in a rat model of naturally occurring obese diabetes, *Metabolism*, 49, 1167–1175.
84. Kanai, Y., Miura, K. and Uehara, T., 1993. Natural occurrence of Nuc in the sera of autoimmune-prone MRL/lpr mice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 196, 729–736.
85. (Friedman, J.M. and Halaas, J.L., 1998. Leptin and the regulation of body weight in Mammals, *Nature*, 395, 763–770.)
86. Krause, W.J., 2000. Brunner's glands: a structural, histochemical and pathological profile, *Prog. Histochem. Cytochem.*, 35, 259–367.
87. Okay, G.E., 2006. HIV/AIDS hastalarında ELISA yöntemi ile *Cryptosporidium* türlerinin sıklığının araştırılması, Uzmanlık Tezi, Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul.
88. Iwasaki Y, Nakabayashi H, Kakei M, Shimizu H, Mori M, Yada T. (2009). Nesfatin-1 evokes Ca<sup>2+</sup> signaling in isolated vagal afferent neurons via Ca<sup>2+</sup> influx through N-type channels. *Biochem Biophys Res Commun.* 390 (3): 958-62.
89. Shimizu, H. and Mori, M., 2005. The brain adipose axis: a review of involvement of molecules, *Nutr. Neurosci.*, 8, 7–20.
90. Miura, K., Titani, K., Kurisawa, Y. and 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, 375–380.
91. Barnikol-Watanabe, S., Gross, N.A., Götz, H., Henkel, T., Karabinos, A., Kratzin, H., Barnikol, H.U. and 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, 497–512.
92. Lavoie, C., Meerloo, T., Lin, P. and Farquhar, M.G., 2002. Calcineurin, an EF-hand Ca<sup>2+</sup> binding protein, is stored and processed in the Golgi and secreted by the constitutive-like pathway in AtT20 cells, *Mol. Endocrinol.*, 16, 2462–2474.
93. G.L. Yosten, W.K. Samson, Nesfatin-1 exerts cardiovascular actions in brain: possible interaction with the central melanocortin system, *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 297(2009) R330–R336.
94. G.L. Yosten, W.K. Samson, The anorexigenic and hypertensive effects of nesfatin-1 are reversed by pretreatment with an oxytocin receptor antagonist, *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative Comparative Physiology* 298(2010) R1642–R1647.

95. H.Yamawaki *Biochemical and Biophysical Research Communications* 418(2012)676–681
96. H.Karaki, K.Sato, H.Ozaki, K.Murakami, Effects of sodium nitroprusside on cytosolic calcium level in vascular smooth muscle, *European Journal of Pharmacology* 156(1988)259–266.
97. T.Munzel, R.Feil, A.Mulsch, S.M.Lohmann, F.Hofmann, U.Walter, Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase [corrected], *Circulation* 108(2003)2172–2183
98. G.Leoni, H.B.Patel, A.L.Sampaio, F.N.Gavins, J.F.Murray, P.Grieco, S.J.Getting, M.Perretti, Inflamed phenotype of the mesenteric microcirculation of melanocortin type 3 receptor-null mice after ischemia-reperfusion, *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22(2008)4228–4238.

## ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında Malatya’ da doğdum. 1987 yılında Malatya Sakarya İlkokulu, 1990 Malatya Sümer Ortaokulu, 1993 Malatya Sümer Lisesi ve 1999 yılında İstanbul Üniversitesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Y.O. bitirdim. 1999-2012 yılları arasında kamuda Fizyoterapist olarak çalıştım. 2012 yılından itibaren Bingöl Üniversitesi’den öğretim görevlisi olarak görev yapmaktayım. Evli ve iki çocuk babasıyım.