



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

NESFATİN-1 NÖRONLARI ÜZERİNDEKİ EKSİTATÖR VE
İNHİBİTÖR AKSONAL SONLANMALARIN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL
OLARAK BELİRLENMESİ

Dr. Aynura AGHAYEVA

UZMANLIK TEZİ

BURSA-2022



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

NESFATİN-1 NÖRONLARI ÜZERİNDEKİ EKSİTATÖR VE
İNHİBİTÖR AKSONAL SONLANMALARIN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL
OLARAK BELİRLENMESİ

Dr. Aynura AGHAYEVA

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Özhan EYİGÖR

BURSA-2022

İÇİNDEKİLER

Tablo Listesi	ii
Şekil Listesi	ii
Özet	iii
İngilizce Özet	v
Giriş	1
Beslenmenin Nöroendokrin Kontrolü	3
Nörotransmitterler	9
Veziküler Nörotransmitter Taşıyıcılar	10
Gereç ve Yöntem	18
Deney Prosedürü	18
İmmünohistokimyasal İşlemlerde Takip Edilen Genel Kurallar	19
Preparatların İncelenmesi ve İstatistiksel Analiz	21
Bulgular	23
Tartışma ve Sonuç	32
Kaynaklar	36
Teşekkür	43
Özgeçmiş	45

Tablo Listesi

Tablo-1: Çalışmada kullanılan antikorlar	21
Tablo-2: Çalışmada kullanılan antikorlar, dilüsyonları ve inkübasyon süreleri.	21
Tablo-3: Supraoptik çekirdekde lokalize olan ve VGLUT2-pozitif akson sonlanmaları ile temasta olan nesfatin-1 nöronları.	25
Tablo-4: Supraoptik çekirdekde lokalize olan ve VGLUT3-pozitif akson sonlanmaları ile temasta olan nesfatin-1 nöronları.	29
Tablo-5. Supraoptik çekirdekde lokalize olan ve VGAT-pozitif akson sonlanmaları ile temasta olan nesfatin-1 nöronları.	30

Şekil Listesi

Şekil-1: Mikroskopik değerlendirme prosedürü.	24
Şekil 2: Supraoptik çekirdekde lokalize olan Nesfatin-1 nöronları üzerinde VGLUT2-pozitif akson sonlanmaları.	26
Şekil-3: Supraoptik çekirdekde lokalize olan nesfatin-1 nöronları üzerinde VGLUT3-pozitif akson sonlanmaları.	27
Şekil-4: Supraoptik çekirdekde lokalize olan nesfatin-1 nöronları üzerinde VGAT-pozitif akson sonlanmaları.	28
Şekil-5: Supraoptik çekirdekde lokalize olan nesfatin-1 nöronları üzerinde VACHT-pozitif akson sonlanmaları.	29
Şekil-6: Erkek ve dişi deneklerde VGluT2 ve VGluT3 içeren sonlanmalarla temasta olan nesfatin-1 nöron yüzdelерinin karşılaştırılması.	31
Şekil-7: Erkek ve dişi deneklerde VGluT2 ve VGAT içeren sonlanmalarla temasta olan nesfatin-1 nöron yüzdelерinin karşılaştırılması.	31
Şekil-8: Erkek ve dişi deneklerde VGluT3 ve VGAT içeren sonlanmalarla temasta olan nesfatin-1 nöron yüzdelерinin karşılaştırılması.	31

ÖZET

Nesfatin-1 besin alımını baskılayan anoreksijenik peptit olup, hipotalamusda yerleşik nöronlar tarafından sentezlenir ve salgılanır. Çalışmamızda nesfatin-1 nöronları üzerinde eksitator ve inhibitör nörotransmitterlere ait etkiyi göstermek amaçlandı. Bu kapsamda glutamat, asetilkolin ve GABA'yı nörotransmitter olarak kullanan nöronların belirlenmesinde belirteç olarak uygulanan veziküler taşıyıcı proteinlerine ait birincil antikörlerin her biri ile nesfatin-1 primer antikoru kullanılarak ikili peroksidaz immünohistokimya boyama yapıldı. Yüzen kesitler üzerinde uygulanan ikili işaretlemelerde nesfatin-1 reaksiyonu diaminobenzidin ile kahverengi olarak belirlenirken, veziküler taşıyıcı proteinler nikel eklenen diaminobenzidin ile siyah renkte işaretlendi. Preparatlar hipotalamik supraoptik çekirdekte yerleşik nesfatin-1 nöronlarının hangi oranda ilgili veziküler taşıyıcı protein içeren sonlanmalarla temas halinde oldukları mikroskopik analizlerle belirlendi. Innervasyon alan nesfatin-1 nöron oranları nörotransmitterler arasında karşılaştırıldı. Ayrıca dişi ve erkek denekler arası cinsiyete bağlı olası farklılıklar incelendi. Dişi deneklerde supraoptik çekirdekteki nesfatin-1 nöronlarının %69'u VGLUT2 teması yaparken, erkek deneylerde bu oran %88 olarak bulundu. Nesfatin-1 nöronlarındaki VGLUT3 ekspresyonu dişi hayvanlarda %53, erkek grubunda ise %66 olarak hesaplandı. VGLUT2 ile teması olan nesfatin-1 nöronlarının sayısının erkekte dişilere göre anlamlı olarak yüksek olduğu görüldü. VGLUT3 içeren sonlanmalarla temasta cinsiyetler arası bir fark tespit edilmedi. Supraoptik çekirdekteki nesfatin-1 nöronlarının VGAT içeren aksonlarla teması dişi deneklerde %98, erkek deneklerde %97 oranında olup cinsiyetler arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Aynı bölgedeki nesfatin-1 nöronlarında VACHT içeren innervasyona hem dişi deneklerde hem de erkek deneklerde rastlanmadı. Veziküler nörotransmitter taşıyıcı proteinlerle olan temasta en yoğun olarak GABAerjik innervasyonun etkili olduğu anlaşıldı. Sonuç olarak nesfatin-1 nöronlarının hem eksitator hem de inhibitör etkili

nöronlarca innerve edilebileceği ve eksitatör uyarıda glutamaterjik sistemin, inhibitör uyarıda ise GABAerjik sistemin rol oynadığı anlaşıldı.

Anahtar kelimeler: Nesfatin-1, veziküler nörotransmitter taşıyıcı protein, supraoptik çekirdek, GABA, glutamat



SUMMARY

IMMUNOHISTOCHEMICAL DETERMINATION OF EXCITATORY AND INHIBITORY AXONAL ENDINGS ON NESFATIN-1 NEURONS

Nesfatin-1 is an anorexigenic peptide suppressing food intake and is synthesized and secreted by neurons located in the hypothalamus. In our study, it was aimed to demonstrate the effect of excitatory and inhibitory neurotransmitters on nesfatin-1 neurons. In this context, dual peroxidase immunohistochemistry staining was performed using nesfatin-1 primary antibody with each of the primary antibodies of vesicular transporter proteins applied as markers for neurons using glutamate, acetylcholine and GABA as neurotransmitters. In double labeling applied on floating sections nesfatin-1 reaction was determined in brown with diaminobenzidine, while vesicular carrier proteins were marked in black. Slides were analyzed to determine the ratio of nesfatin-1 neurons in the supraoptic nucleus contacting with relevant vesicular carrier protein. The ratios of nesfatin-1 neurons with the innervation was compared among neurotransmitters. In addition, possible gender differences between male and female were examined. While 69% of nesfatin-1 neurons in the supraoptic nucleus contact VGLUT2 in female, this rate was 88% in male. VGLUT3 contacts in nesfatin-1 neurons was 53% in female and 66% in male. The difference in the number of VGLUT2-contacting nesfatin-1 neurons was significantly higher in males when compared to female. The difference between male and female groups was insignificant in the number of nesfatin-1 neurons contacting VGLUT3-containing endings. The contacting ratio of nesfatin-1 neurons with VGAT-positive axons was 98% in female and 97% in male with no significance between genders. In the same region no contacts of VAcHT-containing axons were found on nesfatin-1 neurons in both female and male subjects. When the axonal contact of vesicular neurotransmitter transporter proteins was compared between the neurotransmitters, it was determined that the most prominent innervation is

GABAergic. In conclusion it is understood that the nesfatin-1 neurons can be innervated by both excitatory and inhibitory neurons and glutamatergic system is effective in the excitatory innervation while GABAergic system plays a role in the inhibitory mechanism.

Key words: Nesfatin-1, vesicular neurotransmitter transporter protein, supraoptic nucleus, GABA, glutamate



GİRİŞ

Enerji metabolizması yaşamın en önemli varoluşudur. Enerji dengesinin korunmasında temel prensip besin alımı ve kullanımıdır. Enerji homeostazının düzenlenmesi nöroendokrin sistemle hayata geçirilir. Besin alımı ve iştah kontrolünde rol aldığı bilinen leptin hormonunun tanımlanmasıyla bu alanda araştırmalar giderek artmış ve birçok yeni molekülün bulunmasına sebep olmuştur (1). Bu peptitlerden biri nesfatin-1 molekülüdür. Nesfatin-1'in leptin-bağımsız bir yolla enerji homeostazında ve özellikle özellikle besin alımı kontrolünde rol oynadığı gösterilmiştir (2).

Nesfatin-1, ilk defa 2006 yılında Oh-I ve arkadaşları tarafından sıçanlar üzerinde yapılan bir araştırmada keşfedilmiştir (2). Sıçanların baş beyin hipotalamik bölgesinde bulunmuş ve anoreksijenik peptid olarak nitelendirilmiştir. 82 aminoasitten oluşan nesfatin-1'in öncü molekülü nükleobindin 2 (NUCB2) proteinidir. NUCB2/nesfatin-1 korteks, paraventriküler çekirdek (PVN), zona postrema, vagus sinirinin dorsal motor çekirdeği ve beyincikte belirlenmiştir (2, 3).

Periferik infüzyon yoluyla verilen Nesfatin-1 molekülünün kanda trigliserit ve kolesterol seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (4).

Nesfatin-1 için spesifik bağlanma bölgeleri hem merkezi sinir sisteminde (MSS) (örn.hipotalamus, korteks) hem de periferik organlarda (örn. gastrointestinal sistem, hipofiz, pankreas) tespit edilebilmiştir (5).

Çalışmalar nesfatin-1'in hücre içi sinyal iletimini yalnızca MSS'de yerleşik nöronlarda değil aynı zamanda periferik dokularda da (örn. pankreas ve kalp kası hücrelerinde) yaptığını göstermiştir. Nesfatin-1 hücre içi kalsiyum iyonlarının girişini artırarak hücrede sinyal iletimini gerçekleştirmektedir ve bunun için de farklı Ca^{+2} kanallarını kullanabilmektedir (6).

Nesfatin-1'in anoreksijenik etkisinin leptin yolağından bağımsız olduğu Zucker sıçanları modelinde gösterilmiştir. Üçüncü ventrikül bölgesine uygulanan nesfatin-1 peptidi sonrası leptine dirençli hayvanlarda gıda alımında azalma gözlemlenmiştir (7). Aynı zamanda 10 gün boyunca uygun bir NUCB2

antisens oligonükleotidinin günlük enjeksiyonu sonrası gıda alımında artış olduğu gösterilmiş, böylelikle endojen NUCB2/nesfatin-1'in beslenme davranışlarının düzenlenmesinde rol oynadığı fikri ileri sürülmüştür (2,3).

Laboratuvarımızda yapılan çalışmalar nesfatin-1 nöronlarının eksitatör nörotransmitter olarak bilinen glutamaterjik agonistler ile aktive olduklarını göstermiştir (8). Laboratuvarımızda gerçekleştirilen bir başka çalışmada nesfatin-1 nöronlarının periferik stres sinyallerini glukokortikoid reseptörleri aracılığı ile eksprese ettikleri ve de strese karşı aktivasyon gösterdikleri belirlenmiş, bu aktivasyonda glutamaterjik antagonistlerin inhibe edici etkisinin var olduğu belirlenmiştir (9). Nesfatin-1 nöronlarının fizyolojik olarak aktivasyonunun da glutamaterjik antagonizma ile baskılandığı bir başka çalışmada anlaşılmıştır.

Glutamat hipotalamusta eksitatör etkileşimde önemli rol oynayan amino asit nörotransmitterlerinin başında gelir. Elde ettiğimiz bulgular, glutamat agonistlerinin enjeksiyonu sonrasında c-Fos'u eksprese eden nesfatin-1 nöron sayısının arttığını, bu artışın glutamat agonistinin enjeksiyonu öncesi gerçekleştirilen agoniste spesifik antagonist uygulamasıyla baskılandığını göstermektedir. Bu sonuçlar glutamaterjik sistemle nesfatin-1 nöronları arasında direkt etkileşimin varlığına işaret etmektedir. Bu etkileşim glutamat içeren akson sonlanmaları ile çalışma konusu nöronlar arasındaki sinaptik oluşumun varlığı ile gerçekleşebilir. Tez çalışmaları sonucunda bu tür sonlanmaların var olduğunun gösterilmesi amaçlanmıştır.

Glutamat dışında literatürde nesfatin-1 nöronlarının regülasyonunda yer alan nörotransmitter sistemlerle ilgili bilgi mevcut değildir. Çalışmamızda diğer bir eksitatör nörotransmitter olarak asetilkolinin de akson sonlanmaları düzeyinde nesfatin-1 nöronları ile ilişkileri araştırılmıştır. Hipotalamusta kolinerjik akson sonlanmalarının varlığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Ancak bu sonlanmaların nesfatin-1 nöronlarıyla ilişkisi bilinmemektedir.

Nesfatin-1 nöronları açlık durumunda inhibe olarak aktivasyonlarını yitiren nöronlardır. Periferden gelen açlık sinyallerinin bu nöronlara ulaşımında ve inhibisyonunda GABA nörotransmisyonunun etkisinin olabirliği hipotezini

esas alınarak çalışmamızda GABA'erjik sonlanmaların nesfatin-1 düzeyinde varlığının olup olmadığı araştırılmıştır.

Çalışmanın özgün amacı nesfatin-1 nöronları üzerinde eksitator ve inhibitör nörotransmitterlere ait etkinin belirlenmesidir. Bu amaç kapsamında hipotezimiz, nesfatin-1 nöronlarının anoreksijenik fonksiyonlarını farklı nörotransmitterleri içeren üst merkez nöronlarının kontrolü altında gerçekleştiriyor olması yönündedir. Bu hipotezi test etmeye yönelik olarak, glutamat, asetilkolin veya GABA'yı nörotransmitter olarak kullanan nöronlara ait akson sonlanmalarının nesfatin-1 nöronları üzerinde yaptıkları apozisyonların ikili immünohistokimyasal teknik ile gösterilmesi hedeflenmiştir. Çalışma kapsamında 3 hedef belirlenmiştir:

1. Veziküler glutamat taşıyıcı (VGluT) proteinleri içeren eksitator akson sonlanmalarının nesfatin-1 nöronları üzerinde varlığının gösterilerek bu tür nöronların hipotalamustaki yoğunluğunun belirlenmesi.

2. Veziküler asetil kolin taşıyıcı (VACHT) proteinleri içeren eksitator akson sonlanmalarının nesfatin-1 nöronları üzerinde varlığının gösterilerek bu tür nöronların hipotalamustaki yoğunluğunun belirlenmesi.

3. Veziküler GABA taşıyıcı (VGAT) proteinleri içeren inhibitör akson sonlanmalarının nesfatin-1 nöronları üzerinde varlığının gösterilerek bu tür nöronların hipotalamustaki yoğunluğunun belirlenmesi.

I. Beslenmenin Nöroendokrin Kontrolü

Enerji metabolizması yaşamın en önemli varoluşudur. Enerji dengesinin korunmasında temel prensip besin alımı ve kullanımıdır. Enerji homeostazının düzenlenmesi nöroendokrin sistemle hayata geçirilir (1).

Beyin gereken enerji ile ve beslenmeden alınan enerjiyi bir arada tutmak ve vücut ağırlığının kontrolünü sağlamak için mevcut bir ağ oluşturur ki, bu nöroendokrin sistemdir. İhtiyacı kadar enerjiyi almak için beslenme ve beslenme davranışlarını kontrol altına alarak sinyal ileti sistemini buna göre tasarlamaktadır. Yapılan son çalışmalarda, arka beynin enerji balansını

dengede tutan ve periferik metabolik sinyallerle hipotalamik yollar arasındaki dengeyi sağlamakta olduğu gösterilmiştir (10).

I.A. Hipotalamus

Talamusun altında yerleşik olup 3. ventrikülün tabanını oluşturan ön beyin bölgesidir. Hipofiz bezinin aracılığıyla endokrin sistemi beyinle birleştirmektedir. Preoptik, paraventriküler, supraoptik, anterior, dorsomedial, ventromedial, lateral, arkuat, mamiller ve posterior hipotalamik çekirdekler organizmanın hemostaz sistemi hipotalamus ile korunmaktadır. Hipotalamus parasagittal ve koronal olarak aşağıdaki bölümlere ayrılmaktadır:

Sagittal olarak;

- ☐ Supraoptik
- ☐ Mamiller
- ☐ Tuberal

Koronal olarak;

- ☐ Periventriküler
- ☐ Lateral
- ☐ Medial

Hipotalamus önemli fonksiyonlara sahip çekirdekler içermektedir (11,12). Bu çekirdekler aşağıda belirtilmiştir:

- ☐ Preoptik çekirdek
- ☐ Anterior çekirdek
- ☐ Dorsomedial çekirdek (DMN)
- ☐ Ventromedial çekirdek (VMN)
- ☐ Posterior çekirdek
- ☐ Lateral çekirdek (LN)
- ☐ Mamiller çekirdek
- ☐ Paraventriküler çekirdek (PVN)
- ☐ Arkuat çekirdek (ARC)
- ☐ Supraoptik çekirdek (SON)

Hipotalamik çekirdeklerden paraventriküler çekirdek, periventriküler çekirdek (PeV), ventromedial çekirdek (VMN), dorsomedial çekirdek (DMN), arkuat çekirdek, lateral hipotalamik alan (LHA)/perifornikal alan (PFA) ve

ayrıca ile beyin sapındaki soliter traktusun çekirdekleri besin alımı ve enerji tüketiminde önemli rol oynamaktadırlar (13).

I.B. Beslenmede Rol Oynayan Peptidler

Beslenmede rol alan peptidler merkezi ve periferik olarak 2 grupta incelenmektedir. Ayrıca hipotalamus hem anoreksijenik hem de oreksijenik peptidler salgılayarak beslenmenin hem kısa hem de uzun süreli kontrolünü sağlayabilmektedir. Anoreksijenik peptidler doyma hissini uyararak iştahı azaltırken oreksijenik peptidler ise aksine açlık hissini uyararak iştahı artırabilmektedirler.

Merkezi oreksijenik peptidler:

- ☐ Nöropeptid Y,
- ☐ Oreksinler,
- ☐ Endojen opioidler,
- ☐ Merkezi kannabinoidler,
- ☐ Agouti-İlişkili Peptit (AgRP),
- ☐ Melanin-konsantre edici hormon

Merkezi anoreksijenik peptidler:

- ☐ İnsulin,
- ☐ Glukagon benzeri hormon,
- ☐ Melanokortinler,
- ☐ Kortikotropin salıverici faktör (CRF),
- ☐ Kokain ve amfetamin düzenleyici transkript,
- ☐ Serotonin,
- ☐ Nöronostatin,
- ☐ Nörotensin,
- ☐ Nesfatin-1.

I.B.a Nesfatin-1

Nesfatin-1, ilk defa 2006 yılında Oh-I ve ark. tarafından sıçanlar üzerinde yapılan bir araştırmada keşfedilmiştir. Sıçanların hipotalamik bölgesinde bulunmuş ve anoreksijenik peptit olarak nitelendirilmiştir. Sekseniki aminoasitten oluşan nesfatin-1'in öncü molekülü nükleobindin 2 (NUCB2)

proteinidir. NUCB2/nesfatin-1 reseptörleri korteks, PVN, zona postrema, vagus sinirinin dorsal motor çekirdeği ve beyincikte belirlenmiştir (2).

Periferik infüzyon yoluyla verilen nesfatin-1 molekülünün kanda trigliserit ve kolesterol seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (14). Aynı zamanda sıçanların kan basınç düzeylerini ve kalp hızlarını arttırdığı yapılan çalışmalarda öne sürülmüştür. Böylelikle nesfatin-1'in, korku ve kaygı ile ilgili davranışlar üzerine olan etkisi de gösterilmiştir. NUCB2/nesfatin-1 disfonksiyonlarının, yaygın anksiyete ve panik atak bozuklukları gibi psikiyatrik problemlere getirip çıkarabilmesi fikri öne sürülmüştür (4).

I.B.b Nesfatin-1'in Moleküler Yapısı

Nükleobindin 6 alana sahip bir proteindir:

- ☐ İLA/Leu zengin bölge
- ☐ DNA bağlanma alanı
- ☐ 2 EF kol domeini
- ☐ Asit zengin bölge
- ☐ Lesitin Zipper motif bölgesi

Nükleobindinin proteolizi sırasında 3 protein ayrılmaktadır:

- ☐ Nesfatin-1
- ☐ Nesfatin-2
- ☐ Nesfatin-3

Bunlardan sadece Nesfatin-1'in işleyişi bilinmektedir. Oh-I ve ark. yaptıkları çalışmada nesfatin-1'in besin alımı inhibisyonunda görev aldığı gösterilmektedir (2). NUCB2 birçok biyolojik süreçlere katılabilmektedir ki, bunlar arasında adipogenez, biyomineralizasyon ve karsinojenezi göstermek mümkündür. NUCB2 merkezi sinir sistemi başta olmak üzere sindirim sistemi, üreme sistemi ve kalp dokusunda eksprese olabilmektedir. NUCB2'nin çok işlevsel oluşu onun yapısına bakılarak söylenebilir. NUCB2 Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarını bağlayan iki domaine sahip olmasıyla beraber N-terminal zonunda Zn^{+2} iyonunu da kendine bağlaya bilmektedir ve bu yüzden NUCB1 ile benzerlik oluşturmaktadır (15).

Nesfatin-1, spesifik dönüştürücüler olan PC3/1 ve PC2 tarafından NEFA/nükleobindin-2'nin (NUCB2) translasyon sonrası bölünmesi sonucu oluşmaktadır (16,17).

Nesfatin-1 molekülü N-terminali (N23), orta kısım (M30) ve C-terminali (C29) olmak üzere 3 alandan oluşmaktadır. Orta kısmı (M30) aktif çekirdek bölgesi olup, peptidin fizyolojik etkilerinin oluşumunda anahtar rol almaktadır.

I.B.c Nesfatin-1: Sinyal İletimi

NUCB2/nesfatin-1 reseptörleri henüz tanımlanmamışlardır. Bununla beraber nesfatin-1 için spesifik bağlanma bölgeleri hem MSS'de (örn. hipotalamus, korteks) hem de periferik organlarda (örn. gastrointestinal sistem, hipofiz, pankreas) tespit edilebilmiştir (5).

Çalışmalar nesfatin-1'in hücre içi sinyal iletimini yalnızca MSS'de yerleşik nöronlarda değil aynı zamanda periferik dokularda da örneğin pankreas ve kalp kası hücrelerinde de yaptığını göstermiştir. Nesfatin-1 hücre içi Ca^{+2} iyonlarının girişini artırarak hücre uyarılmasını yapmaktadır ve bunun için de farklı Ca^{+2} spesifik kanalları kullanabilmektedir (6).

I.B.d Nesfatin-1: Besin Metabolizmasındaki Rolü

Nesfatin-1'in anoreksijenik etkisinin leptin yolağından bağımsız olduğu Zucker sıçan modeli yapılan bir çalışmada gösterilmiştir. Üçüncü ventrikül bölgesine uygulanan nesfatin-1 antikoru sonrası leptine dirençli hayvanlarda gıda alımında azalma gözlemlenmiştir (7).

Aynı zamanda 10 gün boyunca uygulanan bir NUCB2 antisens oligonükleotidinin günlük enjeksiyonu sonrasında gıda alımında artmanın olduğu gösterilmiş, böylelikle endojen NUCB2/nesfatin-1'in beslenme davranışlarının düzenlenmesinde rol aldığı fikri ileri sürülmüştür (2).

Kohno ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada paraventriküler ve supraoptik çekirdek bölgesinde lokalize nesfatin-1 nöronlarının yerleşimi ve düzenlenmesi araştırıldığında, PVN'de %24 oksitosin, %18 vazopressin, %13 CRH, %12 TRH pozitif nöronla örtülürken, SON'da %35 oksitosin, %28'i vazopressin pozitif nöronla ko- lokalize olduğu gösterilmiştir. 48 saatlik bir açlık sonrası 2 saat beslenmenin ardından PVN ve SON bölgelerinde nesfatin-1 ekspresyonunda ardışık olarak 10 ve 30 kat artış olduğu bildirilmiştir (18).

Aynı zamanda SON bölgesinde NUCB2 mRNA ekspresyonlarındaki artış da gösterilmiştir. Bu da bu bölgedeki nesfatin-1 nöronlarının beslenme davranışlarıyla ilişkili olduğunu ve enerji homeostazının postprandiyal düzenlenmesinde yer ala bileceği fikrini ileri sürmüştür (19).

I.B.e Beslenmede Nesfatin-1 ve Diğer Sistemler

Nesfatin-1 sistemin beslenmeyle ilgili diğer sistemlerle ilişkisi yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Nesfatin-1 leptinden bağımsız bir yolla etkisini hayata geçirirken, yapılan bir başka çalışmada melanosit reseptörlerine bağlandığı gösterilmiştir (20).

Nesfatin-1'in periferik uygulanması sonrası farelerde anoreksiya oluşumu gözlenirken nesfatin-1'in bu etkisinin traktus solitarius çekirdekdeki proopiomelanokortin ve kokain-amfetamin düzenleyici peptit (KART) nöronlarının aktive edilmesi sonucu oluşturduğu ortaya konmuştur (21).

Paraventriküler çekirdekte ve supraoptik çekirdekte yapılan araştırmalar sonucu oksitosin salgılayan magneselüler nöronlarla nesfatin-1'in ko-lokalize olduğu gösterilmiştir (22).

Nesfatin-1'in magneselüler nöronları uyarılabilirliği 2008 yılında Price ve ark. tarafından yapılan çalışmada gösterilmiştir (23).

Yapılan bir başka çalışmada paraventriküler çekirdeğe nesfatin-1 enjekte edildiğinde, soliter traktustaki c-Fos ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiş, aynı zamanda oksitosin salınımındaki uyarılmayla beraber farelerde anoreksiya olduğu bildirilmiştir. Bu sonuca dayanarak, paraventriküler çekirdekten soliter traktusa doğru aksonal uzantılara sahip magneselüler nöronların nesfatin-1 tarafından indüklendiği fikri ileri sürülmüştür (19).

CRF/CRF2 reseptörleri ile nesfatin-1'in etkileşim halinde olduğu, parvoselüler nöronlarda nesfatin-1'in bu reseptörler ile ko-lokalize olduğunu vurgulayan çalışmalar da yapılmıştır (19).

Yapılan in vitro çalışmada CRP eksprese eden nöronların nesfatin-1'le uyarılabilirliği ve aynı zamanda CRP düzeyinde artışın olduğu fikri araştırılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır (24,25).

Bir başka çalışmada CRF2 antagonisti uygulandığında nesfatin-1'in oluşturduğu anoreksijenik etki tamamen kaybolmuştur (16).

Nöronal hücre kültürü yapılan bir çalışmada nesfatin-1'in eklenmesiyle CREB düzeylerinde artışın olduğu ve bunun da nöronal aktiviteye etki ettiği bildirilmiştir (5).

II. Nörotransmitterler

Nöronda sentezlenen veya nöronda bulunan, nöron uyarıldığında salınan ve hedef dokuda bir yanıt oluşturan maddeler bu grupta değerlendirilir. Aynı zamanda bir nörotransmitterin postsinaptik bölgede reseptörü bulunmalı ve hedef doku üzerine uygulandığında aynı yanıt elde edilebilme yeteneğine sahip olmalıdır. Nörotransmitterler görevini bitirdikten sonra sinaptik boşluktan uzaklaştırılırlar (26).

Nörotransmitterler nöromodölatör ve nöromediyatör olarak iki grupta incelenebilmektedir.

II.A. Nöromediyatörler

Nöronlar üzerinde hızlı eksitator veya inhibitör etki eden ve bu etkisini iyonotropik reseptör aktivasyonu ile yapan maddelerdir. Vücudun hem dış hem de iç ortam tarafından uyarılara hızlı tepki verebilmektedirler. Bunlardan glutamat ve GABA nöronlar üzerinde hızlı eksitator ve inhibitör etkilere sahip olan, aynı zamanda reseptörlerine bağlanarak nöronal aktivitede uzun süreli değişikliklere neden olabilen mediyatörlerdir (27).

II.B. Nöromodölatörler

G-proteinlerine bağlı metabotropik reseptörler aracılığıyla hareket ederek, nöronal metabolizmada kalıcı değişikliklere neden olurlar. Vücudun duygusal ve motivasyonel durumlarının kontrolünde yer alırlar (28).

Belirli bir sinapsdan salınan nörotransmitterlerin etkisi, onlarla birlikte salınan bazı moleküllerle değişebilir. Bunlar genellikle peptit yapılı maddelerdir. Örneğin, presinaptik terminalden salınan dopamin modölatörünün etkisi vazointestinal peptid (VIP) ile değişebilir (29).

II.C. Nörotransmitterin Uzaklaştırılması

Nörotransmitter sinaptik yarığa salıverildikten sonra ortamdan uzaklaştırılması için gerekli sürece yüksek afiniteli geri alım denmektedir. Nörotransmitterlerin %80'i ortamdan böyle uzaklaştırılır. Bu mekanizmada nörotransmitter presinaptik membranda bulunan kendine özgü nörotransmitter transport proteinlerine bağlanmaktadır. Bu proteinler vasıtasıyla sitoplazmaya taşınan nörotransmitterler ya enzimatik yolla parçalanır ya da boşalmış veziküllere tekrar yüklenebilirler. %20'lik geriye kalan nörotransmitter kısmı ise postsinaptik membranla ilişkili enzimler tarafından parçalanmaktadır (30,31).

III. Veziküler Nörotransmitter Taşıyıcılar

Sinaptik ileti, iki tip nörotransmitter taşıyıcı gerektirir. Plazma membran taşıyıcıları; ekzositozu takiben sinyali sonlandırmak ve nörotransmitterleri başka bir ekzositoz turu için geri dönüştürmek için nörotransmitterleri sinaptik aralıktan çıkarır.

Veziküler nörotransmitter taşıyıcıları; nörotransmitterleri, ekzositotik salıverilmesine izin vermek için salgı veziküllerinin lümenine paketleyen taşıyıcılardır (32). Şimdiye kadar 4 veziküler taşıyıcı tanımlanmıştır.

- ☐ Veziküler Asetilkolin Taşıyıcıları (VACHT),
- ☐ Veziküler Monoamin Taşıyıcıları (VMAT),
- ☐ Veziküler GABA ve Glisin Taşıyıcıları (VGAT)
- ☐ Veziküler Glutamat Taşıyıcıları (VGLUT)(33).

Memeliler iki VMAT (VMAT1 ve 2) ve üç VGLUT (VGLUT1, 2 ve 3) genini eksprese eder. VMAT2, beyindeki tüm aminojik nöronlarda, mast hücrelerinde ve bağırsaktaki bazı nöronlarda eksprese edilirken, VMAT1, adrenal kromaffin hücreleri de dâhil olmak üzere periferik nöroendokrin hücrelerde eksprese edilir. VGLUT1 ve 2, merkezi sinir sistemindeki glutamaterjik nöronların tamamlayıcı alt kümelerinde eksprese edilir. Buna karşılık, en son tanımlanan izoform olan VGLUT3, bir dizi kolinerjik ve aminojik hücre tipinde VACHT ve VMAT2 ile birlikte eksprese edilir (34).

Postsinaptik bir hücrenin tek bir ekzositotik olaya (bir salgı vezikülü) tepkisi, kuantal boyut olarak tanımlanır. Son 10 yılda, veziküler taşıyıcı ekspresyonunun salgı veziküllerinde bulunan nörotransmitter miktarını düzenleyebileceği ve böylece kuantal büyüklüğü etkileyebileceği giderek daha açık hale gelmiştir. Memeli VACHT, VGLUT1 ve VMAT2'nin in vitro aşırı ekspresyonunun kuantal boyutu arttırdığını gösteren çalışmalar vardır. Aksine, VACHT nakavt fare modellerinde, VGAT nakavt heterozigotlarında ve VGLUT heterozigotlarında kuantal boyutta bir azalma gözlenmiştir. Bu veriler, değiştirilmiş taşıyıcı ekspresyonunun, her sinaptik veziküle (SV) lokalize olan veziküler taşıyıcıların sayısının artırabileceğini veya azaltabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, bunun henüz doğrudan gösterilmediğine dikkat edilmelidir (35). Herhangi bir sistemde bir SV'de bulunan taşıyıcıların sayısının belirsizliğini koruduğunu ve tahminlerin 1 ile 14 arasında değiştiği belirlenmektedir (36).

Veziküler taşıyıcılar en az iki farklı tipte salgı vezikülüne hareket eder (37). SV'lerde depolanmalarına ek olarak, monoaminler ve belki de diğer nörotransmitterler, nöronlardaki büyük yoğun veziküllerde (LDCV'ler) depolanır. LDCV'ler, nöroendokrin hücrelerde bulunan büyük yoğun çekirdek granüllerine benzer. SV'ler ve LDCV'ler, birçok önemli farklılıklar göstermektedir (38). Monoaminlere ek olarak, diğer nörotransmitter tiplerinin, yoğun bir protein çekirdeği olmasa da LDCV'lere benzer vezikül tiplerinden salınması mümkündür. Glutamaterjik hipokampal nöronlarda, heterolog olarak eksprese edilen VMAT2, somatodendritik bölgelerde salınabilen vezikülleri temizlemek için salınabilir (39). Benzer şekilde, dopaminerjik nöronlardaki somatodendritik salınım, tübülomeziküler cisimler olarak bilinen berrak, pleomorfik veziküller aracılık etmektedir (40).

III.A. Asetilkolin

İlk keşfedilen nörotransmitter asetilkolin olup 1921 yılında Otto Levi tarafından bulunmuştur. 1930'ların başlarında, Feldberg ve ark. tarafından vejetatif gangliyonlardaki sinaptik iletilerde asetilkolinin rolü araştırılmıştır. 1936'da Dale ve ark. tarafından asetilkolinin nöromüsküler bağlantılarda bir mediyatör olduğu gösterilmiştir. 1946'da İngiliz nörobilimci John C. Eccles,

asetilkolinin spinal kord nöronları üzerindeki uyarıcı etkisini keşfetmiştir (41-44).

Asetilkolin, kolin asetiltransferaz (ChAT) enzimi ile sentezlenir ve veziküler asetilkolin taşıyıcısı (VACHT) tarafından sinaptik veziküllere yüklenir (45). Kolin asetiltransferaz, kolinin asetil-koenzim A ile asetilasyonunu katalize eder(46). ChAT proteininin immunoreaktivitesinin çoğunun sinaptik olduğunu, ancak bazısının genellikle sitoplazmik olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (47).

Sinaptik vezikül lümeni, vezikül zarında bulunan ATP-bağlı proton pompasının etkisiyle asitlendirilir. Vezikül lümeni ile sitoplazma arasındaki pH gradyanı, asetilkolin taşınması için gereken itici gücü sağlayabilmektedir. VACHT, protonlar için asetilkolini değiştirir (46).

Sinaptik veziküllerin füzyonu ve içeriğinin salınımını takiben, asetilkolin sinaptik yarık içerisinde dağılmakta ve postsinaptik hücrelerde bulunan asetilkolin reseptörlerini (ACHR'ler) aktive etmektedir (48).

Asetilkolinin etkisi, asetilkolinesteraz (AChE) tarafından doğrudan enzimatik hidroliz ile sonlandırılır. Oluşan kolin daha sonra yüksek afiniteli kolin taşıyıcılarla (HACHT veya ChT) presinaptik nörona geri taşınır ve yeni bir asetilkolin sentezi için kullanılabilir (46).

III.A.a Veziküler Asetilkolin Taşıyıcı (VACHT)

Yapılan bir çalışmada veziküler asetilkolin taşıyıcısı ilk önce klonlanmış, ardından *C. Elegans* enzimiyle karşılaştırılmış ve *UNC-17* geninin ürünü olduğu gösterilmiştir (49). Yapısal olarak, *UNC-17* (VACHT), sitoplazmik (yani ekstrasveziküler) N- ve C-terminale ve 12 adet transmembran domene sahip ve veziküler monoamin taşıyıcıları (VMAT) ile yakından ilişkili proteindir (50).

Hayvanlarda anti-*UNC-17* antikor preparatları ile immünohisto çalışmalarında *UNC-17*'nin sinaptik vezikül proteini sinaptotagmin ile ko-lokalize olduğu gösterilmiş ki, bu da sinaptik veziküller ile ilişkili olduğunu düşündürmüştür (51).

III.B. GABA

Gamma aminobutirik asit (GABA), presinaptik nöronun sitoplazmasında, glutamat dekarboksilaz enzimi tarafından öncü glutamattan sentezlenir ki, bu enzim kofaktör olarak B6 vitaminini (piridoksin) kullanmaktadır. Sentezden sonra veziküler GABA taşıyıcısı tarafından sinaptik veziküllere yüklenmektedir. Veziküllerin hücrenin plazma zarına yerleştirilmesine SNARE kompleksleri yardımcı olmaktadır (52,53).

Bir aksiyon potansiyeli presinaptik hücreye ulaşması, voltaj kapılı Ca^{2+} kanallarının açılmasına, Ca^{2+} iyonlarının sinaptobrevine bağlanmasına ve bu da vezikülün plazma membranı ile füzyonuna neden olur ki, sonuçta GABA özgün reseptörleri ile bağlanmak üzere sinaptik yarığa bırakılmaktadır. GABA daha sonra presinaptik hücreye geri alınabilmektedir (54,55).

GABA-transaminaz enzimi tarafından süksinat semialdehite dönüştürülür, daha sonra sitrik asit döngüsüne (karbonhidrat, amino asitler ve yağ asitlerinin oksidasyonu son aşama) girebilmektedir (56).

GABA, GABA-A ve GABA-B olmak üzere iki ana post-sinaptik reseptöre bağlanır. GABA-A reseptörü iyonotropik reseptör olup, GABA varlığında hücreye Cl^- iyonu iletkenliğini arttırmaktadır. Negatif yüklü Cl^- iyonlarının akışı hücreyi hiperpolarize ederek aksiyon potansiyeli oluşumunu engellemektedir. GABA-B metabotropik G-proteinine bağlı reseptör olup, postsinaptik potasyum (K^+) iletkenliğini artıran, presinaptik kalsiyum (Ca^{2+}) iletkenliğini azaltan, dolayısıyla postsinaptik hücreyi hiperpolarize eden ve presinaptik hücrede bir aksiyon potansiyelinin iletilmesini önleyebilmektedir (57-59).

GABA, nöronal ateşlemeyi inhibe eden temel nörotransmitter olduğundan, işlevi inhibe ettiği nöral devre tarafından belirlenmektedir. Merkezi sinir sistemi boyunca karmaşık devrelerde yer almakta olduğu bilinmektedir (60,61).

GABA, globus pallidus'a çıkış yapan yollarda striatal nöronlar tarafından salınır, bu da istenmeyen motor sinyallerin inhibe olunmasında rol oynar (62,63). GABA'nın beyin medulla bölgesinde yapılan çalışmalarında solunum hızının kontrolünde rol aldığı ve aynı zamanda solunum hızını azalttığı rapor edilmiştir (64-66).

GABA'nın omurilikte inhibitör internöronlarda görev yaptığı gösterilmiştir. Bu nöronların, omuriliğin duyusal bilgiyi bütünleştirmesine ve yumuşak hareketler oluşturmaya izin vererek uyarıcı propriyoseptif sinyalleri bütünleştirmeye yardımcı olduğu bilinmektedir (67).

Gelişmekte olan beyindeki ekstraselüler Cl^- iyon seviyelerinin düşük olması nedeniyle, GABA fetal ve neonatal dönemde beyinde uyarıcı bir etkiye sahiptir (68). GABA-A reseptörleri, gelişmekte olan beyinde Cl^- iyon kanallarını açtığında hücrenin hiperpolarizasyonu ve bu sebepten bir aksiyon potansiyelini tetikleme olasılığının daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (69).

III.B.a Veziküler GABA Taşıyıcı (VGAT)

Sinaptik veziküllerde GABA'nın birikmesine aracılık eden veziküler GABA taşıyıcısının olduğunu ilk defa 1997'de McIntire ve ark. tarafından rapor edilmiştir (70). VGAT moleküler olarak ilk tanımlanan transporter olup, yapı bakımından farklı ve yeni bir gen ailesine ait olduğu bildirilmektedir. VGAT'ın, beyin ve omuriliğin GABAerjik aynı zamanda glisinerjik nöronlarının sinir uçlarında yoğun bir şekilde biriktiği yapılan çalışmada gösterilmiştir (71). Yapılan başka bir araştırmada, hipokampal liflerden elde edilen tomurcuklarda GABA içerdiği gösterilmiş, lakin VGAT immünoaktivitesine sahip olmadığı rapor edilmiştir (72-74).

VGAT SCL32 ailesinin tek üyesi olduğu ve hiçbir izoformunun henüz bilinmediği bildirilmektedir. SLC32, SLC36 lizozomal amino asit taşıyıcı (LYAAT) ve SLC38 sodyum bağlı aminoasit taşıyıcı aileleri ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir (70).

İn situ hibridizasyon ve immünohistokimyası çalışmaları sonucunda VGAT'ın, neokorteks, hipokampus, serebellum, striatum, septal çekirdekler ve talamusun retiküler çekirdeğinin GABAerjik ve glisinerjik nöronlarında eksprese edildiği ortaya koymuştur (75).

Yapılan araştırmalarda, glisinerjik nöronlarda VGAT varlığı aynı zamanda COS7 hücrelerindeki VGAT cDNA'nın verilmesini takiben glisin alımının önemli ölçüde artışı ile, VGAT'ın glisin taşıdığı gösterilmiştir. COS-7 hücreleri insan fibroblast hücrelerine benzerliği sebebiyle fibroblast benzeri hücreler olarak da bilinmektedir. VGAT geninin inaktivasyonu GABAerjik ve

glisinerjik sinyal iletiminde azalmaya ve embriyonik ölümlere yol açabilmektedir (76,77).

III.C. Glutamat

Glutamat esansiyel olmayan amino asittir ve insan merkezi sinir sisteminde en çok bulunan eksitatör nörotransmitterdir (78). Birçok metabolik yollar arasında bağlantıyı sağlayabilmektedir. Ekzositozla sinaptik aralığa veziküller içerisinde salınmaktadır. Kan-beyin bariyerini geçemez, aynı zamanda aşırı reseptör aktivasyonunu önlemek için ekstraselüler alandan astrositler tarafından sürekli uzaklaştırılır (78).

Glutamat, beyindeki NMDA, AMPA ve metabotropik reseptörlerin aktivasyonu ile uzun süreli öğrenmenin temeli olan anıların konsolidasyonuna katkıda bulunur. Astrositler üzerindeki AMPA ve metabotropik reseptörler nedeniyle, glutamat sinaptik nöronal aktiviteyi güçlendirebilir. Aynı zamanda dinlenme halindeki nöronları aktive edebilir. Tüm beyinde bulunduğu sinirsel iletişim, öğrenme ve bilgiyi düzenlemede rol oynadığı bilinmektedir (80).

EAAT'ler toksisite dâhil ekstatör sinyallemede kullanılırken, AMPA ve NMDA reseptörleri sinaptik plastisitenin araçları olarak, glutamatın öğrenme ve davranış üzerine olan etkilerini hayata geçirmede kullanılabilmektedirler. Ayrıca NMDA reseptörlerinin kortikal göçün yönlendirilmesinde önemli bir rolü sahip olduğu yapılan çalışmada gösterilmiştir (81).

Glutamatın uyarılması, büyük ölçüde astrositik/nöronal glutamat-glutamin veya glutamat-GABA/glutamin döngüsü yoluyla sıkı bir şekilde düzenlenmektedir (82). Glutamatın aşırı aktivitesi eksitotoksikite ve nörodejenerasyonu hızlandırabilirliği yapılan çalışmada gösterilmiştir (83). NMDA, AMPA, kainat ve metabotropik reseptörler üzerindeki agonist etkiler, serebral iskemi, status epileptikus ve nörodejeneratif hastalıkları takiben nörotoksik zararları açıklayabilir (84).

Nörobilimdeki son gelişmeler, eksitotoksik hücre ölümüne genetik bir katkı olduğunu ortaya koymuştur (85).

Vücuttaki glutamat ve glutamaterjik reseptör miktarını ve dağılımını belirlemenin başlıca yöntemleri doku kültürü ve FMRI- fonksiyonel manyetik rezonans görüntülemesidir (FMRI- beyin aktivitesinin invazif olmayan ölçümüne

izin veren gelişmiş bir nörogörüntüleme tekniği). Bu teknikler klinik kullanımdan ziyade araştırmaya yöneliktir. Lojistik olarak, vücuttaki glutamatın her yerde bulunması, kantitatif olarak test edilmesini zorlaştırır. Hem madde kullanım bozuklukları hem de nörodejeneratif durumlar için farmakolojik bir hedef olarak potansiyele sahip olsa da inme riski gibi ciddi yan etkiler olması sebebiyle kullanımı araştırma kapsamında sınırlandırılmıştır (86).

Akson terminallerinde veziküller içinde depolanan glutamat ekzositoz yoluyla sinaptik boşluklara salgılanarak postsinaptik membranda yerleşik reseptörlerine bağlanmakta, böylelikle ikinci habercileri uyarmış olmaktadır. Ardından glial hücrelerde ve presinaptik terminallerde bulunan glutamat taşıyıcıları ile sinaptik yarıktan uzaklaştırılmaktadırlar. Glial hücre içine geri alındıktan sonra, glutamat glutamine dönüşerek sinir terminaline geri taşınır (87,88).

Beyindeki toplam glutamatın %20'sine kadarı meta kompartman şeklinde astrosit hücrelerinde depolanmaktadır. Nöronların metabolik işleyişi glutamat-glutamin döngüsüyle astrositlerle ilişkilidir. Nöronal salınımdan sonra, glutamat astrositlerde birikerek, glutamin sentetazın (nöronlarda bulunmayan bir enzim), fosforilasyonu ve amonyumu (NH₄) yoluyla glutamine dönüştürülmektedir (89,90).

Astrositler glutamati sentezleyebilir ve nöronlarda bulunmayan başka bir enzim olan piruvat karboksilaz enzimiyle glutamatın öncüsü alfa-ketoglutaratı üretebilmektedirler. Bu sentez, hafıza oluşumu gibi beynin aktif çalıştığı zamanlarda yoğunlaşmış gibi görünmektedir (91).

Nöronlar, glikozdan glutamat veya GABA sentezleyemezler. Bunun yerine, glutamati mitokondriyal glutaminaz ile glutamine hidrolize ederek glutamat dekarboksilaz ile GABA'ya dönüştürebilmektedirler (92).

III.C.a. Veziküler Glutamat Taşıyıcıları (VGLUT)

Veziküllerin glutamat ile yüklenmesine, veziküler glutamat taşıyıcıları (VGLUT1, 2 ve 3) aracılık etmektedir. Tüm glutamaterjik nöronlarda nörotransmisyon için VGLUT1 ve VGLUT2 gerekli proteinlerdir. VGLUT3 ise duyuusal sinir hücrelerinde ve glutamaterjik olmayan nöronlarda eksprese edilmektedir (93).

VGLUT'lar, veziküler yüklemenin ilk aşamasında elektrojenik glutamat ithalatçıları olarak çalışırlar ve V-ATPaz tarafından pompalanan protonlarla negatif yükleri dengeleme bilmektedir. Vezikül lümeninin tamponlama kapasitesi tükendiğinde, protonlar GLUT'a bağımlı proton potasyum değişim aktivitesi ile pompalanırlar (94,95).

Yapılan bir başka çalışmada protonlar için başka bir çıkış yolunu sodyum-proton eşanjörü (NaHE6) sağlayabildiği gösterilmiştir (88).

VGLUT1 ve VGLUT2 başlangıçta inorganik fosfat (Pi) için Na⁺ iona bağlı taşıyıcılar olarak tanımlanmış, glutamat yüklemesindeki temel işlevleri daha sonra aydınlatılmıştır. VGLUT'ların yapısal olarak, *SLC17A* alt ailesine mensup NaPi taşıyıcıları Tip I ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (96).

Deneysel ortamda yapay membranlara uygulanan saflaştırılmış ve dilüe edilmiş VGLUT'lar üzerine yapılan biyokimyasal çalışmalarda, glutamat ve Pi için taşıma aktivitelerinin aynı moleküllerde bulunduğu gösterilmiştir (97,98).

Glutamatın saflaştırılmış VGLUT'a taşınması, Cl iyonları tarafından uyarılmaktadır. Sinaptik veziküllerde glutamat birikimi, Cl'un aktifleşmesi ve keto-asit düzeyindeki inhibisyon arasındaki bir denge ile düzenlenir. Keton cisimcikleri, Cl'ye olan afinitesini azaltarak VGLUT aktivitesini inhibe eder (99).

Veziküler nörotransmitter taşıyıcıları immünohistokimya boyamalarında belirteç olarak kullanabilmekte olup (100) bu tez çalışmasında da marker olarak kullanılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Proje çalışmalarında daha önce etik kurul kararı alınmış olan proje çalışmalarımızdan (HADYEK 01.03.2016 tarih ve 2016-04/05 numaralı karar) hiçbir uygulamaya maruz bırakılmadan deneylere kontrol grubu olarak katılmış deneklerden elde edilen beyin kesitleri kullanılmıştır. Bu kesitlerin tez çalışmasında kullanılabilmesi için ayrıca etik kurul uygunluğu kararı alınmıştır (Bursa Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 01.12.2020 tarih ve 2020-12/5 numaralı kararı) Bu denekler fosfat tamponlu %4'lük paraformaldehid ile perfüzyon fiksasyonuna tabi tutularak sakrifiye edilen deneklerdir. Çıkarılan beyinlerden 40 mikron kalınlığında koronal kesitler 5 seri halinde vibratom kullanılarak alınmıştır. Bu kesitler kriyoprotektan madde içerisinde uzun süre -20 C'de saklanabilmektedir. Çalışmada her veziküler taşıyıcı protein işaretlemesi için 5 erkek ve 5 dişiden elde edilmiş kesitler kullanılmıştır.

I. Deney Prosedürü

Tez için yapılan deneyler, hipotezin test edilmesine yönelik olarak belirlenen özgün amaç doğrultusunda planlanmıştır.

Özgün amaç: Nesfatin-1 nöronları üzerinde eksitatör ve inhibitör nörotransmitterlere ait etkinin belirlenmesidir. Bu amaç kapsamında hipotezimiz, nesfatin-1 nöronlarının anoreksijenik fonksiyonlarını farklı nörotransmitterleri içeren üst merkez nöronlarının kontrolü altında gerçekleştiriyor olması. Bu hipotezi test etmeye yönelik olarak, glutamat, asetilkolin veya GABA'yı nörotransmitter olarak kullanan nöronlara ait akson sonlanmalarının nesfatin-1 nöronları üzerinde yaptıkları apoizasyonların ikili immünohistokimyasal teknik ile gösterilmesi hedeflenmiştir. Özgün amaç kapsamında 3 hedef belirlenmiştir.

1. Veziküler glutamat taşıyıcı (VGluT) proteinlerini içeren eksitatör akson sonlanmalarının nesfatin-1 nöronları üzerinde varlığının ve bu tür nöronların hipotalamustaki yoğunluğunun belirlenmesi.

2. Veziküler asetil kolin taşıyıcı (VACHT) proteinlerini içeren eksitatör akson sonlanmalarının nesfatin-1 nöronları üzerinde varlığının ve bu tür nöronların hipotalamustaki yoğunluğunun belirlenmesi.

3. Veziküler GABA taşıyıcı (VGAT) proteinlerini içeren inhibitör akson sonlanmalarının nesfatin-1 nöronları üzerinde varlığının ve bu tür nöronların hipotalamustaki yoğunluğunun belirlenmesi

Bu hedeflere ulaşmada ikili indirekt immünoperoxidaz tekniği kullanılmış ve nesfatin-1 antikoruyla veziküler taşıyıcılardan birine ait antikor kullanılarak işaretlemeler gerçekleştirilmiştir. Kullanılan tekniğin detayları aşağıda verilmiştir.

II. İmmünohistokimyasal İşlemlerde Takip Edilen Genel Kurallar

Çalışmada yer almış immunohistokimyasal işlemlerin tümü viallerde yüzen kesitlere uygulanmış, inkübasyon ve yıkama işlemleri sallayıcı yardımı ile yapılmıştır. Çalışmada, kesitlerin yıkama aşamalarında 0.05 M Tris-HCl solüsyonu (pH 7.6), non-spesifik bağlanmayı baskılayıp tüm antikorları dilüe etmek için bloklayıcı tampon olarak %10'luk normal at serumu kullanılmıştır. Primer ve sekonder antikor inkübasyonlarını takiben kesitler avidin-biotin solüsyonunda (ABC Elite Kit) bekletilmiş ve oluşan kompleksi görünür hale getirmek amacıyla diaminobenzidin (DAB) kromojeni ya da nikel-DAB kullanılmıştır. Yıkılarak lamlara alınan kesitler, kurutulma işlemi sonrası ışık mikroskopide incelenmek için DPX ile kapatılmıştır.

Tez çalışmalarında kullanılan primer antikorlar Tablo-1'de verilmiştir. Bu antikorlardan laboratuvarımızda ilk kez kullanılacak olan VGAT ve VACHT antikorları için öncelikle optimum sinyali elde etmek açısından optimizasyon denemeleri yapılmıştır. Daha önce optimize edilen ve ilk kez bu çalışmada optimizasyonu yapılan primer antikorların kullanım özelliği Tablo-2'de listelenmiştir. Çalışmada kullanılan antikorlar ile yapılacak immünohisto-

kimyasal boyamaların özgünlükleri kontrol çalışmalarıyla belirlenmiştir. Kontrol çalışmalarında esas immünohistokimyasal boyamaya eş zamanlı olarak kontrol boyaması yapılmış ve bu boyamalarda ya primer antikor basamağı ya da sekonder antikor basamağı atlanmıştır. Kontrol boyamalarının değerlendirilmesinde hiçbir hücrel boyanma gözlenmemiştir. Bu sonuç antikoru özgün işaretleme kontrolü olarak değerlendirilmiştir.

İmmünohistokimya Boyama Basamakları:

İkili immünoperoksidaz yöntemi kullanılarak, nesfatin-1 nöronlarındaki VGlut2, VGlut3, VACHT ve VGAT proteinlerinin ekspresyonları ayrı ayrı belirlenmiştir. Bu çalışmalarda aşağıdaki protokol takip edilmiştir:

1. Kriyoprotektandan arındırma ve bloklayıcı serum aşamalarından sonra, uygun nörotransmitter taşıyıcı proteinleri tanıyan primer antikorlar ile tüm gece oda sıcaklığında inkübasyon.
2. Sekonder antikor uygulaması: Biotin-konjuge eşek anti-tavşan IgG ile 2 saat inkübasyon.
3. Avidin-biyotin kompleksi solüsyonu ile 60 dk. inkübasyon.
4. Substrat kromojen solüsyonu ile inkübasyon: Bu aşamada kromojen olarak Nikel-DAB (Ni-DAB) solüsyonu kullanılarak siyah boyanma elde edilmiştir. Böylece DAB boyaması ile kahverengi olarak gözlenecek sitoplazmik boyanma ile kontrast oluşturulmuştur.
5. Kesitler tekrar iki saat süreyle bloklayıcı serumda inkübe edilmiştir.
6. Primer antikor inkübasyonu: tavşan anti-nesfatin-1 antikoru ile tüm gece oda sıcaklığında inkübasyon.
7. Biotin konjuge eşek anti-tavşan sekonder antikoru ile 2 saat inkübasyon.
8. Avidin-biyotin kompleksi solüsyonu ile 1 saat inkübasyon.
9. Substrat kromojen solüsyonu (DAB) ile antikor-antijen-enzim kompleksinin görünür hale getirilmiştir
10. Kesitler DPX ile kapatılmıştır.

Tablo-1: Çalışmada kullanılan antikorlar

Kullanılan antikor	Katalog No	Lot No	Üretici Firma
Tavşan anti-nesfatin-1	H00322	0011425	Chemicon Int.
Kobay anti-VGluT2	AB5907	0507003303	Chemicon Int.
Kobay anti-VGluT3	AB5421	0509010393	Chemicon Int.
Tavşan anti-VGAT	AB5062P	3681251	Chemicon Int.
Keçi anti-VACHT	AB144P	3708759	Chemicon Int.

Tablo-2: Çalışmada kullanılan antikorlar, dilüsyonları ve inkübasyon süreleri.

Test edilen antikor	Dilüsyon	İnkübasyon Süresi
Tavşan anti-nesfatin-1	1:40000	Tüm gece oda sıcaklığında
Kobay VGluT2	1:5000	Tüm gece oda sıcaklığında
Kobay VGluT3	1:5000	Tüm gece oda sıcaklığında
Tavşan VGAT	1:5000	Tüm gece oda sıcaklığında
Keçi VACHT	1:5000	Tüm gece oda sıcaklığında

III.Preparatların İncelenmesi ve İstatistiksel Analiz

İmmunoperoksidaz boyaması yapılan kesitler Olympus BX50 mikroskopunun 40X objektifi kullanılarak incelenmiştir. Dijital kamera (Olympus DP71 CCD renkli kamera, 1,5 million pixel) ile bilgisayar ekranına aktarılan görüntüler üzerinde hücre sayımları gerçekleştirilmiştir.

Çalışmalar kapsamında yapılacak ikili işaretlemeler için sıçan beyin atlasına göre supraoptik çekirdeğin (SON) yer aldığı bregma –0.48 mm ile –1.44 mm koordinatları arasındaki kesitler kullanılmıştır. Bu tez çalışmasında nesfatin-1 nöronlarının en yoğun olarak bulunduğu ve tamamı magnoselüler tipte nöron içeren supraoptik çekirdekler araştırılmıştır. Hücre sayımında rostrakaudal düzlemde birbirine eşit uzaklıkta 5 farklı seviyeden alınan kesitler

kullanılmış ve her denek için kesitlerin aynı koordinatta olmasına dikkat edilmiştir

İkili immünoperoksidaz işaretlenmiş kesitlerin supraoptik çekirdeklerinde öncelikle nesfatin-1 peptiti için immüno pozitif olan tüm nöronlar bilateral olarak sayılmıştır. Aynı zamanda bu nesfatin-1 nöronlarının VGluT, VACHT veya VGAT immüno reaktif olan en az bir akson sonlanmasıyla temasta olup olmadıkları değerlendirilmiştir. Temas görülen (innerve olan) nöron sayıları kaydedilmiştir. Her denek için innervasyon aldığı belirlenen nesfatin-1 nöron sayısının, nesfatin-1 işaretlemesi gözlenen tüm nöronlara (hem innervasyon alan hem de almayan nesfatin-1 işaretli nöronların toplamı) oranı hesaplanmıştır. Bu veriler nörotransmitter tipleri arasındaki farklılıklar ve cinsiyete bağlı değişimler açısından istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Elde edilen verilerin gruplar arası varyans analizi ANOVA ile istatistiki anlamlılık karşılaştırması ise Student–Newman–Keuls testi ile yapılmış ve istatistiki anlamlılık sınır değeri olarak $p < 0,05$ alınmıştır.

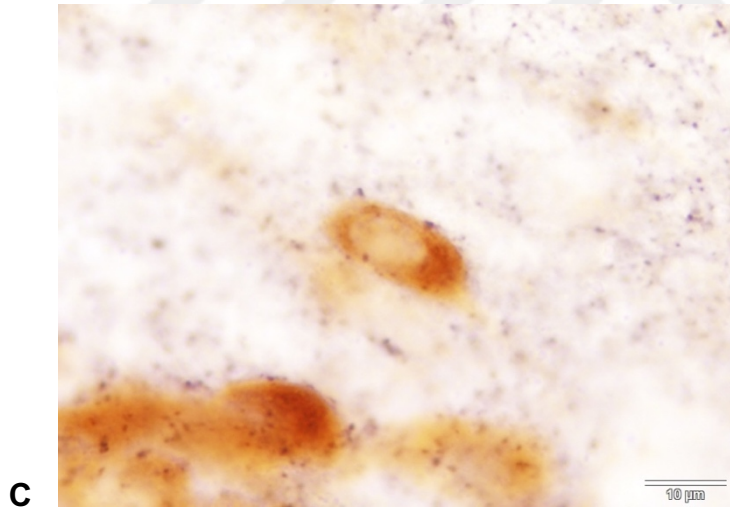
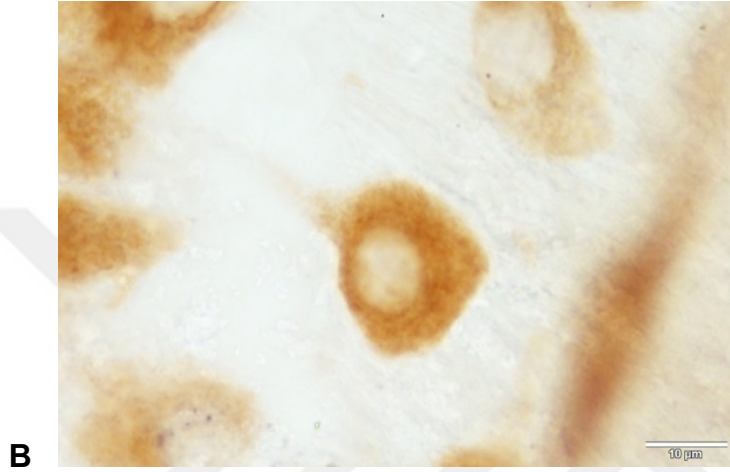
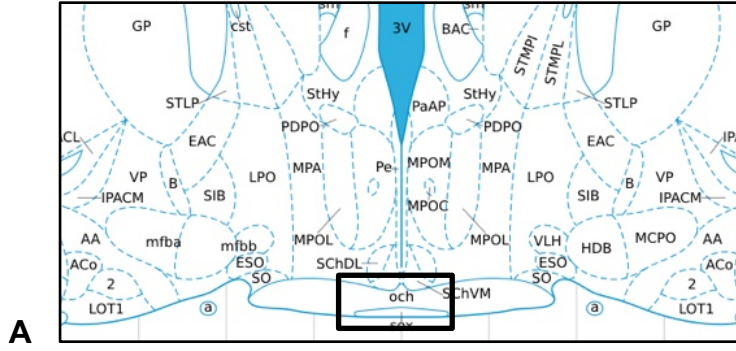
BULGULAR

I. İmmünohistokimyasal İşaretlemelerin Değerlendirilmesi

İmmünohistokimya tekniğiyle yapılan ikili immün işaretlemeler hipotalamik supraoptik çekirdekte (Şekil-1A) incelendiğinde, sitoplazmik nesfatin-1 proteini diaminobenzidin (DAB) kromojeniyle boyanmış ve oluşan komplekslerin yansıttığı sinyaller ışık mikroskopunda kahverengi olarak belirlenmiştir. Nikel amonyum sülfat ilaveli DAB'la (Ni-DAB) hücre membranlarında lokalize akson sonlanmaları (VGLUT2, VGLUT3, VGAT, VACHT) koyu mor ve siyah renklerinde izlenmiştir. Hem sitoplazmalarında kahverengi boyamanın olması hem de bu nöron membranlarının üzerinde lokalize koyu mor ve siyah nokta şekilli işaretlemelerin olması sebebiyle, görüntüler ikili boyama şeklinde işaretlenmiş olarak kabul edilmiştir (Şekil-1B, 1C).

Veziküler glutamat transporter belirteçleriyle Nesfatin-1 nöronlarının regülasyonunda glutamaterjik sistemin rolünün belirlenme amacıyla supraoptik çekirdekte (SON) yerleşik nesfatin-1 nöronlarının ikili immünohistokimya boyaması yapılmıştır. Yapılan boyamalarda nesfatin-1 nöronlarının sitoplazmaları kahverengi, nöron ile apozisyon gösteren glutamaterjik sonlanmalar ise (VGLUT2, VGLUT3) koyu mor ve siyah noktalar şeklinde belirlenmiş ve ışık mikroskopunda görüntülenmiştir. Dişi deneklerde supraoptik çekirdekteki nesfatin-1 nöronlarının %69'u VGLUT2 içeren sonlanmalarla temas ederken, erkek deneklerde bu oran %88'dir (Şekil-2A, 2B, Tablo-3).

Supraoptik çekirdekteki nesfatin-1 nöronlarının VGLUT3-pozitif aksonlarla apozisyonu değerlendirildiğinde, dişi hayvanlarda %53, erkek grubunda ise bu oran %66 olarak bulunmuştur (Şekil-3A, 3B, Tablo-4).



Şekil-1: Mikroskopik değerlendirme prosedürü. **(A)** Tez çalışmalarında incelenen supraoptik çekirdeğin beyin atlasına göre (101) hipotalamustaki lokalizasyonu. **(B)** SON'de akson sonlanmalarıyla teması olmayan nesfatin-1 nöronunun görüntüsü. **(C)** SON'de akson sonlanmalarıyla teması olan ve ikili işaretlenmiş olarak kabul edilen nesfatin-1 nöronunun görüntüsü.

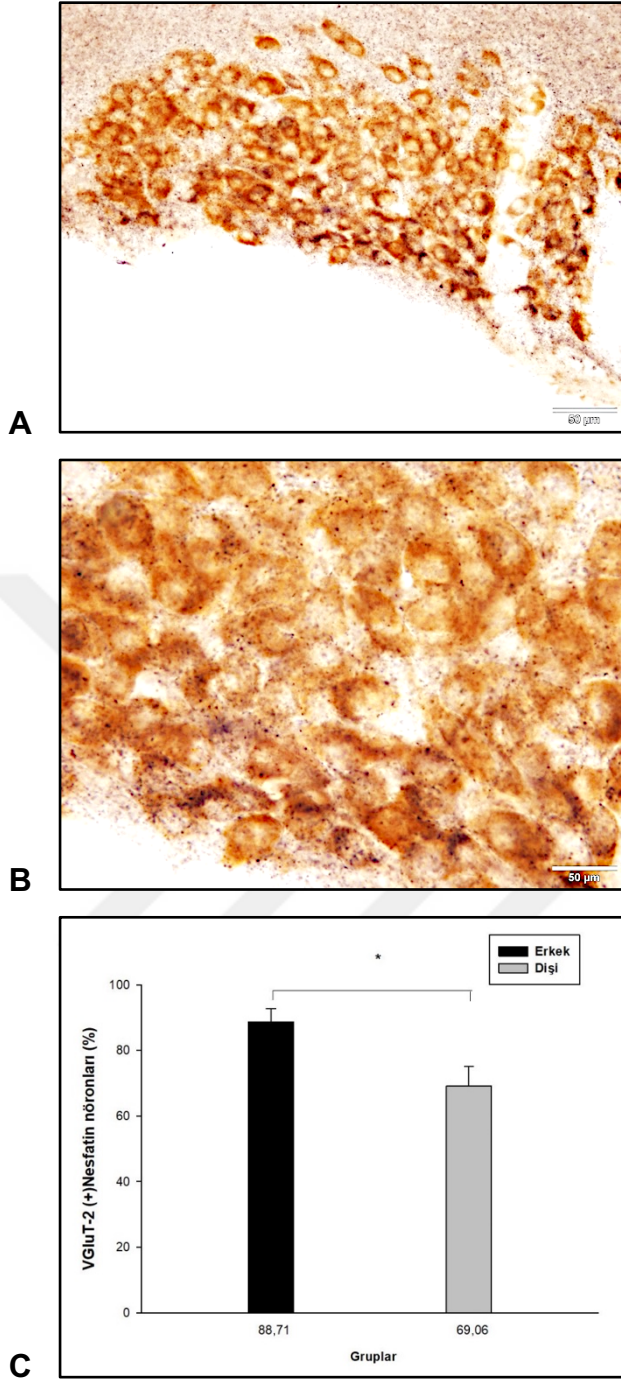
Glutamaterjik innervasyonda yer alan transporterlerin nesfatin-1 nöronlarıyla yaptıkları kontaklar erkek ve dişi grupları arasındaki fark anlamında istatistiki olarak değerlendirilmiştir. Buna göre erkek deneklerde VGLUT2 ile inerve olan nesfatin-1 nöron sayısının dişi deneklerdekine göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir ($p=0,027$, Şekil-2C). VGLUT3 ile apozisyon yapan nesfatin-1 nöronlarında da bu sayı erkek denekler için yüksek olarak bulunmuş ancak elde edilen veri istatistiki anlamlılığa erişmemiştir ($p=0,063$, Şekil-3C).

Veziküler GABA transporter belirteciyle Nesfatin-1 nöronlarının regülasyonunda GABAerjik sistemin rolünün belirlenmesi hedefine yönelik çalışmalarda, supraoptik çekirdekteki nesfatin-1 nöronlarının VGAT içeren aksonal sonlanmalarla temas edenlerinin oranı, dişi deneklerde %98, erkek deneklerde ise %97 olarak bulunmuştur (Şekil-4, Tablo-5).

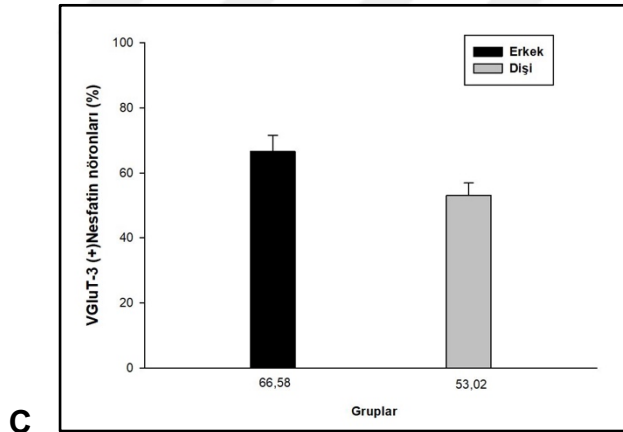
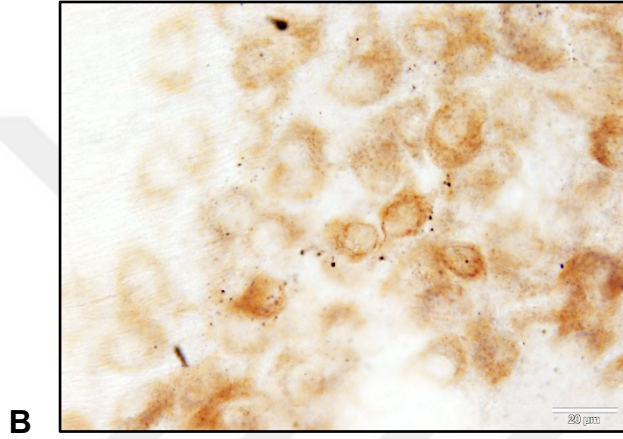
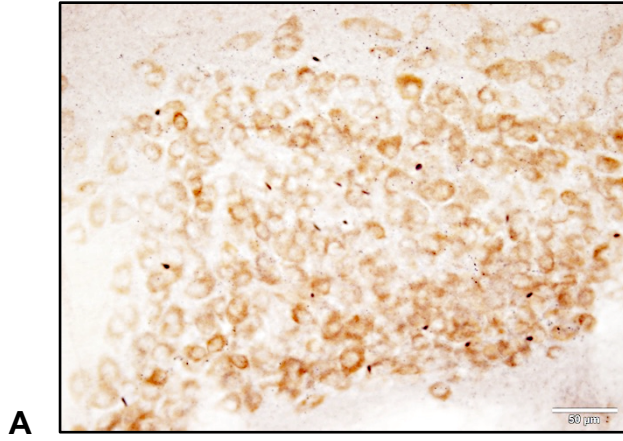
Veziküler Asetilkolin transporter belirteciyle Nesfatin-1 nöronlarının regülasyonunda kolinerjik sistemin rolünün belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda supraoptik çekirdekteki nesfatin-1 nöronlarının VACHT içeren son düğmeciklerle temasına hem dişi deneklerde hem de erkek deneklerde rastlanmamıştır (Şekil-5).

Tablo-3: Supraoptik çekirdekde lokalize olan ve VGLUT2-pozitif akson sonlanmaları ile temasta olan nesfatin-1 nöronları.

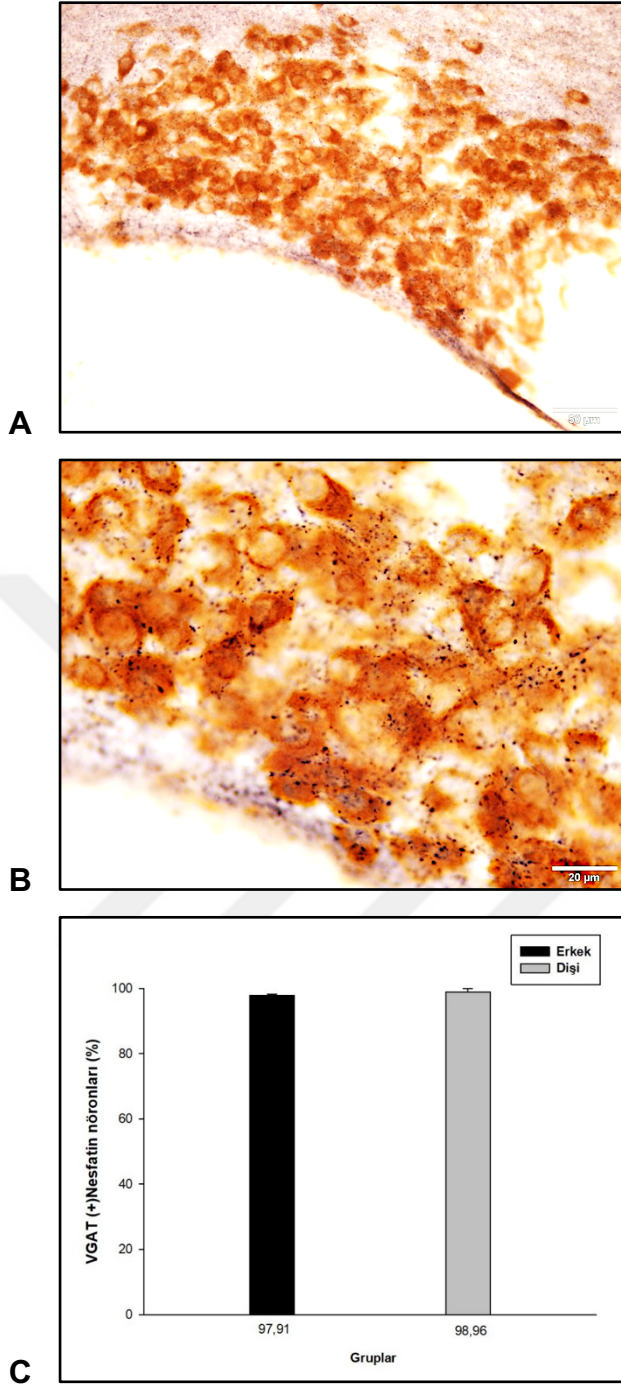
Cinsiyet	Nesfatin Nöronlarının Ortalama Sayıları	VGLUT2 sonlanması görülen Nesfatin Nöronlarının Ortalama Sayıları	VGLUT2 sonlanması görülen Nesfatin Nöronlarının Ortalama Yüzdeleri
ERKEK	1067,4±130,65	946±124,16	88,71±4,05
DİŞİ	960,2±160,80	697,6±157,59	69,05±6,06



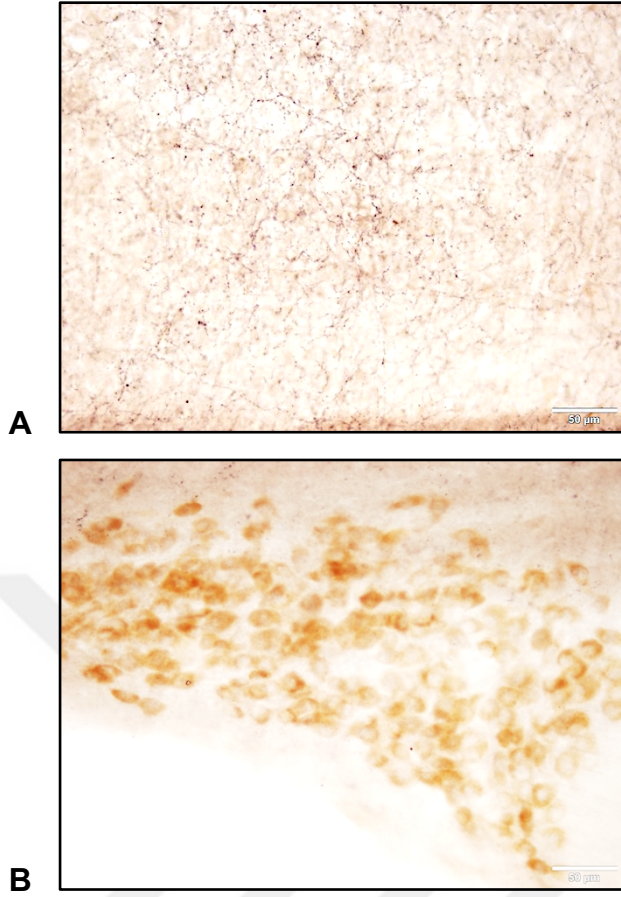
Şekil-2: Supraoptik çekirdekde lokalize olan Nesfatin-1 nöronları üzerinde VGLUT2-pozitif akson sonlanmaları. **(A)** x40 büyütme **(B)** x100 büyütme **(C)** VGLUT2 ile teması olan nesfatin-1 nöronlarına ait oranların grafiksel görünümü. Erkek ve dişi denekler arasındaki fark istatistikel olarak anlamlılık göstermiştir (* $p=0,027$).



Şekil-3: Supraoptik çekirdekte lokalize olan nesfatin-1 nöronları üzerinde VGLUT3-pozitif akson sonlanmaları. (A) x40 büyütme (B) x100 büyütme (C) VGLUT3 ile teması olan nesfatin-1 nöronlarına ait oranların grafiksel görünümü. Erkek ve dişi denekler arasındaki fark istatistikel olarak anlamlılık göstermemiştir ($p=0,063$).



Şekil-4: Supraoptik çekirdekte lokalize olan nesfatin-1 nöronları üzerinde VGAT-pozitif akson sonlanmaları. (A) x40 büyütme (B) x100 büyütme (C) VGAT ile teması olan nesfatin-1 nöronlarına ait oranların grafiksel görünümü. Erkek ve dişi denekler arasındaki fark istatistikel olarak anlamlılık göstermemiştir (* $p=0,125$).



Şekil-5: Supraoptik çekirdekte lokalize olan nesfatin-1 nöronları üzerinde VACHT-pozitif akson sonlanmaları. Nesfatin-1 nöronlarında kolinerjik inervasyon görülmemiştir. (A) VACHT-pozitif akson sonlanmalarının hipotalamusun diğer alanlarındaki lokalizasyonu (B) SON'de VACHT içeren aksonlarla teması olmayan nesfatin 1 nöronları

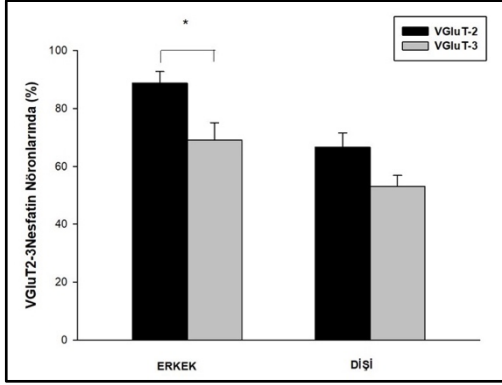
Tablo-4: Supraoptik çekirdekde lokalize olan ve VGLUT3-pozitif akson sonlanmaları ile temasta olan nesfatin-1 nöronları.

Cinsiyet	Nesfatin Nöronlarının Ortalama Sayıları	VGLUT3 sonlanması görülen Nesfatin Nöronlarının Ortalama Sayıları	VGLUT3 sonlanması görülen Nesfatin Nöronlarının Ortalama Yüzdeleri
ERKEK	1567,6±178,41	1036,02±137,34	66,58±4,96
DİŞİ	925,6±84,01	492,4±59,81	53,02±3,84

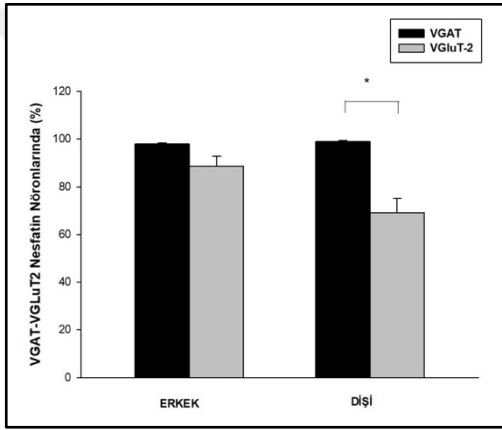
Tablo-5: Supraoptik çekirdekde lokalize olan ve VGAT-pozitif akson sonlanmaları ile temasta olan nesfatin-1 nöronları.

Cinsiyet	Nesfatin Nöronlarının Ortalama Sayıları	VGAT sonlanması görülen Nesfatin Nöronlarının Ortalama Sayıları	VGAT sonlanması görülen Nesfatin Nöronlarının Ortalama Yüzdeleri
ERKEK	1320,80±174,13	1293±170,31	97,91±0,42
DİŞİ	622,60±273,71	617,60±272,79	98,96±0,44

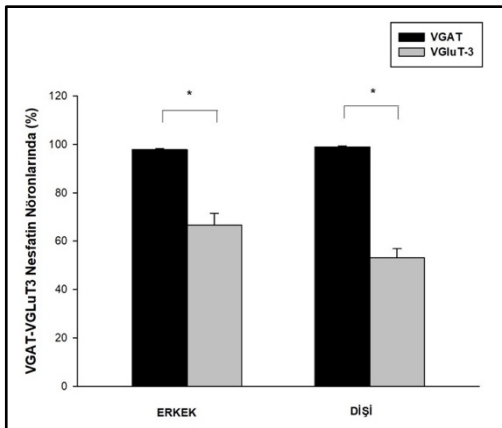
İlgili nörotransmitterlere ait veziküler taşıyıcı protein içeren sonlanmaların SON'de yerleşik nesfatin-1 nöronları üzerindeki apozisyon oranları farklı taşıyıcılar açısından karşılaştırıldığında, erkek deneklerin supraoptik çekirdeklerinde VGLuT2 içeren sonlanmalarla teması olan nesfatin-1 nöronlarının VGLuT3 içeren sonlanmalarla apozisyonu olan nöronlardan sayıca daha fazla oldukları ve bu nöronların oranlarındaki farkın istatistikel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p=0,009$, Şekil-6). Dişi deneklerde benzer farklılık görülsede bu veride istatikselsel olarak anlamlılık gözlenmemiştir ($p=0,062$, Şekil-6). Benzer karşılaştırma VGAT içeren veya VGLUT2 içeren aksonlarca teması olan nesfatin-1 nöronları açısından yapıldığında hem erkek deneklerde hem de dişi deneklerde istatistiki anlamlılık taşıyacak şekilde VGAT apozisyonunu lehine bir farkın olduğu saptanmıştır ($p=,001$, Şekil-7). VGLuT3 ve VGAT karşılaştırmasında ise dişi deneklerde istatistiki anlamlılık taşıyacak şekilde VGAT apozisyonunu lehine bir farkın olduğu ($p=001$), erkek deneklerde ise benzer farkın olduğu ancak istatistiki anlamlılık vermediği ($p=054$) anlaşılmıştır (Şekil-8).



Şekil-6: Erkek ve dişi deneklerde VGlut2 ve VGlut3 içeren sonlanmalarla temasta olan nesfatin-1 nöron yüzdelерinin karşılaştırılması, *p=0,009.



Şekil-7: Erkek ve dişi deneklerde VGlut2 ve VGAT içeren sonlanmalarla temasta olan nesfatin-1 nöron yüzdelерinin karşılaştırılması *p=0,001.



Şekil-8: Erkek ve dişi deneklerde VGlut3 ve VGAT içeren sonlanmalarla temasta olan nesfatin-1 nöron yüzdelерinin karşılaştırılması *p=0,001.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Yapılan son çalışmalarda arka beynin enerji balansını dengede tutan ve periferik metabolik sinyallerle hipotalamik yollar arasındaki dengeyi sağlamakta olduğu gösterilmiştir (10). Hipotalamik çekirdeklerden supraoptik çekirdek, paraventriküler çekirdek, periventriküler çekirdek (PeV), ventromedial çekirdek (VMN), dorsomedial çekirdek (DMN), arkuat çekirdek, lateral hipotalamik alan /perifornikal alan (PFA) ve ayrıca beyin sapındaki soliter traktusun çekirdekleri besin alımı ve enerji tüketiminde önemli rol oynamaktadırlar (13).

Besin alımı ve iştah kontrolünde rolü olduğu ilk kez Oh-I ve ark. Tarafından belirlenen(2) nesfatin-1 peptidinin öncü molekülü 82 amino asitten oluşan nükleobindin 2 (NUCB2) proteindir. NUCB2/nesfatin-1 korteks, PVN, zona postrema, vagus sinirinin dorsal motor çekirdeği ve beyincikte gözlemlenmiştir (2,3). NUCB2/nesfatin-1 reseptörleri henüz tanımlanmasa da hem MSS'de hem de periferik organlarda spesifik bağlanma bölgeleri tespit edilebilmiştir (5).

Nesfatin-1 nöronlarının yoğun olarak paraventriküler ve supraoptik çekirdek bölgesinde lokalize oldukları yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (19). Çalışmalarımızda incelenen nesfatin-1 nöronlarının supraoptik ve paraventriküler çekirdeklerin yanı sıra, literatürde de gösterildiği üzere (19,106), hipotalamusda yerleşik, arkuat, periventriküler çekirdeklerde ve lateral hipotalamik alanda lokalize olduğu belirlenmiştir. Tez çalışmamızda mikroskobik analizler sadece supraoptik çekirdekte yapılmıştır.

Nesfatin-1 nöronlarının eksitatör nörotransmitter olarak glutamaterjik agonistler ile aktive olduklarını (8), aynı zamanda glukokortikoid reseptörleri aracılığı ile periferik stres sinyallerini eksprese ederek strese karşı aktivasyon gösterdikleri (9) laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda belirlenmiş, bu aktivasyonda glutamaterjik sistemin rol aldığı anlaşılmıştır.

Glutamat hipotalamusta eksitatör etkileşimde önemli rol oynayan amino asit nörotransmitterdir. Elde edilen bulgular glutamat agonistlerinin

enjeksiyonu sonrasında c-Fos eksprese eden nesfatin-1 nöron sayısının arttığı, bu artışın glutamat agonistinin enjeksiyonu öncesi gerçekleştirilen özellikli antagonist uygulamasıyla baskılandığını vurgulamaktadır (8). Bu sonuçlar glutamaterjik sistemle nesfatin-1 nöronları arasındaki direkt etkileşimi göstermektedir. Dolayısıyla glutamat içeren akson sonlanmaları ile nesfatin-1 nöronları arasında sinaptik oluşum yaratabilecek temasların var olduğu düşünülebilir. Glutamat dışında literatürde nesfatin-1 nöronlarının regülasyonunda yer alan nörotransmitter sistemlerle ilgili bilgiye rastlanılmamıştır.

Tez çalışmamın sonuçları glutamaterjik nöronların nesfatin-1 nöronları üzerine sinaptik yapılar oluşturabilecek şekilde akson sonlanmaları gönderdiğini göstermiştir. Daha önceki bulgularımızı güçlendiren bu bulguya dayanarak nesfatin-1 nöronlarının glutamaterjik etki altında kontrol edildiği söylenebilir. Bu sonuç nesfatin-1 nöronlarında aktivasyonun direkt sinaptik ilişki ile glutamaterjik sistem tarafından tetiklendiğini göstermektedir. Aksonları nesfatin-1 nöronlarına ulaşan bu glutamaterjik nöronlarda glutamatın vezikül içerisine taşınmasında hem VGLUT' hem de VGLUT3'ün rol aldığı anlaşılmıştır.

Glutamaterjik sonlanma alan nesfatin-1 nöronlarının yüzde olarak erkek deneklerde daha fazla olması tez çalışmasının diğer önemli bir bulgusudur. Bu bulgu besin alımında nesfatin-1 nöronlarının rolünün cinsiyetler arası bir farklılık gösterebileceğini düşündürmektedir. Ancak bu verilerle daha net bir sonuca ulaşabilmek için ileri çalışmalara gerek vardır.

Çalışmamızın hedefindeki diğer nörotransmitter olan asetilkolinin vejetatif gangliyonlardaki sinaptik iletilerde rolü araştırılmış, nöromüsküler bağlantılarda bir mediator olduğu ve spinal kord nöronları üzerindeki uyarıcı etkisi gösterilmiştir (41-44). Asetilkolinin kolin asetil transferaz (ChAT) tarafından sentezlendiği ve veziküler asetilkolin taşıyıcısı (VACHT) ile sinaptik veziküllere yüklendiği daha önce yapılan çalışmalarda belirlenmiştir (46). Bazı çalışmalarda ChAT proteininin sitoplazmik olduğu gösterilse de birçoğunda sinaptik olduğu da bildirilmiştir (47). Asetilkolin sinaptik yarık içerisinde

dağılarak postsinaptik hücrelerde bulunan asetilkolin reseptörlerini (ACHR) aktive etmektedir (48).

Hipotalamusta kolinerjik akson sonlanmalarının varlığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (102). Çalışmamızda eksitator nörotransmitter olarak asetilkolin de akson sonlanmaları düzeyinde nesfatin-1 nöronları ile ilişkileri araştırılmıştır. Ancak tez çalışmamda incelediğim supraoptik çekirdekte yerleşik nesfatin-1 nöronlarının kolinerjik innervasyon almadıkları belirlenmiştir. Dolayısıyla çekirdekte eksitatuvar uyarının nesfatin-1 nöronlarına sadece glutamaterjik ileti ile ulaştırıldığı anlaşılmıştır. Ancak bu ilişkinin hipotalamusun diğer alanlarında yerleşik nesfatin-1 nöronlarında varlığı tez kapsamında araştırılmamıştır. Bu olasılığın değerlendirilmesi için ileri analizlere gerek vardır.

GABA, inhibitör etkiye sahip nörotransmitter olup, işlevi inhibe ettiği nöronlar tarafından belirlenmektedir. Yapılan çalışmalarda GABA'nın sinaptik veziküllerde birikmesine veziküler GABA taşıyıcısının (VGAT) aracılık ettiğini, aynı zamanda VGAT'ın beyin ve omuriliğin GABAerjik ve glisinerjik nöronlarının sinir uçlarında yoğunlaştığı gösterilmiştir (71).

Nesfatin-1 nöronları açlık durumunda inhibe olarak aktivasyonlarını yitiren nöronlardır. Periferden gelen açlık sinyallerinin bu nöronlara ulaşımında ve inhibisyonunda GABA nörotransmisyonunun etkisi olabilirliği hipotezini esas alarak çalışmamda GABA'erjik sonlanmaların nesfatin-1 düzeyinde varlığı da araştırılmıştır. Nöroendokrin etkileşimler üzerine yapılan araştırmalarda cinsiyete bağlı farklı sonuçlar elde edilen çalışmalara istinaden bu çalışmamızda hem erkek hem de dişi denekler kullanılmıştır (104).

Tez çalışmamın sonuçları SON'de yerleşik nesfatin-1 nöronlarının çok büyük bir kısmının GABAerjik innervasyon aldığını göstermiştir. Ayrıca yapılan incelemede her nesfatin-1 nöronu üzerinde çok sayıda VGAT içeren akson sonlanmalarına ait temas görülmüştür. Bu sonuç nesfatin-1 nöronlarının güçlü bir inhibitör kontrol altında olduklarını düşündürmektedir. Bulgularımız nesfatin-1 nöronlarında açlık durumunda görülen inaktivasyonda, diğer bir deyişle organizmanın besin alımına ihtiyacı olduğu ve dolayısıyla nesfatin-1 nöronlarındaki aktivasyonun baskılandığı durumlarda GABAerjik etkileşimin

anoreksijenik nesfatin-1 nöronlarının inervasyonunda devreye girebilecek ve bu inhibisyonda rol alabilecek özellikte olduğunu göstermiştir.

Tez çalışmamda veziküler nörotransmitter taşıyıcıları ilgili sisteme ait akson sonlanmalarının gösterilmesinde belirteç olarak kullanılmıştır (97,98,107-109). İmmünohistokimya boyamalarında bu proteinlerin marker olarak kullanılması ilgili nörona ulaşan nörotransmitter sistemleri hakkında bilgi vermektedir. Çoğunlukla terminal butonlar şeklinde boyanma gösteren bu sonlanmaların çalışmamızın ilgi konusu olan nesfatin-1 nöronları ile temas halinde gözlenmesi bu nöronlara innervasyon sağladıklarını düşündürmektedir. Ancak bu yaklaşımın bir kısıtlılığı yukarıda belirtilen ilişkinin sinaps oluşturup oluşturmadığını göstermemesidir. Bilindiği gibi ışık mikroskobunun büyütme gücü sinapsları ayırt edecek yeterlilikte değildir. Nesfatin-1 nöronlarıyla nörotransmitter uyarıyı getiren aksonlar arasında sinaptik bir oluşum ilişkisinin var olup olmadığı ancak elektron mikroskopik immünohistokimya ile gösterilebilir. Tez çalışmamda bu teknik kullanılmamıştır ancak yine de elde edilen bulgular böylesine bir sinaptik ilişkinin var olduğuna güçlü bir şekilde işaret etmektedir.

Sonuç olarak tez çalışmamın bulguları besin alımının baskılanmasında önemli bir rolü olan nesfatin-1 nöronlarının hem eksitator hem de inhibitör nörotransmitterlerin kontrolü altında olduğunu göstermiştir. Nesfatin-1 nöronlarının supraoptik çekirdekte glutamaterjik sonlanmalar aldığının belirlenmesi daha önceki çalışmalarımızda elde edilen sonuçları desteklemiş ve literatüre katkı sağlamıştır. Çalışmam kapsamında literatürde ilk kez olarak nesfatin-1 nöronlarının yoğun şekilde GABAerjik uyarı alabilir düzeneğe sahip olduğu gösterilmiş ve bu yönde yapılacak yeni çalışmalara zemin hazırlamıştır. Tez çalışmalarımın bulgularına dayanılarak nesfatin-1 nöronlarının aktivasyonunda glutamaterjik sistemin, inaktivasyonunda ise GABAerjik sistemin önemli rol oynadığı söylenebilir. İleri çalışmalarla bu ilişkinin daha detaylı olarak anlaşılması mümkün olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Franssen FM, Wouters EF, Baarends EM, Akkermans MA, Schols AM. Arm mechanical efficiency and arm exercise capacity are relatively preserved in chronic obstructive pulmonary disease. *Med Sci Sports Exerc.* 2002;34:1570-6.
2. Oh-I S, Shimizu H, Satoh T, et al. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature.* 2006;443:709-12.
3. Stengel A, Taché Y. Role of brain NUCB2/nesfatin-1 in the regulation of food intake. *Curr Pharm Des.* 2013;19:6955-9.
4. Levata L, Dore R, Jöhren, et al. Nesfatin-1 Acts Centrally to Induce Sympathetic Activation of Brown Adipose Tissue and Non-Shivering Thermogenesis. *Horm Metab Res.* 2019;51:678-85.
5. Shimizu H, Oh-I S, Hashimoto K, et al. Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: the leptin-independent mechanism. *Endocrinology.* 2009;150:662-71.
6. Brailoiu GC, Dun SL, Brailoiu E, et al. Nesfatin-1: distribution and interaction with a G protein-coupled receptor in the rat brain. *Endocrinology.* 2007;148:5088-94.
7. Brunner L, Nick HP, Cumin F, et al. Leptin is a physiologically important regulator of food intake. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1997;21:1152-60.
8. Yurtseven D, Minbay Z, Eyigör Ö. Besin alımının kontrolündeki anoreksijenik peptit: Nesfatin-1. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi,* 2018;44:135-42.
9. Ekizceli G, et al. Nesfatin-1 and neuronostatin neurons are co-expressed with glucocorticoid receptors in the hypothalamus. *Biotechnic & Histochemistry,* 2021; 96: 555-61.
10. Affinati A, Alison H, MYERS R, Martin G. Neuroendocrine control of body energy homeostasis. *Endotext* , 2021.
11. Ganapathy, Muthu K, Prasanna T. Anatomy, head and neck, pituitary gland. In: StatPearls. StatPearls Publishing. 2021.
12. Matsuda KI, Uchiyama K, Mori H, et al. Sexual behavior-associated c-Fos induction in the sagittalis nucleus of the hypothalamus in male rat. *Neurosci Lett.* 2017;661:104-7.
13. Grimmlikhuijzen J, Hauser F. The evolution of neuropeptide signaling. *Regul Pept.* 2012;177:6-9.
14. Finelli C, Martelli G, Rossano R, et al. Nesfatin-1: role as possible new anti-obesity treatment. *EXCLI J.* 2014;13:586-91.
15. Bystranowska D, Skorupska A, Sołtys K, et al. Nucleobindin-2 consists of two structural components: The Zn²⁺-sensitive N-terminal half, consisting of nesfatin-1 and -2, and the Ca²⁺-sensitive C-terminal half, consisting of nesfatin-3. *Comput Struct Biotechnol J.* 2021;19:4300-18.
16. Stengel A, Goebel M, Yakubov I, et al. Identification and characterization of nesfatin-1 immunoreactivity in endocrine cell types of the rat gastric oxyntic mucosa. *Endocrinology.* 2009;150:232-8.

17. García-Galiano D, Pineda R, Ilhan T, et al. Cellular distribution, regulated expression, and functional role of the anorexigenic peptide, NUCB2/nesfatin-1, in the testis. *Endocrinology*. 2012;153(4):1959-71.
18. Goebel-Stengel M, Stengel A. Role of Brain NUCB2/nesfatin-1 in the Stress-induced Modulation of Gastrointestinal Functions. *Curr Neuropharmacol*. 2016;14:882-91.
19. Kohno D, Nakata M, Maejima Y, et al. Nesfatin-1 neurons in paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus coexpress oxytocin and vasopressin and are activated by refeeding. *Endocrinology*. 2008;149:1295-301.
20. Shimizu H, Ohsaki A, Oh-I S, Okada S, Mori M. A new anorexigenic protein, nesfatin-1. *Peptides*. 2009;30:995-8.
21. Ogiso K, Asakawa A, Amitani H, et al. Plasma nesfatin-1 concentrations in restricting-type anorexia nervosa. *Peptides*. 2011;32:150-3.
22. Konno N. Nesfatin-1. In: *Handbook of Hormones*. Academic Press, 2021: 69-171.
23. Price CJ, Hoyda TD, Samson WK, Ferguson AV. Nesfatin-1 influences the excitability of paraventricular nucleus neurones. *J Neuroendocrinol*. 2008;20:245-50.
24. Kim J, Yang H. Nesfatin-1 as a new potent regulator in reproductive system. *Dev Reprod*. 2012;16:253-64.
25. Gotoh K, Masaki T, Chiba S, et al. Nesfatin-1, corticotropin-releasing hormone, thyrotropin-releasing hormone, and neuronal histamine interact in the hypothalamus to regulate feeding behavior. *J Neurochem*. 2013;124:90-9.
26. Hyman SE. Neurotransmitters. *Curr Biol*. 2005;15:154-8.
27. Trento MMS, Moré AOO, Duarte ECW, Martins DF. Peripheral receptors and neuromediators involved in the antihyperalgesic effects of acupuncture: a state-of-the-art review. *Pflugers Arch*. 2021;473:573-93.
28. Alcedo J, Prahlad V. Neuromodulators: an essential part of survival. *J Neurogenet*. 2020;34:475-81.
29. Argiolas A, Melis MR. Neuropeptides and central control of sexual behaviour from the past to the present: *Prog Neurobiol*. 2013;108:80-107.
30. Hnasko TS, Hjelmstad GO, Fields HL, Edwards RH. Ventral tegmental area glutamate neurons: electrophysiological properties and projections. *J Neurosci*. 2012;32:15076-85.
31. Deshpande SA, Freyberg Z, Lawal HO, Krantz DE. Vesicular neurotransmitter transporters in *Drosophila melanogaster*. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2020;1862:183308.
32. Blakely RD, Edwards RH. Vesicular and plasma membrane transporters for neurotransmitters. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4:a005595.
33. Südhof TC. Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron*. 2013;80:675-90.
34. Rizo J. Mechanism of neurotransmitter release coming into focus. *Protein Sci*. 2018;27:1364-91.
35. Edwards RH. The neurotransmitter cycle and quantal size. *Neuron*. 2007;55:835-58.

36. Fei H, Grygoruk A, Brooks ES, Chen A, Krantz DE. Trafficking of vesicular neurotransmitter transporters. *Traffic*. 2008;9:1425-36.
37. Jahn R, Fasshauer D. Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature*. 2012;490:201-7.
38. Guillot TS, Miller GW. Protective actions of the vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) in monoaminergic neurons. *Mol Neurobiol*. 2009;39:149-70.
39. Daniels RW, Collins CA, Gelfand MV, et al. Increased expression of the *Drosophila* vesicular glutamate transporter leads to excess glutamate release and a compensatory decrease in quantal content. *J Neurosci*. 2004;24:10466-74.
40. Aguilar JI, Dunn M, Mingote S, et al. Neuronal Depolarization Drives Increased Dopamine Synaptic Vesicle Loading via VGLUT. *Neuron*. 2017;95:1074-88.
41. Brown DA. Muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) in the nervous system: some functions and mechanisms. *J Mol Neurosci*. 2010;41:340-6.
42. Tansey EM. Henry Dale and the discovery of acetylcholine. *C R Biol*. 2006;329:419-25.
43. Dupont JC. Some historical difficulties of the cholinergic transmission. *C R Biol*. 2006;329:426-36.
44. Asahina M. Pure autonomic failure and acetylcholine: historical and current aspects. *Brain Nerv*. 2014;66:539-50.
45. Mautner HG. Choline acetyltransferase. *CRC Crit Rev Biochem*. 1977;4:341-70.
46. Prado VF, Roy A, Kolisnyk B, Gros R, Prado MA. Regulation of cholinergic activity by the vesicular acetylcholine transporter. *Biochem J*. 2013;450:265-74.
47. Elwary SM, Chavan B, Schallreuter KU. The vesicular acetylcholine transporter is present in melanocytes and keratinocytes in the human epidermis. *J Invest Dermatol*. 2006;126:1879-84.
48. Alvarez-Suarez P, Nowak N, Protasiuk-Filipunas A, et al. Regulates Acetylcholine Receptor Clustering and Organization of Microtubules at the Postsynaptic Machinery. *Int J Mol Sci*. 2021;22:9387.
49. Alfonso A, Grundahl K, Duerr JS, Han HP, Rand JB. The *Caenorhabditis elegans* unc-17 gene: a putative vesicular acetylcholine transporter. *Science*. 1993;261:617-19.
50. Mathews EA, Mullen GP, Hodgkin J, Duerr JS, Rand JB. Genetic interactions between UNC-17/VACHT and a novel transmembrane protein in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 2012;192:1315-25.
51. Lickteig KM, Duerr JS, Frisby DL, et al. Regulation of neurotransmitter vesicles by the homeodomain protein UNC-4 and its transcriptional corepressor UNC-37/groucho in *Caenorhabditis elegans* cholinergic motor neurons. *J Neurosci*. 2001;21:2001-14.
52. Petroff OA. GABA and glutamate in the human brain. *Neuroscientist*. 2002;8:562-73.
53. Miller MW. GABA as a Neurotransmitter in Gastropod Molluscs. *Biol Bull*. 2019;236:144-56.

54. Roth FC, Draguhn A. GABA metabolism and transport: effects on synaptic efficacy. *Neural Plast.* 2012;2012:805830.
55. Tritsch NX, Granger AJ, Sabatini BL. Mechanisms and functions of GABA co-release. *Nat Rev Neurosci.* 2016;17:139-45.
56. Hijaz F, Killiny N. Exogenous GABA is quickly metabolized to succinic acid and fed into the plant TCA cycle. *Plant Signal Behav.* 2019;14:e1573096.
57. Kuriyama K. Cerebral GABA receptors. *Alcohol and Alcoholism.* 2nd edition. Oxford: Oxfordshire; 1994; 181-186.
58. Burt DR. Reducing GABA receptors. *Life Sci.* 2003;73:1741-58.
59. WISDEN, W.; YU, X.; FRANKS, N. P. GABA receptors and the pharmacology of sleep. In: *Sleep-wake neurobiology and pharmacology.* Springer:Cham, 2017. 279-304.
60. Volk DW, Lewis DA. Impaired prefrontal inhibition in schizophrenia: relevance for cognitive dysfunction. *Physiol Behav.* 2002;77:501-5.
61. Glausier JR, Lewis DA. Mapping pathologic circuitry in schizophrenia. *Handb Clin Neurol.* 2018;150:389-417.
62. Gittis AH, Kreitzer AC. Striatal microcircuitry and movement disorders. *Trends Neurosci.* 2012;35:557-64.
63. Shi Y, Wang M, Mi D, et al. Mouse and human share conserved transcriptional programs for interneuron development. *Science.* 2021;374:eabj6641.
64. Kuwana S, Okada Y, Sugawara Y, Obata K. Role of GABA in central respiratory control studied in mice lacking GABA-synthesizing enzyme 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Adv Exp Med Biol.* 2004;551:157-63.
65. Janczewski WA, Tashima A, Hsu P, Cui Y, Feldman JL. Role of inhibition in respiratory pattern generation. *J Neurosci.* 2013;33:5454-65.
66. Vedyasova OA, Kovaleva TE. Role of GABAA Receptors of Parafacial Respiratory Group in Control of Respiration in Rats. *Bull Exp Biol Med.* 2018;165:711-4.
67. Christenson J, Bongianini F, Grillner S, Hökfelt T. Putative GABAergic input to axons of spinal interneurons and primary sensory neurons in the lamprey spinal cord as shown by intracellular Lucifer yellow and GABA immunohistochemistry. *Brain Res.* 1991;538:313-8.
68. Herlenius E, Lagercrantz H. Development of neurotransmitter systems during critical periods. *Exp Neurol.* 2004;190:8-21.
69. Gifford JJ, Norton SA, Kusnecov AW, Wagner GC. Valproic acid induces nuclear factor erythroid 2-related factor 2 expression in fetal and neonatal brains but not in adult brain: evidence of the gamma-aminobutyric acid-shift hypothesis. *Neuroreport.* 2020;31:433-6.
70. McIntire SL, Reimer RJ, Schuske K, Edwards RH, Jorgensen EM. Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature.* 1997;389:870-6.
71. Juge N, Omote H, Moriyama Y. Vesicular GABA transporter (VGAT) transports β -alanine. *J Neurochem.* 2013;127:482-6.
72. Boulland JL, Ferhat L, Solbu TT, et al. Changes in vesicular transporters for gamma-aminobutyric acid and glutamate reveal vulnerability and reorganization of hippocampal neurons following pilocarpine-induced seizures. *J Comp Neurol.* 2007;503:466-85.

73. Münster-Wandowski A, Gómez-Lira G, Gutiérrez R. Mixed neurotransmission in the hippocampal mossy fibers. *Front Cell Neurosci.* 2013;7:210.
74. Galván EJ, Gutiérrez R. Target-Dependent Compartmentalization of the Corelease of Glutamate and GABA from the Mossy Fibers. *J Neurosci.* 2017;37:701-14.
75. Billwiller F, Castillo L, Elseedy H, et al. GABA-glutamate supramammillary neurons control theta and gamma oscillations in the dentate gyrus during paradoxical (REM) sleep. *Brain Struct Funct.* 2020;225:2643-68.
76. Yamada MH, Nishikawa K, Kubo K, Yanagawa Y, Saito S. Impaired glycinergic synaptic transmission and enhanced inflammatory pain in mice with reduced expression of vesicular GABA transporter (VGAT). *Mol Pharmacol.* 2012;81:610-9.
77. Kakizaki T, Oriuchi N, Yanagawa Y. GAD65/GAD67 double knockout mice exhibit intermediate severity in both cleft palate and omphalocele compared with GAD67 knockout and VGAT knockout mice. *Neuroscience.* 2015;288:86-93.
78. Brosnan JT, Brosnan ME. Glutamate: a truly functional amino acid. *Amino Acids.* 2013;45:413-8.
79. Meldrum BS, Akbar MT, Chapman AG. Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy. *Epilepsy Res.* 1999;36:189-204.
80. Egbenya DL, Aidoo E, Kyei G. Glutamate receptors in brain development. *Childs Nerv Syst.* 2021;37:2753-8.
81. Roux C, Aligny C, Lesueur C, et al. NMDA receptor blockade in the developing cortex induces autophagy-mediated death of immature cortical GABAergic interneurons: An ex vivo and in vivo study in Gad67-GFP mice. *Exp Neurol.* 2015;267:177-193.
82. Bak LK, Schousboe A, Waagepetersen HS. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem.* 2006;98:641-53.
83. Iovino L, Tremblay ME, Civiero L. Glutamate-induced excitotoxicity in Parkinson's disease: The role of glial cells. *J Pharmacol Sci.* 2020;144:151-64.
84. Lau A, Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *J Pflugers Arch.* 2010;460:525-42.
85. Piccirillo S, Magi S, Preziuso A, et al. Gateways for Glutamate Neuroprotection in Parkinson's Disease (PD): Essential Role of EAAT3 and NCX1 Revealed in an In Vitro Model of PD. *Cells.* 2020;9:2037.
86. Ip IB, Berrington A, Hess AT, et al. Combined fMRI-MRS acquires simultaneous glutamate and BOLD-fMRI signals in the human brain. *Neuroimage.* 2017;155:113-9.
87. Ueda T. Vesicular Glutamate Uptake. *Adv Neurobiol.* 2016;13:173-221.
88. Rossi ML, Rubbini G, Martini M, Canella R, Fesce R. Pre- and Postsynaptic Effects of Glutamate in the Frog Labyrinth. *Neuroscience.* 2018;385:198-214.

89. Westergaard N, Sonnewald U, Schousboe A. Metabolic trafficking between neurons and astrocytes: the glutamate/glutamine cycle revisited. *Dev Neurosci*. 1995;17:203-11.
90. Schousboe A. Metabolic signaling in the brain and the role of astrocytes in control of glutamate and GABA neurotransmission. *Neurosci Lett*. 2019;689:11-3.
91. Gamberino WC, Berkich DA, Lynch CJ, Xu B, LaNoue KF. Role of pyruvate carboxylase in facilitation of synthesis of glutamate and glutamine in cultured astrocytes. *J Neurochem*. 1997;69:2312-25.
92. Polletta L, Vernucci E, Carnevale I, et al. SIRT5 regulation of ammonia-induced autophagy and mitophagy. *Autophagy*. 2015;11:253-70.
93. Takamori S. VGLUTs: 'exciting' times for glutamatergic research?. *Neurosci Res*. 2006;55:343-51.
94. Maycox PR, Deckwerth T, Hell JW, Jahn R. Glutamate uptake by brain synaptic vesicles. Energy dependence of transport and functional reconstitution in proteoliposomes. *J Biol Chem*. 1988;263:15423-8.
95. Fei H, Krantz D. Vesicular neurotransmitter transporters. In *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Neural Signaling Mechanisms*. Springer-Verlag: New York, NY, USA ; 2009. 87-137.
96. Kaneko T, Fujiyama F. Complementary distribution of vesicular glutamate transporters in the central nervous system. *Neurosci Res*. 2002;42:243-50.
97. Preobraschenski J, Cheret C, Ganzella M, et al. Dual and Direction-Selective Mechanisms of Phosphate Transport by the Vesicular Glutamate Transporter. *Cell Rep*. 2018;23:535-45.
98. Cheret C, Ganzella M, Preobraschenski J, Jahn R, Ahnert-Hilger G. Vesicular Glutamate Transporters (SLCA17 A6, 7, 8) Control Synaptic Phosphate Levels. *Cell Rep*. 2021;34:108623.
99. Juge N, Gray JA, Omote H, et al. Metabolic control of vesicular glutamate transport and release. *Neuron*. 2010;68:99-112.
100. Reimer RJ, Fon EA, Edwards RH. Vesicular neurotransmitter transport and the presynaptic regulation of quantal size. *Curr Opin Neurobiol*. 1998;8:405-12.
101. Paxinos G, Watson C (eds). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 6th edition. Cambridge:Acad Press; 2006.
102. Balkan B, Pogun S. Nicotinic Cholinergic System in the Hypothalamus Modulates the Activity of the Hypothalamic Neuropeptides During the Stress Response. *Curr Neuropharmacol*. 2018;16:371-87.
103. Juge N, Omote H, Moriyama Y. Vesicular GABA transporter (VGAT) transports β -alanine. *J Neurochem*. 2013;127:482-6.
104. Sakuma Y. Gonadal steroid action and brain sex differentiation in the rat. *J Neuroendocrinol*. 2009;21:410-14.
105. Cheret C, Ganzella M, Preobraschenski J, Jahn R, Ahnert-Hilger G. Vesicular Glutamate Transporters (SLCA17 A6, 7, 8) Control Synaptic Phosphate Levels. *Cell Rep*. 2021;34:108623.
106. Scharner S, Prinz P, Goebel-Stengel M, et al. Activity-based anorexia activates nesfatin-1 immunoreactive neurons in distinct brain nuclei of female rats. *Brain Res*. 2017;1677:33-46.

107. Eriksen J, Li F, Edwards RH. The mechanism and regulation of vesicular glutamate transport: Coordination with the synaptic vesicle cycle. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2020;1862:183259.
108. Hrabovszky E, Deli L, Turi GF, Kalló I, Liposits Z. Glutamatergic innervation of the hypothalamic median eminence and posterior pituitary of the rat. *Neuroscience.* 2007;144:1383-92.
109. Hrabovszky E, Csapó AK, Kalló I, et al. Localization and osmotic regulation of vesicular glutamate transporter-2 in magnocellular neurons of the rat hypothalamus. *Neurochem Int.* 2006;48:753-61.



TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca akademik tecrübesiyle yol gösteren, bilgisiyle her zaman destek olan, eğitimimin her aşamasında zamanını ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Özhan Eyigor'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim sürecinde her konuda desteğinin gördüğüm, tecrübe ve bilgisinden yararlandığım, kullandığı her bir cümlesinin hayatıma kattığı değerini asla unutmayacağım, hoşgörüsü ve anlayışıyla daim yanımda olan, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Semiha Ersoy'a tüm kalbimle teşekkür ederim.

Uzmanlık ve ÜYTE eğitimim süresince bilgisini, tecrübesini ve desteğini hiç esirgemeyen Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi aynı zamanda Tüp bebek Ünitesi laboratuvar sorumlusu Sayın Prof. Dr. Berrin Avcı'ya saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübesiyle destek olan güler yüzü ve anlayışıyla beni motive eden değerli hocam Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Zehra Minbay'a çok teşekkür ederim.

Eğitimim sürecinde bilgi ve deneyimlerini cömertçe paylaşan değerli hocalarım Prof. Dr. İlkin Çavuşoğlu, Prof. Dr. Zeynep Kahveci ve Doktor Öğretim Üyesi Dr. Duygu Gök Yurtseven'e saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

ÜYTE eğitimim boyunca yardımlarını ve bilgisini esirgemeyen ihtiyacım olan her konuda yardımlarıyla destek olan Uzman Dr. Cihan Çakır'a, Araş. Grv. Göktan Kuşpınar'a, Biyolog İlknur Yavaş'a sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca tecrübesi ve yardımlarıyla daim yanımda olan arkadaşım Araş. Grv. Nursel Hasanoğlu'na, ihtiyacım olduğunda yardımlarını hiç esirgemeyen Uzman Biyolog Ayşe Akbaş'a, Araş.Grv. Dr.

Doruk Bařar'a, Doktora Öğrencisi Gonca Topal'a ve Uludağ Üniversitesi Tıp Fakóltesi Histoloji ve Embriyoloji Dalı'ndaki asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

ÜYTE eğitimim süresince verdikleri emekten dolayı Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakóltesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Üremeye Yardımcı Tedavi Merkez Sorumlusu Prof. Dr. Gürkan Uncu'ya, Doç. Dr. Işıl Kasapoğlu'na, Doç. Dr. Kiper Aslan'a ve tüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımı "TTU-2021-376" nolu proje kapsamında destekleyen Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna teşekkür ederim.

Hayatım boyunca maddi manevi her konuda yanımda olan aileme, eşim Orhan Valiyev'e, varlıklarıyla beni motive eden hayat sevincimin kaynakları oğlum Ayhan Valiyev'e ve kızım Hatice Valiyeva'ya sevgi dolu teşekkürlerimi sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

_____ yılında _____ doğmuştur. İlk, orta ve lise öğrenimini Nerimanov adına 3 sayılı Barda şehir Tam Orta Okulunda almıştır. 1998 yılında Azerbaycan Tıp Üniversitesi Pediatriye Fakültesini kazanmış, 2004 yılında mezun olmuştur. 2004-2005 yıllarında Azerbaycan Respublikası Qara Qarayev adına Çocuk hastalıkları Enstitüsünde çocuk hastalıkları üzerine ihtisaslaşmıştır. 2005-2015 yılları arasında 13 sayılı çocuk polikliniğinde uzman doktor olarak çalışmıştır. 2019 yılında Tıpta Uzmanlık eğitimini almak için Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD'da araştırma görevlisi doktor olarak işe başlamıştır.

Araş. Gör. Dr. Aynura AGHAYEVA