NURSEL HASANOĞLU AKBULUT

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI DOKTORA TEZİ

2023

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

ÜRİDİN VE ÜRİDİN NÜKLEOTİDLERİNİN NÖROENDOKRİN NÖRONLAR ÜZERİNDEKİ AKTİVE EDİCİ ETKİLERİNİN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK ARAŞTIRILMASI

NURSEL HASANOĞLU AKBULUT

(DOKTORA TEZİ)

BURSA-2023

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

ÜRİDİN VE ÜRİDİN NÜKLEOTİDLERİNİN NÖROENDOKRİN NÖRONLAR ÜZERİNDEKİ AKTİVE EDİCİ ETKİLERİNİN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK ARAŞTIRILMASI

Nursel HASANOĞLU AKBULUT

(DOKTORA TEZİ)

DANIŞMAN:
Prof.Dr. Özhan EYİGÖR

TOA-2021-684- Bursa Uludağ Üniversitesi BAP

BURSA-2023

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum "**Üridin ve üridin nükleotidlerinin nöroendokrin nöronlar üzerindeki aktive edici etkilerinin immünohistokimyasal olarak araştırılması**" adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Nursel HASANOĞLU AKBULUT

05.12.2023

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

05/12/2023

Adı Soyadı: Nursel HASANOĞLU AKBULUT
Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji
Tez Konusu: Üridin ve Üridin Nükleotidlerinin Nöroendokrin Nöronlar Üzerindeki Aktive Edici Etkilerinin İmmünohistokimyasal Olarak Araştırılması

ÖZELLİKLER	**UYGUNDUR**	**UYGUN DEĞİLDİR**	**AÇIKLAMA**
Tezin Boyutları	■	❑	
Dış Kapak Sayfası	■	❑	
İç Kapak Sayfası	■	❑	
Kabul Onay Sayfası	■	❑	
Sayfa Düzeni	■	❑	
İçindekiler Sayfası	■	❑	
Yazı Karakteri	■	❑	
Satır Aralıkları	■	❑	
Başlıklar	■	❑	
Sayfa Numaraları	■	❑	
Eklerin Yerleştirilmesi	■	❑	
Tabloların Yerleştirilmesi	■	❑	
Kaynaklar	■	❑	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. Özhan EYİGÖR

İmza:

İÇİNDEKİLER

Dış Kapak
İç Kapak
ETİK BEYANI II
KABUL ONAY III
TEZ KONTROL VE BEYAN FORMU IV
İÇİNDEKİLER V
TÜRKÇE ÖZET VIII
İNGİLİZCE ÖZET IX
TEZ KONUSUNUN KÜRESEL SÜRDÜRÜLEBİLİR KALKINMA HEDEFLERİ İLE İLİŞKİSİ X
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 6
2.1. Hipotalamus 6
2.1.1 Supraoptik Çekirdek (SON) 8
2.1.2. Paraventriküler Çekirdek (PVN) 10
2.3. Hipofiz Bezi 11
2.3.1. Hipofiz Bezinin Yapısı 12
2.3.2. Nörohipofiz 13
2.4. Oksitosin ve Vazopressin Molekülleri 14
2.5. Vazopressin-Oksitosin Sentez ve Salgılanması 14
2.6. Vazopressin Sistemi 16
2.6.1 Vazopressin Reseptörleri 17
2.6.2. Vazopressinin İşlevleri 19
2.7. Oksitosin Sistemi 20
2.7.1. Oksitosin Reseptörü 22
2.7.2. Oksitosinin İşlevleri 23
2.8. Nesfatin-1 27
2.8.1. Nesfatin-1'in Keşfi ve Yapısı 27
2.8.2. Nesfatin-1 Ekspresyonu 28
2.8.3. Nesfatin-1'in İşlevleri 30
2.9. Nükleotidler 31
2.10. Üridin 33
2.10.1. Üridin Biyosentezi ve Katabolizma Yolu 34
2.10.2. Üridinin Biyosentez Mekanizması 34
2.10.3. Üridin Katabolizması 35
2.10.4. Üridin Konsantrasyonunu Düzenlenme Mekanizması 35
2.10.4.1. Beslenme Davranışında Plazma Üridin Konsantrasyonu 35
2.10.4.2. Yağ Dokusu ve Plazma Üridin 36
2.10.4.3. ATP Tükenmesi ve Üridin Konsantrasyonu 37
2.10.5. Üridinin Taşınması 37
2.10.6. Merkezi Sinir Sisteminde Üridin 38
2.11. P2Y Reseptörleri 41
2.11.1. P2Y reseptör alt tipleri 41
2.11.1.1. $P2Y_1$ Reseptör 42
2.11.1.2. $P2Y_2$ Reseptör 44
2.11.1.3. $P2Y_4$ Reseptör 44

2.11.1.4. $P2Y_6$ Reseptör 45
2.11.1.5. $P2Y_{11}$ Reseptör 46
2.11.1.6. $P2Y_{12}$ Reseptör 47
2.11.1.7. $P2Y_{13}$ Reseptör 47
2.11.1.8. $P2Y_{14}$ Reseptör 48
2.12. Nöronal Aktivasyon 50
3. GEREÇ VE YÖNTEM 53
3.1 Deney Hayvanları 53
3.2. İntraserebroventriküler Kanül Yerleşimi 53
3.3. Deney Grupları 53
3.3.1. Özgün Hedef 1- Merkezi yolla uygulanan üridin ve üridin nükleotidlerinin vazopressin, oksitosin, nesfatin-1 nöronları üzerindeki aktive edici etkisinin belirlenmesi 54
3.3.2. Özgün Hedef 2- Merkezi yolla uygulanan üridin ve üridin nükleotidlerinin vazopressin, oksitosin, nesfatin-1 nöronlar üzerindeki aktive edici etkisini P2Y reseptörler üzerinden gerçekleştirdiğinin gösterilmesi 54
3.3.3. Özgün Hedef 3- Vazopressin, Oksitosin ve Nesfatin-1 Nöronlarında P2Y Reseptörlerinin Varlığının Belirlenmesi 55
3.4. İntraserebroventriküler Uygulama 55
3.5. Çalışmada Kullanılan Doku, Teknik ve Antikorlar ile İlgili Genel Bilgiler 56
3.5.1. Perfüzyon Fiksasyon ile Dokuların Eldesi 56
3.5.2. İntraserebroventriküler Kanül Lokalizasyonunun Doğrulanması 57
3.5.3. İmmünohistokimyasal Yöntemlerde Uygulanan Genel Kurallar 58
3.5.4. Nesfatin-1, Oksitosin ve Vazopressin Nöronlarında Ortaya Çıkan Nöronal Aktivasyonun Belirlenmesi 59
3.5.4.1. Nesfatin-1/Vazopressin/Oksitosin ve c-Fos İkili İmmünohistokimyasal İşaretleme Yöntemi 59
3.5.4.2. Nesfatin-1, Oksitosin ve Vazopressin Nöronlarında $P2Y_2$ Reseptör Protein Ekspresyonun Gösterilmesi 60
3.6. Preparatların İncelenmesi ve Hücre Sayımı 61
3.7. İstatistiksel Analiz 62
4. BULGULAR 63
4.1. İntraserebroventriküler Kanül Yerleşiminin Doğrulanması 63
4.2. Nesfatin-1, Oksitosin ve Vazopresssin Nöronlarında İmmünohistokimyasal İşaretlemelerin Değerlendirilmesi 63
4.3. Üridin, Üridin Nükleotidleri ve Reseptör Antagonistlerinin Nesfatin-1 Nöronlarına Etkisinin Araştırılması 65
4.3.1. Üridin ve Üridin Nükleotidlerinin Supraoptik Çekirdekte Yerleşik Nesfatin-1 Nöronlarının Aktivasyonuna Etkisinin Araştırılması 65
4.3.2. Üridin ve Üridin Nükleotidlerinin Paraventriküler Çekirdekte Yerleşik Nesfatin-1 Nöronlarının Aktivasyonuna Etkisinin Araştırılması 67
4.3.3. Üridin ve Üridin Nükleotidlerinin Periventriküler Çekirdekte Yerleşik Nesfatin-1 Nöronlarının Aktivasyonuna Etkisinin Araştırılması 69
4.3.4. $P2Y_2$ Reseptör Antagonisti AR-C 118925XX Ön-uygulamasının, Üridin Nükleotidi UTP'nin SON, PVN ve PeV'de Yerleşik Nesfatin-1 Nöronlarının Aktivasyonuna Etkisini Baskılamasının Araştırılması 71

4.3.5. $P2Y_6$ Reseptör Antagonisti MRS2578 Ön-uygulamasının, Üridin Nükleotidi UDP'nin SON, PVN ve PeV'de Yerleşik Nesfatin-1 Nöronlarının Aktivasyonuna Etkisini Baskılamasının Araştırılması 73
4.3.6. $P2Y_{14}$ Reseptör Antagonisti PPTN hidroklorür Ön-uygulamasının, Üridin Nükleotidi UDP'nin SON, PVN ve PeV'de Yerleşik Nesfatin-1 Nöronlarının Aktivasyonuna Etkisini Baskılamasının Araştırılması 75
4.4. Üridin, Üridin Nükleotidleri ve Reseptör Antagonistlerinin Vazopressin Nöronlarına Etkisinin Araştırılması..... 78
4.4.1. Üridin ve Üridin Nükleotidlerinin Supraoptik Çekirdekteki Vazopressin Nöronlarının Aktivasyonuna Etkisinin Araştırılması 78
4.4.2. Üridin ve Üridin Nükleotidlerinin Paraventriküler Çekirdekteki Vazopressin Nöronlarının Aktivasyonuna Etkisinin Araştırılması 80
4.4.3. $P2Y_2$ Reseptör Antagonisti AR-C 118925XX Ön-uygulamasının, Üridin Nükleotidi UTP'nin Supraoptik ve Paraventriküler Çekirdeklerde Vazopressin Nöronlarının Aktivasyonuna Etkisini Baskılamasının Araştırılması 82
4.4.4. $P2Y_6$ Reseptör Antagonisti MRS2578 Ön-uygulamasının, Üridin Nükleotidi UDP'nin Supraoptik ve Paraventriküler Çekirdeklerde Vazopressin Nöronları Aktivasyonuna Etkisini Baskılamasının Araştırılması 85
4.4.5. $P2Y_{14}$ Reseptör Antagonisti PPTN hidroklorür Ön-uygulamasının, Üridin Nükleotidi UDP'nin Supraoptik ve Paraventriküler Çekirdeklerde Vazopressin Nöronları Aktivasyonuna Etkisini Baskılamasının Araştırılması 88
4.5. Üridin, Üridin Nükleotidleri ve Reseptör Antagonistlerinin Oksitosin Nöronlarına Etkisinin Araştırılması..... 90
4.5.1. Üridin, Üridin Nükleotidlerinin Supraoptik Çekirdekte Oksitosin Nöronlarının Aktivasyonuna Etkisinin Araştırılması..... 90
4.5.2. Üridin ve Üridin Nükleotidlerinin Paraventriküler Çekirdekteki Oksitosin Nöronlarının Aktivasyonuna Etkisinin Araştırılması 92
4.5.3. $P2Y_2$ Reseptör Antagonisti AR-C 118925XX Ön-uygulamasının, Üridin Nükleotidi UTP'nin Supraoptik ve Paraventriküler Çekirdeklerde Oksitosin Nöronları Aktivasyonuna Etkisini Baskılamasının Araştırılması 94
4.5.4. $P2Y_6$ Reseptör Antagositi MRS2578 Ön-uygulamasının, Üridin Nükleotidi UDP'nin Supraoptik ve Paraventriküler Çekirdeklerde Oksitosin Nöronları Aktivasyonuna Etkisini Baskılamasının Araştırılması 97
4.5.5. $P2Y_{14}$ Reseptör Antagonisti PPTN hidroklorür Ön-uygulamasının, Üridin Nükleotidi UDP'nin Supraoptik ve Paraventriküler Çekirdeklerde Oksitosin Nöronları Aktivasyonuna Etkisini Baskılamasının Araştırılması 100
4.6. Nesfatin-1, Vazopressin ve Oksitosin Nöronlarında $P2Y_2$ Reseptör Ekspresyonunun Araştırılması 106
4.6.1. Nesfatin-1 Nöronlarında $P2Y_2$ Reseptör Ekspresyonunun Araştırılması 106
4.6.2. Vazopressin Nöronlarında $P2Y_2$ Reseptör Ekspresyonunun Araştırılması..... 108
4.6.3. Oksitosin Nöronlarında $P2Y_2$ Reseptör Ekspresyonunun Araştırılması..... 110
5. TARTIŞMA VE SONUÇ..... 112
6. KAYNAKLAR..... 125
7. SİMGELER VE KISALTMALAR..... 161
8. EKLER..... 163
9. TEŞEKKÜR..... 164
10. ÖZGEÇMİŞ..... 165

TÜRKÇE ÖZET

Tez çalışmasında intraserebroventriküler (i.s.v.) yolla uygulanan üridin ve üridin nükleotidleri olan üridin monofosfat (UMP), üridin difosfat (UDP), üridin trifosfat (UTP)'ın vazopressin, oksitosin ve nesfatin-1 nöronları üzerindeki aktive edici etkilerinin araştırılması ve bu etkide reseptör antagonistlerinin olası baskılayıcı rolünün değerlendirilmesi amaçlandı. Bu amaçla çalışmada 4-6 aylık Sprague Dawley cinsi erkek sıçanlar etken madde ve antagonist uygulamaları için 8 gruba ayrıldı (n=5/grup). Deney hayvanlarına salin (5 mikrolitre), üridin (1µmol), UMP (1µmol), UDP (1µmol), UTP (1µmol) i.s.v olarak uygulandı. Antagonist gruplarda UTP için $P2Y_2$ reseptör antagonist (AR-C118925XX-0,1µmol) UDP için hem $P2Y_6$ reseptör antagonisti (MRS2578-1µmol) ve hem $P2Y_{14}$ reseptör antagonisti (PPTN hidroklorür-1µmol) i.s.v. olarak etken maddelerin verilmesinden 15 dk önce uygulandı. Son enjeksiyonu takip eden 90. dakika sonunda perfüzyonla fikse edilen dokulardan alınan yüzen kesitlerde ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi kullanılarak vazopressin, oksitosin ve nesfatin-1 nöronlarında c-Fos işaretlemeleri yapıldı. Sonuçlar, ikili işaretlenen (aktive olan) nöron yüzdesi olarak değerlendirildi. Merkezi yolla uygulanan üridin, UMP ve UTP'nin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, supraoptik (SON), paraventriküler (PVN) ve periventriküler (PeV) çekirdeklerde istatistiki olarak anlamlı sayıda nesfatin-1 nöronunu aktive ettiği belirlendi. Benzer olarak SON ve PVN'de oksitosin nöronlarındaki aktivasyon artışı üridin, UMP ve UTP uygulanmasında anlamlı bulundu. Üridin ve nükleotidlerinin vazopressin nöronlarında aktive edici etkisi incelendiğinde hem SON hem de PVN'de UMP ve UTP'nin vazopressin nöronlarını salin grubuna göre anlamlı olarak aktive ettiği belirlendi. Tüm nöron gruplarında en yüksek aktivasyon artışı gösteren UTP'nin etkisi, $P2Y_2$ reseptör antagonist ön uygulanmasıyla baskılandığı gösterildi. İkili immünofloresans boyama ile tüm nöron tipinde $P2Y_2$ varlığı belirlendi. Sonuç olarak UTP'nin vazopressin, oksitosin ve nesfatin-1 nöronlarında lokalize $P2Y_2$ reseptörüne bağlanarak nöronları aktive ediyor olabileceğini düşündürdü.

Anahtar sözcükler: Üridin, Üridin nükleotidleri, P2Y reseptörleri, İmmünohistokimya, Nöronal Aktivasyon

İNGİLİZCE ÖZET

IMMUNOHISTOCHEMICAL INVESTIGATION OF THE ACTIVATION EFFECTS OF URIDINE AND ITS NUCLEOTIDES ON NEUROENDOCRINE NEURONS

The aim of the thesis study is to assess the effects of intracerebroventricularly (i.c.v.) adminestered uridine and uridine nucleotides including uridine monophosphate (UMP), uridine diphosphate (UDP) and uridine triphosphate (UTP) on the activation of vasopressin, oxytocin or nesfatin-1 neurons and to investigate the possible supressive effects of receptor antagonists on this activation. For this purpose, 4-6- month-old male Sprague Dawley rats were divided into 8 groups for active ingredient and antagonist applications (n=5/group). Saline (5 µl), uridine (1µmol), UMP (1µmol), UDP (1µmol), UTP (1µmol) were administered (i.c.v) to the experimental animals. In the antagonist groups, P2Y2 receptor antagonist (AR-C118925XX, 0.1µmol) for UTP, P2Y6 receptor antagonist (MRS2578, 1µmol) for UDP and P2Y14 receptor antagonist (PPTN hydrochloride, 1µmol) were administered i.c.v. Antagonists were applied 15 minutes before the injection of active ingredients. At the end of the 90th minute following the last injection aimals were sacrified by perfusion-fixation and using the double indirect immunoperoxidase method on floating sections, c-Fos labeling was performed with vasopressin or oxytocin or nesfatin-1 labeling. The results were evaluated as the percentage of double labeled (activated) neurons. It was determined that centrally administered uridine, UMP and UTP caused activation in statistically significant number of nesfatin-1 neurons in the supraoptic (SON), paraventricular (PVN) and periventricular (PeV) nuclei when compared to the saline group. Similarly, the increase in activation of oxytocin neurons in the SON and PVN was found to be significant in the application of uridine, UMP and UTP. When the effects of uridine and its nucleotides on the activation of vasopressin neurons was examined, it was determined that UMP and UTP activated vasopressin neurons significantly in both SON and PVN when compared to the saline group. It was shown that the effect of UTP, which showed the highest increase in the number of activated neurons in all three neuron phenotypes, was suppressed by the pre-application of P2Y2 receptor antagonist. The presence of P2Y2 receptor expression was determined in all neuron types by double immunofluorescence staining. As a result, it was suggested that UTP may activate neurons by binding to the P2Y2 receptor localized in vasopressin, oxytocin and nesfatin-1 neurons.

Key words: Uridine, Uridine nucleotides, P2Y receptors, Immunohistochemistry, Neuronal Activation

BUÜ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ KONUSUNUN KÜRESEL SÜRDÜRÜLEBİLİR KALKINMA HEDEFLERİ İLE İLİŞKİSİ



Doktora tezi olarak sunduğum **"Üridin ve üridin nükleotidlerinin nöroendokrin nöronlar üzerindeki aktive edici etkilerinin immünohistokimyasal olarak araştırılması"** başlıklı tez **3.** Küresel Sürdürülebilir Kalkınma Hedefi ile ilişkilidir.

1. GİRİŞ

Beyinde endokrin sistemi koordine eden bölge olan hipotalamus, su-besin alımı, biyolojik sirkadiyen ritim, vücut ısısı, kan basıncı, emzirme, öğrenme ve hafıza, cinsel aktivite, duygusal ifade ve otonom sinir sistemi kontrolü dahil olmak üzere bir dizi fizyolojik süreci düzenleme amacıyla beyne ve vücudun diğer bölgelerine doğrudan sinyaller gönderir. Ek olarak, vücudun temel işlevlerini yerine getirmek için hipofiz gibi çeşitli hedef organları üzerinde etkili olan hormonlar üretir. Oksitosin (OT) ve vazopressin (VP), hipotalamusta supraoptik (SON) ve paraventriküler (PVN) çekirdeklerde yerleşik magnoselüler nöronlarda sentezlenen ve nörohipofizden sistemik dolaşıma verilen hormonlardır. Bu hormonların memelilerde birçok periferik ve merkezi fonksiyonlarda rolü tanımlanmıştır (Makarenko, Ugrumov, Derer, & Calas, 2000).

Magnosellüler nöronlarda sentezlenen vazopressin, kan osmolalitesini, hacmini ve basıncını kontrol ederek sıvı homeostazını düzenlemesine aracılık eder. Ayrıca PVN'de yerleşik parvoselüler nöronlar tarafından da vazopressin eksprese edildiği gösterilmiştir. Vazopressin eksprese eden bu nöronların, kortikotropin salgılatıcı faktör (CRF) de sentezledikleri ve adenohipofizdeki kortikotroplardan adrenokortikotropik hormon (ACTH) sekresyonunu uyardıkları bildirilmiştir (Fellmann ark., 1984; Itoi ve ark, 2014; Mouri ve ark., 1993). Ek olarak PVN'de yerleşik vazopressin eksprese eden ayrı bir parvoselüler nöron grubunun, fizyolojik düzenlemenin yanı sıra sosyal ve diğer motive edici davranışları modüle etmek için merkezi olarak beyin bölgelerine projeksiyonlar yaptığı da araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (Buijs, & Swaab, 1979; Rigney, De Vries, Petrulis, & Young, 2022; Rigney, Vries, & Petrulis, 2023).

Uzun yıllardan beri SON ve PVN'de yerleşik magnoselüler nöronlar tarafından salgılanan oksitosinin doğumda uterus miyometriyal kasılmasına neden olduğu ve ayrıca meme bezlerindeki miyoepitelyal hücrelerin kasılmasını sağlayarak süt ejeksiyonunu kontrol ettiği bilinmektedir (Leng, Pineda, Sabatier, & Ludwig, 2015). Son yıllarda yapılan çalışmalar, magnoselüler oksitosin nöronlarının, reseptörünün bulunduğu ön beyin bölgelerine projeksiyonlar yaparak korku, kaygı ve koku ile ilgili davranışları module ettiğini ortaya koymuştur (Jurek, & Neumann, 2018; Knobloch ve ark., 2012; Oettl ve ark., 2016). Ek olarak PVN bölgesinde

yerleşik magnoselüler nöronların prososyal davranışları düzeltmek için arka beyin bölgesinde ventral tegmental alana projeksiyon yaptığı gösterilmiştir (Hung ve ark., 2017).

PVN'de magnosellüler OT nöronlarından başka parvoselüler oksitosin nöronları da tanımlanmış ve bu nöron grubunun gıda alımı, solunum, ereksiyon ve çiftleşme, kardiyovasküler reaksiyonlar, mide refleksleri ve ağrı algısı gibi işlevleri düzenlemek için projeksiyonlarını omurilik ve birkaç beyin sapı çekirdeğine yaptığı gösterilmiştir (Sawchenko, & Swanson, 1982; Wang ve ark., 2022). Parvoselüler nöronların, PVN-SON bağlantıları yoluyla magnoselüler nöronların aktivitesini düzenlediği kanıtlanmıştır (Eliava ark., 2016). Bu nöronların sıçan beynindeki toplam sayının yaklaşık %1'ini (70-200 hücre) oluşturduğu tahmin edilmektedir (Althammer, & Grinevich, 2018).

Hipotalamus, salgılanan bazı moleküller aracılığıyla beslenme davranışının düzenlenmesinden sorumludur. 2006 yılında NUCB2'de kodlanan 82 amino asitlik bir peptit olan nesfatin-1 keşfedilmiştir (Oh-I ve ark., 2006). Yapılan bu çalışma ile intraserebroventriküler (i.s.v) nesfatin-1 uygulamasının besin alımı ve vücut ağırlık artışını azalttığı gösterilmiştir (Oh-I ve ark., 2006). Nesfatin-1'in bu anoreksijenik özelliği, enerji homeostazisinin düzenlenmesinde rol oynadığını göstermektedir. Sıçan hipotalamusunda nesfatin-1 ekspresyonu öncelikle PVN, SON, arkuat çekirdek (ARC), dorsomedial hipotalamus (DMH) ve lateral hipotalamusta (LHA) bulunmuştur (Shimizu, Oh-I, Okada, & Mori, 2009b; Stengel, Goebel, Wang, & Tache, 2010). PVN'deki nesfatin-1-pozitif nöronların yaklaşık %24'ünün oksitosin, %18'inin vazopressin eksprese ettiği, SON'deki nesfatin-1 eksprese eden nöronların %35'inin oksitosin ve %28'inin vazopressin için de pozitif olduğu bildirilmiştir (Kohno ve ark., 2008).

Nesfatin-1'in kandan beyne orta düzeyde, doğrusal bir akışı bildirmiştir (Price, Samson, Niehoff, & Banks, 2007). Bu aynı zamanda periferik nesfatin-1'in kan-beyin bariyerini (KBB) geçerek merkezi sinir sistemine erişebileceği ve böylece belirli fizyolojik süreçleri etkileyebileceği anlamına da gelmektedir. Nesfatin-1'in periferik olarak mide mukozası, bağırsak ve adipositlerde, pankreas ve testislerde ekspresyonu tespit edilmiştir (García-Galino, Navarro, Gaytan, & Tena-Sempere,

2010a; Goebel-Stengel, & Wang, 2013; Gonzales, Tiwari, & Unniappan, 2009; Price ve ark., 2007; Stengel ve ark., 2009b; Stengel, & Tache, 2010).

Nesfatin-1'in sadece beslenme davranışını değil aynı zamanda i.s.v. verildiğinde su alımını azalttığı ve bu etkiye melanocortin 3/4 reseptör (MC3/4) ve oksitosin reseptörlerinin aracılık yaptığı gösterilmiştir (Yosten, & Samson, 2009). Bunlara ek olarak nesfatin-1'in gastrointestinal fizyoloji, glikoz homeostazı, enerji düzenlenmesi, anksiyete, depresyon, kardiyovasküler sistem, üreme gibi fizyolojik işlevlerin düzenlenmesi ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur (Aydin ve ark., 2011; Dore, Levata, Lehnert, & Schulz, 2017; Könczöl ve ark., 2010; Ogiso ve ark., 2011; Schalla, & Stengel, 2018).

Nesfatin-1'in çeşitli biyolojik etkileri ve endojen NUCB2/nesfatin-1'in dokularda ekspresyonu üzerine artan literatürün aksine, bu etkilere aracılık eden reseptör/reseptörler hakkındaki bilgiler hala yetersizdir.

Üridin bir pirimidin nükleozididir. Yapısına fosfat gruplarının eklenmesiyle üridin monofosfat (UMP), üridin difosfat (UDP), üridin trifosfat (UTP) gibi nükleotid formlarına dönüşür. Nükleotidler, metabolik düzenlemeyi içeren çeşitli hücresel süreçlerde merkezi bir rol oynamaktadırlar (Zhang, Guo, Xie, & Fang, 2020). Üridin nükleotidlerinin metabolizması, glutamin aminoasiti ile başlayan "de novo" sentez yolağı ve nükleozid öncülü ile başlayan kurtarma sentez yolağı ile düzenlenir (Yamamoto ve ark., 2011). Karaciğer ve yağ dokuda sentezlenen üridin kan ile taşınarak beyne geçer. Bu kan-beyin bariyerinde taşınma iki farklı taşıyıcı protein ailesi olan konsantre edici nükleozid taşıyıcısı (concentrative nucleoside transporter-CNT) ve dengeleyici nükleozid taşıyıcısı (equilibrative nucleoside transporter-ENT) ile gerçekleşir (Redzic ve ark., 2005). Daha önce yapılan çalışmalarda, dışarıdan verilen üridinin beyinde üridin seviyelerinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (Cansev ark., 2005; Peters ve ark., 1987). Beyin hücrelerine alınan pirimidin nükleozidlerinin fosfolipid sentezi gibi önemli beyin fonksiyonlarına aracılık etmesinin yanı sıra beyinde pirimidin nükleotidlerine duyarlı P2Y reseptörlerinin keşfi ve pirimidin nükleotidlerinin kültür ortamında glial hücreler tarafından salgılanmasının ortaya koyulması, pirimidin nükleotidlerinin de ATP gibi ekstrasellüler sinyal molekülleri olabileceğini düşündürmüştür (Cansev ve ark., 2015).

Üridin nükleotidleri metabotropik P2Y reseptörleri için ligandlardır. UTP'nin $P2Y_2$, $P2Y_4$ üzerinden, UDP'nin ise $P2Y_6$ ve $P2Y_{14}$ reseptörleri üzerinden aktivasyon sağladığı bildirilmiştir. $P2Y_2$, $P2Y_4$ ve $P2Y_6$ reseptörlerinin UTP ve UDP tarafından uyarılması ile fosfolipaz C (PCL) aktivasyonunu takiben hücre içi Ca^{2+} salınımını indükleyen ve protein kinaz C'yi (PKC) aktive eden ikincil haberciler, inositol 1,4,5-trisfosfat (IP3) ve diaçilgliserol (DAG) oluşturmaktadırlar (Abbracchio ve ark., 2006; Erb, Liao, Seye, & Weissman, 2006). Üridin ve UMP'nin henüz tanımlanmış reseptörleri bulunmamaktadır. Ancak sistemik olarak uygulanan üridin'in UTP sentez ve salıverilmesini artırarak beyinde $P2Y_2$ reseptörleri aracılığıyla kolinerjik nörotransmisyonun uyarıldığı gösterilmiştir (Cansev ve ark., 2015).

Yapılan bir çalışmada, posterior hipotalamusun tuberomammiller çekirdeğinde bulunan histaminerjik nöronların UTP tarafından aktive edildiği gösterilmiştir (Sergeeva ve ark., 2006). Merkezi P2Y reseptörlerinin endokrin ve metabolik düzenlemede oynadıkları role ilişkin yakın zamanlı iki çalışma göze çarpmaktadır. Bu çalışmalardan birinde, obezite oluşturulan deney hayvanlarında kandaki üridin konsantrasyonlarının yüksek olmasına bağlı olarak hipotalamik UDP miktarının arttığı, merkezi yolla uygulanan UDP'nin $P2Y_6$ reseptörleri aracılığıyla oreksijenik AgRP (agouti-ilişkili peptit) nöronlarını uyararak besin alımını teşvik ettiği ve bu etkinin farmakolojik veya genetik inhibisyon ile ortadan kalktığı gösterilmiştir (Steculorum ve ark., 2015). Aynı grubun takip eden bir diğer çalışmasında ise, obesitede $P2Y_6$ reseptör delesyonunun vücut yağ kütlesini azaltarak insülin duyarlılığını artırdığı ve bu etkinin AgRP nöronlarına spesifik olduğu bildirilmiştir (Steculorum ve ark., 2017). Bu çalışmaların haricinde de literatürde merkezi yolla uygulanan üridin ve üridin nükleotidlerinin hipotalamik nöronlar üzerine etkisi bilinmemektedir.

Doktora tez çalışması kapsamında, 'Üridin ve üridin nükleotidleri (UMP, UDP, UTP), hipotalamik çekirdeklerde yerleşik nöronları aktive edebilir ve etkisini P2Y reseptörlerine bağlanarak gösterir' hipotezi test edilmiştir. Bu hipotez doğrultusunda merkezi yolla verilen üridin ve üridin nükleotidlerinin, oksitosinerjik, vasopressinerjik ve nesfatinerjik nöronlar üzerindeki aktive edici etkilerinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda belirlenen özgün hedefler aşağıdaki gibidir.

Özgün Hedef 1: Merkezi yolla uygulanan üridin ve üridin nükleotidlerinin vazopressin, oksitosin, nesfatin-1 nöronlar üzerindeki aktive edici etkisinin belirlenmesi: Bu hedefe yönelik çalışmada intraserebroventriküler yolla uygulanan üridin, UMP, UDP ve UTP'nin vazopressin, oksitosin ve nesfatin-1 nöronları üzerindeki aktive edici etkileri, ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi kullanılarak c-Fos immünoreaktivesinin varlığının gösterilmesi ile belirlendi.

Özgün Hedef 2: Merkezi yolla uygulanan üridin ve üridin nükleotidlerinin vazopressin, oksitosin, nesfatin-1 nöronlar üzerindeki aktive edici etkisini P2Y reseptörler üzerinden gerçekleştirdiğinin gösterilmesi: Hedefe yönelik olarak, UTP için $P2Y_2$ reseptör antagonisti (AR-C118925XX), UDP için $P2Y_6$ reseptör antagonisti (MRS2578) ve $P2Y_{14}$ reseptör antagonisti (PPTN hidroklorür) i.s.v olarak uygulandı. Reseptör antagonistinin vazopressin, oksitosin ve nesfatin-1 nöronlarında agonist etkisiyle görülen aktivasyonu olası baskılayıcı rolü c-Fos immünoreaktivesinin varlığı ile ikili immünohistokimya yöntemi kullanılarak belirlendi.

Özgün Hedef 3: P2Y reseptör antagonistleri ile nöronal aktivasyonu baskılanan vazopressin, oksitosin ve nesfatin-1 nöronlarında P2Y reseptörlerinin varlığının belirlenmesi: Hedefe yönelik olarak UTP nükleotidinin bağlandığı $P2Y_2$ reseptörünün, vazopressin, oksitosin ve nesfatin-1 nöronlarında ekspresyonunu değerlendirmek amacıyla ikili immünfloresan yöntem ile işaretlemeler yapıldı.

Tez kapsamında gerçekleştirilen amaca yönelik çalışmaların sonuçları fizyolojik ve farmakolojik ileri çalışmaların planlanmasında referans niteliğinde olabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hipotalamus

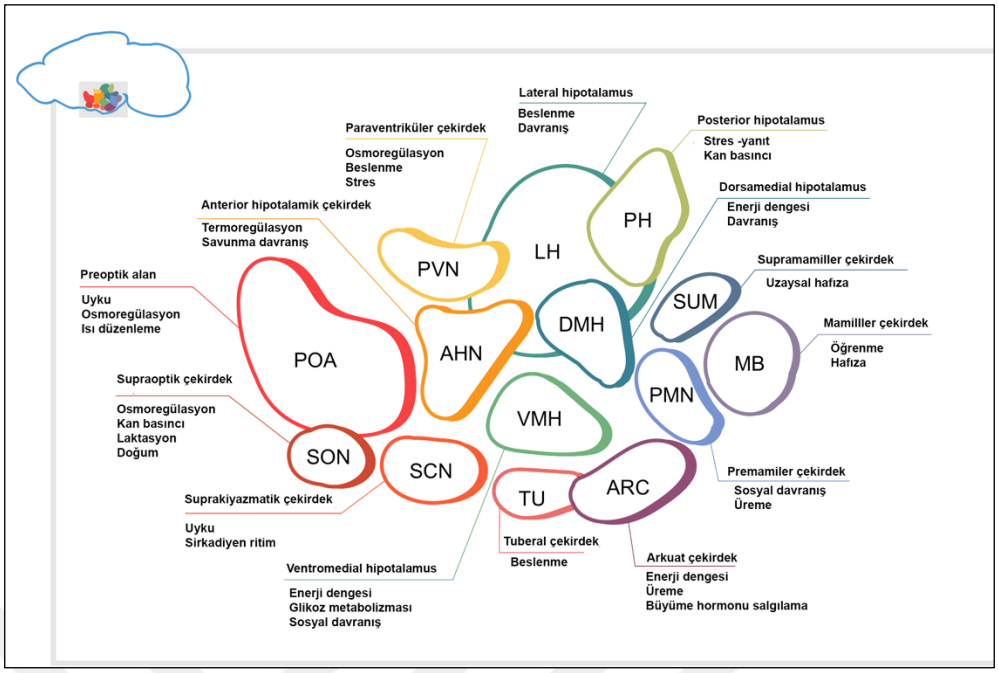
Memeli beyninin bölümü olan hipotalamus, organizmanın homeostazı için gerekli olan çok çeşitli işlev ile ilişkilidir (Paxinos, 2015). Kardiyovasküler sistemin, iç organların, cinsel davranışların, yiyecek ve su alımının ve vücut ısısının düzenlenmesinde rol oynar (Paxinos, 2015). Kısacası, bir organizmanın hayatta kalması için gerekli olan kritik fizyolojik süreçleri kontrol eder. Bunun yanı sıra endokrin sistem ve otonom sinir sisteminin de en önemli düzenleyicilerinden biridir. Diensefalondaki konumundan dolayı, hipofiz bezinden hormonların salınmasını doğrudan kontrol eder ve ayrıca merkezi sinir sisteminin diğer bölümleriyle, otonom sinir sistemindeki yanıtları etkilemesine ve bütünleştirmesine izin veren yaygın bağlantılara sahiptir (Harris, 1951). Hipotalamus, beynin geri kalanıyla olan nöral bağlantılarının karmaşıklığı nedeniyle, fonksiyonel rolünün anlaşılması için günümüzde halen yoğun araştırma konusudur.

Hipotalamus anatomik olarak, rostralde optik kiazma, kaudalde mamillar cisimler, lateralde optik traktuslar ve dorsalde talamus tarafından sınırlandırılır. Hipotalamus beyinden aşağı doğru, onu hipofiz bezine bağlayan infundibular sap olarak bilinen bir sapa doğru uzanır. Bilateral yerleşik çekirdek topluluklarını içeren hipotalamus, mediolateral olarak periventrikular bölge, medial bölge ve lateral bölgelerden, kraniokaudal yönde ise, preoptik alan, anterior alan, intermediate (tüberal) ve posterior (mamiller) alanlardan oluşmaktadır (Paxinos, 2015) (Tablo 1). Bu bölgelerde gri maddeye gömülmüş çekirdeklerin yanı sıra çoklu lif yolları ve aksonal bağlantılar bulunmaktadır. Periventriküler bölge üçüncü ventrikül duvarında bulunur. Nöroendokrin nöron grupları içerir ve hipofiz bezini düzenleme işlevi görür (Sutin, 1966). Bu bölgenin lateralinde bulunan medial bölge, rostral-kaudal yönde iyi tanımlanmış birkaç çekirdekten oluşur. Bu bölge karmaşıktır ve çiftleşme, savunma ve beslenme gibi davranışların modülasyonunda görev alır (Swanson, 2000). Hipotalamusun lateral bölgesi, medial ön beyin demetinden ve demet boyunca yaygın olarak dağılmış nöronlardan oluşur. Rolü henüz tam olarak açıklığa kavuşturulmamıştır, ancak duyusal bilgilerin işlenmesinde ve saldırganlık, üreme ve

yiyecek-su alımı ile ilgili davranışsal tepkilere katılma işlevi gördüğü gösterilmiştir (Kruk, 1991; Swanson, & Mogenson, 1981). (Şekil 1)

Tablo 1. Hipotalamusun şematik organizasyonu.

		Mediolateral		
Kraniokaudal		Periventrikular Bölge	Medial Bölge	Lateral Bölge
	Preoptik Alan	•Terminal tabakası •Lamina terminalis'in vasküler organı(OV) • Medyan preoptik çekirdek(MEPO) • Subfornikal organ (SFO) • Anteroventral periventriküler çekirdek (AVPV) • Suprakiazmatik preoptik çekirdek (PSCH) • Periventriküler çekirdek (PeV), ön kısım • Anteroventral preoptik çekirdek (AVP) • Anterodorsal preoptik çekirdek (ADP) • Medial preoptik alan (MPO) • Posterodorsal preoptik çekirdek (PD) • Ventrolateral preoptik çekirdek (VLP)	Medial preoptik çekirdek (MPN)	Lateral preoptik alan (LPO)
	Anterior Alan	• Suprakiazmatik çekirdek (SCN) • Subparaventriküler bölge (SBPV) • Paraventriküler çekirdek (PVN) • Anterior hipotalamik alan (AHA) • Supraoptik çekirdek (SON)	•Anterior hipotalamik çekirdek (AHN)	•Lateral hipotalamik alan (LHA)
	İntermediyet (tüberal) Alan	•Arkuat çekirdek (ARC) •Tuberal periventriküler çekirdek (PEL)	•Ventromedial hipotalamik çekirdek (VMH) •Dorsomedial hipotalamik çekirdek (DMH) •Tuberal alan (TA)	•Lateral hipotalamik alan (LHA) •Tuberal çekirdek (TU)
	Posterior (mamiller) Alan	•Periventriküler hipotalamik çekirdek arka kısım (PVp) • Posterior hipotalamik çekirdek (PH)	•Ventral premamiller çekirdek (PMv) •Dorsal premamiller çekirdek (PMd) •Mamiller cisim (MBO)	•Lateral hipotalamik alan (LHA)



Şekil 1. Hipotalamik çekirdeklerin şeması ve fonksiyonları (Hajdarovic, Yu, & Webb, 2000 uyarlanmıştır).

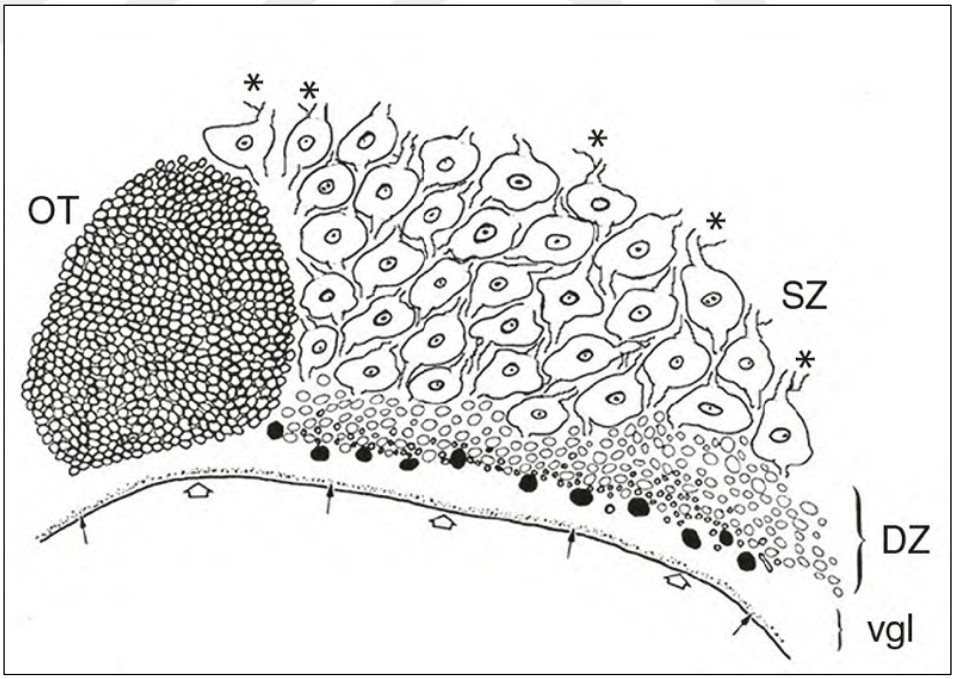
2.1.1 Supraoptik Çekirdek (SON)

Supraoptik çekirdek terimi, hipotalamusun ventral ve lateral uçlarında ön hipotalamik bölgede bulunan bir hücre grubunu ifade eder. İnsanda (Mai, & Paxinos, 2012), farede (Paxinos, & Watson, 2007a) ve sıçanda (Paxinos, & Watson, 2007b) nissl boyası ile gösterilmiştir. Optik kiazma ve optik traktusa yakın konumlanmıştır. Supraoptik çekirdek, dorsolateral kısım ve çekirdeğin retrokiazmatik kısmı (SOR) olmak üzere iki kısımdan oluşur (Sherlock, Field, & Raisman, 1975). Retrokiazmatik bölüm Optik traktus ile 3. ventrikül arasında pial yüzey boyunca uzanan ince bir nöron tabakası olarak gözlenmektedir. Bazı araştırmacılar insanda nispeten küçük olan retrokiazmatik alanın, ayrı bir varlık değil, supraoptik çekirdeğin 'tüberal bir parçası' olduğunu düşünmektedirler (Mai, & Paxinos, 2012).

Hipotalamik çekirdekler arasında SON, en yüksek düzeyde organize olanlardan biridir. SON nöronları magnoselüller özelliktedir. Çoğu SON nöronu OT veya VP üretir. VP nöronlarının sayısı OT nöronlarından biraz daha fazla olsa da SON'nun PVN'ye göre büyük boyutu, onu niceliksel olarak her iki hormonun üretimi için en önemli bölge haline getirmektedir. OT nöronları daha çok anterodorsal olarak ve VP nöronları posteroventral olarak kümelenmiştir (Hou-You, Lamme,

Zimmerman, & Silverman, 1986; Swaab, Pool, & Nijveldt, 1975). Sıçanlarda, SOR'daki VP nöronlarının OT nöronlarına oranı, SON'dakinden daha yüksek bulunmuştur (Rhodes, Morriell, & Pfaff, 1981).

Magnosellüler nöron yapısına göre çekirdek üç bölgeye ayrılmıştır. Çekirdeğin dorsal kısmı somatik zon (SZ) olarak tanımlanır. Burada magnosellüler nöronların sıkı bir şekilde paketlenmiş ve dendritlerinin dorsolateral veya ventromedial olarak çıkıntı yapma eğiliminde olan bipolar nöronlar olduğu gösterilmiştir. Aksonlar dorsal primer dendritlerden doğar ve nöronlardan dorsal ve dorsalateral olarak çıkış yapar. SZ'nin ventralinde dendritlerin beyin yüzeyine paralel olarak çıkış yaptığı bölge olarak dendritik zon (DZ) bulunmaktadır. DZ'nin altında, astrosit hücre gövdesi bulunur. Üç boyutta yansıtılırsa, bu astrosit dizisi, tüm çekirdeğin altında yatan bir tabaka halinde görülmektedir. Bu astrositlerden çıkan uzantılar magnosellüler nöron gövdeleri ve dendritler arasındaki boşluğu doldurmaktadır. Bu bölge ventral glial lamina (vgl) olarak adlandırılmaktadır (Hatton, 2009) (Şekil 2).



Şekil 2. Supraoptik Çekirdeğin şematik gösterimi (Hatton, 2009)

2.1.2. Paraventriküler Çekirdek (PVN)

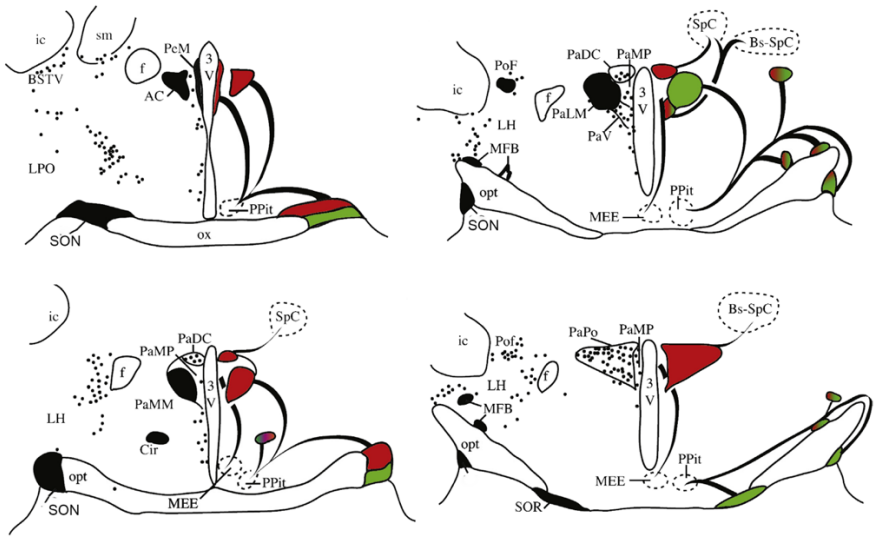
Paraventriküler çekirdek (PVN) üçüncü ventriküle bitişik ventral diensefalonda yer almaktadır. Zebra balığı ile insan arasındaki türlerde bulunan korunmuş bir beyin bölgesidir (Machluf, Gutnick, & Levkowitz, 2011). SON'den daha karmaşık bir hücre mimarisine sahiptir (Armstrong, Warach, Hatton, & Mcneill, 1980). SON'den farklı olarak, enerji dengesinin ve çeşitli endokrinolojik faaliyetlerin düzenlenmesinde roller oynayan üç ana tip nöron grubu olan, magnoselüler, parvoselüler ve uzun–projekte olan nöronları içermektedir (Qin, Li, & Tang, 2018).

Hipofizin nöral lobuna akson gönderen PVN nöronlarının çoğunluğu iki bitişik grupta bulunur (Armstrong ve ark., 1980; Hatton, Hutton, Hoblitzell, & Armstrong, 1976;). Medial magnoselüler kısım (PaMM) çoğunlukla OT nöronları içermektedir ve çekirdeğin anteromedial kısmında bulunmaktadır. Lateral magnoselüler bölüm (PaLM) öncelikle VP nöronlarını içerir ve PaMM'nin arka ve dorsolateralinde belirgin, top şeklinde bir kütle oluşturur. OT nöronlarından oluşan bir halka da yoğun şekilde paketlenmiş PaLM'nin çevresinde yer alır. SON'de bulunan nöronlar gibi, bu hücreler de nispeten büyüktür (20-40 μm). Bazıları nöral loba uzanan daha az yoğun paketlenmiş OT ve VP nöron grupları, PaMM ve PaLM'nin posterior, medial ve anteriorunda bulunur. SON nöronlarında ortak lokalize olduğu bulunan maddelerin çoğu, nöral loba uzanan PVN nöronlarında da bulunmaktadır. OT içeren hücre grubu olan periventriküler magnoselüler grup (PeM) ve anterior komissural çekirdek (AC) olmak üzere PVN'ye sıklıkla dahil edilen kısım olduğu bildirilmiştir (Swanson, & Kuypers, 1980). Hem PeM hem de AC burada aksesuar nörosekretuar çekirdekler olarak tanımlanmaktadır.

Çekirdeğin anterior (PaAP) ve medial (PaMP) parvoselüler bölümlerinde küçük-orta büyüklükteki nöronlar bulunmaktadır. Bu hücre tiplerinin birçoğu aksonlarını medyan eminens eksternal bölgesine (MEE) veya ekstra-hipotalamik alanlara gönderirler (Kawano, & Daikoku, 1987; Swanson, & Kuypers, 1980). PaAP ve PaMP, kimyasal olarak çeşitlilik göstermektedir. Bu bölgelerin, anjiyotensin II, atriyal natriüretik peptit, bombesin, VP, OT, kokain ve amfetaminle düzenlenen transkript (CART), kolesistokinin, kortikotropin salıcı hormon (CRH), hipofiz

adenilat siklaz aktive edici polipeptit (PACAP), büyüme hormonu salgılatıcı hormon (GRF), tirozin hidroksilaz, ensefalin, galanin, büyüme hormonu salgılatan hormon, tirotropin salgılayan hormon (TRH) ve vazoaktif intestinal peptit (VIP) için immünoreaktif nöronları içerdiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Broberger, 1999; Hannibal, Mikkelseni, Fahrenkrug, & Larsen, 1995; Simmons, & Swanson, 2009; Swanson, Sawchenko, & Lind, 1986;). Bu hücre tiplerinin birçoğu MEE'ye veya ekstrahipotalamik olarak yansıtılır.

Değişken büyüklükteki PVN nöronlarından oluşan üçüncü bir ana grup, kaudal olarak beyin sapına ve omuriliğe uzanır ve diğer iki gruptan açıkça ayrıdır (Armstrong ve ark., 1980; Hosoya, & Matsushita, 1980; Swanson, & Kuypers, 1980). Bu nöronların birçoğu ilişkili çekirdeklerle temas halinde bulunmaktadır ve dorsomedial kısım (PaDC), ventral PVN (PaV) ve posterior subnukleus (PaPo) bu projeksiyonların birincil kaynaklarıdır (Paxinos, 2015). Paraventriküler çekirdeğin bölümleri Şekil 3'te gösterilmiştir.



Şekil 3. Paraventriküler çekirdeğin şematik gösterimi. Kırmızı dolgular OT nöronlarının çoğunluğunu, yeşil dolgular VP nöronlarının çoğunluğunu ve gradyanlar ise ikisinin karışımını göstermektedir (Paxinos, 2015).

2.3. Hipofiz Bezi

Sinir ve endokrin sistemleri arasındaki morfolojik ve fonksiyonel ilişkiler hipofizin merkezi olarak hipotalamus tarafından düzenlendiği kavramı ile kurulmuştur. 1928 yılında, Scharrer hipofiz bezinin hipotalamustaki nöronlar

tarafından salgılanan hormonlar ve bu nöronlar ile kontrol edildiğini öne sürmüştür (Scharrer, 1928). Cajal, hipotalamus ve nörohipofiz (arka hipofiz), arasındaki bağlantıyı belirlemiştir ve ayrıca kemirgen beyninde hipotalamusdan nörohipofize geçişin miyelinsiz sinir lifleri ile olduğunu göstermiştir. Hipotalamus ve ön hipofiz arasındaki fiziksel bağlantının 19. yüzyılın sonunda Berkley tarafından, kan akışındaki bağlantının ise karmaşık hipofizyo-portal damarlar aracılığıyla olduğu Popa ve Fielding tarafından gözlemlenmiştir (Berkley, 1894; Popa, & Fielding, 1933). Daha sonra iki önemli hipotalamik nöropeptit olan, oksitosin ve vazopressinin, memelilerde nörohipofizden salgılanan nörohormonlar olduğu tanımlanmıştır (Livermore, & Vigneaud, 1949; Turner, Pierce, & Vigneaud, 1951). Hipotalamik nöronlar, hipofiz bezini kontrol etmek için farklı şekillerde kümelenmiştir. Her hipotalamik hormon tek bir çekirdekte veya birden fazla çekirdekte üretilebilir. Hipofizin regülasyonunda rol oynayan çekirdekler çoğunlukla medial hipotalamusta bulunurlar. Medyan eminens, hipotalamus ve hipofiz arasında ana fonksiyonel bağlantıdır ve kan beyin bariyerinin dışında bulunmaktadır (Rodríguez, Blazquez, & Guerra, 2010). Medyan eminens ependimal, internal ve eksternal olarak 3 zondan oluşur (Knigge, & Scott, 1970). En içteki ependimal bölge üçüncü ventrikülün tabanında bulunur, sıkı bağlantılar ve tanisitler büyük moleküllerin serebrospinal sıvıdan ekstrasellüler boşluklara geçişini engeller ve aynı zamanda hipotalamusa geri salınımını engeller (Makarenko ve ark., 2000). İnternal bölge supraoptik ve paraventriküler çekirdeklerden kaynaklanan nörohipofize gelen aksonları içerir. Eksternal bölge periventriküler hipotalamik çekirdek, paraventriküler ve arkuat çekirdekten gelen aksonları içermektedir. Bu bölge salgılama faktörlerinin hipotalamo-hipofizer portal dolaşımda geçişinin birincil kaynağıdır ve buradan da adenohipofizdeki trofik hormon salgılayan nöronlara ulaşır (Knigge, & Scott, 1970).

2.3.1. Hipofiz Bezinin Yapısı

Hipofiz bezi yetişkin insan beyninde yaklaşık 0,6 g ve yüksekliği 5-7 mm olan bileşik endokrin bir bezdir. Beyin tabanında orta hatta bulunan hipofiz bezi, sella tursika adı verilen sfenoid kemiğin ‘U’ şeklindeki çukuruna yerleşmiştir. Sella

tursikanın üst kısmında, diafragma sella adı verilen dural yapı bulunur. Diafragma sellanın ortasındaki açıklıktan hipofiz sapı iner ve infundibulum olarak devam eder. Hipofiz, hipotalamusa infundibulum adı verilen bu kısa sap ve vasküler ağ ile bağlıdır (Renn, & Rhoton, 1975).

Hipofiz bezi ön hipofiz (adenohipofiz) ve arka hipofiz (nörohipofiz veya pars nervoza) olarak 2 ana komponentten oluşur. Bu iki komponent embriyonik olarak farklıdır. Adenohipofiz, orofarinks ektoderminin beyne evajinasyonu ile oluşan Rathke kesesinden gelişirken, nörohipofiz gelişmekte olan beynin 3. ventrikül tabanının nöroektoderminin aşağı doğru büyümesi ile gelişir. Adenohipofiz, pars distalis, pars tuberalis ve pars intermedia olarak üç bölümden oluşur ve hormon üretiminin çoğunluğu pars distalis bölümünde meydana gelir. Nörohipofiz, infundibular sap, hipotalamik medyan eminens ve hipotalamusun tabanının parçası olan tuber cinereum içeren hipotalamo-nörohipofizeal yolun distal kısmını oluşturur.

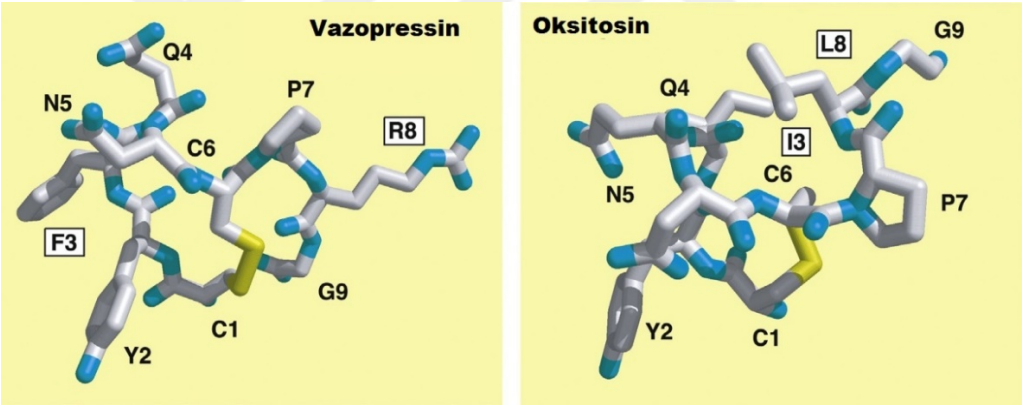
2.3.2. Nörohipofiz

Nörohipofiz hipotalamik supraoptik çekirdek ve paraventriküler çekirdekte bulunan magnosellüler nöron (20-40 μm) gövdelerinden köken alan akson terminallerini içermektedir. Bu aksonlar infundibular sapı geçerek, nörohipofizde son bulur (Makarenko ve ark., 2000). Nörohipofizdeki akson terminalleri salgı granülleri içerir. Bu granüller daha sonra salınmak üzere depo edilir. Sistemik dolaşıma oksitosin ve vazopressin salgılarlar. Bu hormonlar çoğunlukla hormona özgü magnoselüler nöronlar tarafından sentezlenir. Her iki hormonu birden sentezleyen nöron sayısı oldukça azdır (~%3), (Gainer, 2012). Supraoptik çekirdek basit yapılıdır ve buradaki nöronların çoğunluğu vazopressin sentezler (Sofroniew, 1983) ve neredeyse tüm aksonlar nörohipofize projeksiyon yapar (Makarenko ve ark., 2000). Bununla birlikte, paraventriküler çekirdeğin organizasyonu çok daha karmaşıktır ve türler arasında farklılık gösterir (Biag ve ark., 2012). PVN'de bulunan parvoselüler nöronlar (10-15 μm) median eminense, beyin sapına ve omuriliğe projeksiyon yapmaktadır (Swanson, & Sawchenko, 1980). Nörohipofizde bulunan diğer yapı olan pituisitler hormon salınımı gerekmediğinde akson terminallerini sarmaktadır. Ancak dehidratasyon durumunda, örneğin vasopressin sekresyonunda geri çekilmektedirler

(Hatton, Perlmutter, Salm, & Tweedle, 1984). Adenohipofizin kanlanması, hipotalamik/hipofiz portal sistemi aracılığı ile olurken nörohipofizin kanlanması direkt olarak inferior hipofizeal arterlerden gerçekleşmektedir (Gorczyca, & Hardy, 1987).

2.4. Oksitosin ve Vazopressin Molekülleri

Oksitosin ve vazopressin (arjinin vazopressin), nörohipofizin iki hormonudur. Sentezleri SON ve PVN'deki magnoselüler nöronlarda gerçekleşir. Bu moleküller, 3 ve 8. pozisyondaki sadece iki amino asitte farklılık göstermektedir. Oksitosindeki izolösin ve lösin sırasıyla vazopressinde fenilanin ve arginin ile değişmiş durumdadır (Şekil 4). İlgili peptitler, tüm omurgalı türlerinde tespit edilmiştir ve benzer ana bileşiklerden evrimleştiği düşünülmektedir (Gimpl, & Fahrenholz, 2001).

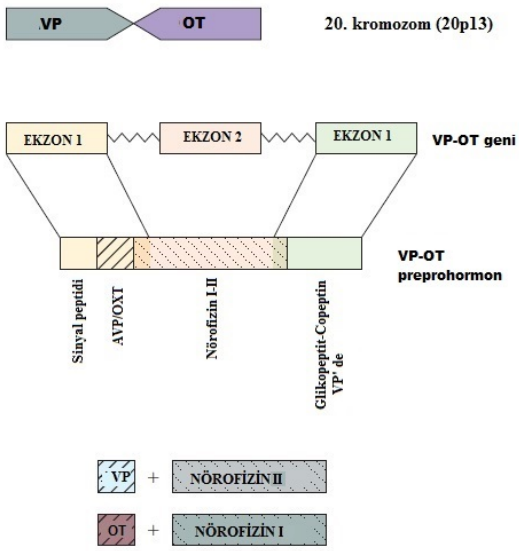


Şekil 4. Vazopressin (VP) ve oksitosinin (OT) peptit yapısı. Peptitler sadece iki amino asit ile farklılık gösterir ve VP ve OT'de sırasıyla F3-I3, R8-L8 (Melmed, 2007'den uyarlanmıştır).

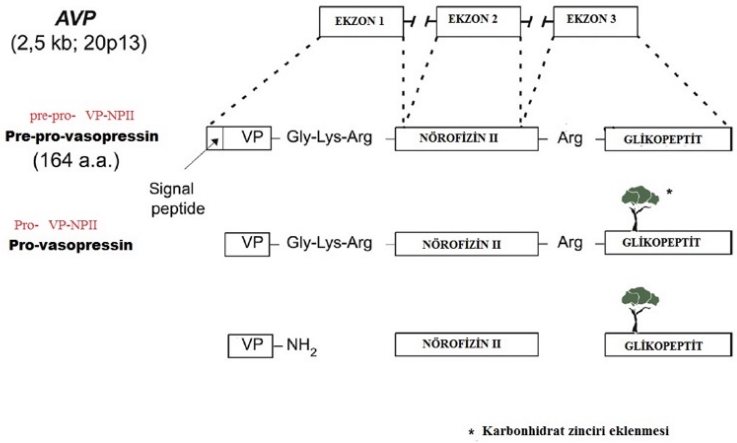
2.5. Vazopressin-Oksitosin Sentez ve Salgılanması

VP-taşıyıcı protein olan nörofizin II (NP II), OT-taşıyıcı protein olan nörofizin I (NP I) magnoselüler ve parvoselüler nöronlar tarafından bileşik bir öncü olarak sentezlenmektedir (Burbach, Luckman, Murphy, & Gainer, 2001). Öncüller nörosekresyon granülleri olarak paketlenir ve aksonal olarak nörohipofize taşınır. Nörohipofize giden bu yol üzerinde öncül aktif hormona dönüşür. 164 amino asitten oluşan preprovazopressin, 2.5 kb boyutundadır ve 20. kromozom üzerinde (20p13) yer alan VP geni tarafından kodlanır (Şekil 5). VP ve nörofizin II kodlayan VP geni

ile oksitosin ve nörofizin I kodlayan OT geni aynı kromozom bölgesi üzerinde bulunur. Birbirlerine kısa mesafededirler (insanlarda 12 kb). Transgenik fare çalışmalarından elde edilen veriler, OT ve VP genleri arasında bu aralığın, magnoselüler nöronlarda hücreye özgü ekspresyon için kritik güçlendirici bölgeleri içerdiğini ortaya koymuştur (Burbach ve ark., 2001). VP genindeki 1. ekzon, sinyal peptitini, vazopressini ve NP II'nin amino uç (N-terminal) bölümünü kodlamaktadır. 2. ekzon bölgesi NP II'nin merkezi bölgesini kodlar. Üçüncü ekzon bölge ise, NP II'nin karboksil ucunu (C-terminal) ve glikopeptit kısmını kodlamaktadır (Şekil 6).



Şekil 5. OT ve VP genleri ve yapısal organizasyonu (Norman, Dean, & Henry, 2015'ten uyarlanmıştır).



Şekil 6. Vazopressin gen yapısı ve prohormon (Melmed, 2007'den uyarlanmıştır).

Provazopressin (pro-VP-NPII) preprovazopressinden (pre-pro-VP-NPII) sinyal peptitinin ayrılması ve glikopeptite bir karbonhidrat zincirinin eklenmesi ile oluşturulur (Şekil 6). Ek olarak nörosekretuvar veziküller içindeki öncül proteinin akson terminallerinde taşınması sırasında posttranslasyonel değişiklikler meydana gelir. VP-NPII kompleksi, tetramerleri oluşturur ve daha büyük oligomerler oluşturmak için kendi kendine birleşebilir (Melmed, 2007; Chen ve ark., 1991). VP, nörohipofizde veziküllerde depolanır ve gelen uyarılara cevap olarak ekzositoz ile nörohipofizden kana salınır.

Oksitosin peptiti, vazopressine benzer olarak öncül protein olarak sentezlenir. Bu prekürsör protein aynı zamanda oksitosin taşıyıcı protein nörofizin I'i de içerir. Vazopressinden farklı olarak yapısında glikopeptit içermez (Gimpl, & Fahrenholz, 2001).

2.6. Vazopressin Sistemi

Vazopressin, çeşitli hipotalamik çekirdeklerde üretilen bir nöropeptitdir. Paraventriküler çekirdek, supraoptik çekirdekte bulunan magnoselüler nöronların ve suprakiazmatik çekirdeğin (SCN) dorsomedial kısmında bulunan küçük boyutlu nöronların antikorlarla VP veya nörofizin (NP) II'ye karşı yoğun bir şekilde boyandığı gösterilmiştir (Ben-Barak, Russell, Whitnall, Ozato, & Gainer, 1985; Castel & Morris, 1988; Otero-Garcia ve ark., 2014).

Kemirgen beynindeki toplam VP nöron sayısı yaklaşık 7500 olarak bulunmuştur (Rhodes ve ark., 1981). Magnoselüler nöronların uzantılarını ME internal tabakasını geçerek nörohipofize geldiği bildirilmiştir (Burbach ve ark., 2001). SCN nöronları, nöroendokrin sistemlerin bir parçası olmasa da SCN'nin dorsomedial kısmında da VP üretildiği gösterilmiştir (Golombek, & Rosenstein, 2010; Ramkisoensing, & Meijer, 2015). VP'nin SCN'deki fizyolojik rolü hala daha tam belirlenememiştir, ancak sirkadiyen ritmin kontrolü ile ilgili beyindeki çeşitli mekanizmalara dahil olduğu varsayılmaktadır (Gizowski, Zaelzer, & Bourque, 2016; Trudel & Bourque, 2010). PVN'de, kortikotropin salgılatıcı faktör üreten nöronlar, esas olarak çekirdeğin anteromedial kısmında bulunmaktadır ve VP üretebilen üçüncü bir nöroendokrin nöron popülasyonunu oluşturduğu bildirilmiştir (Itoi ve ark,

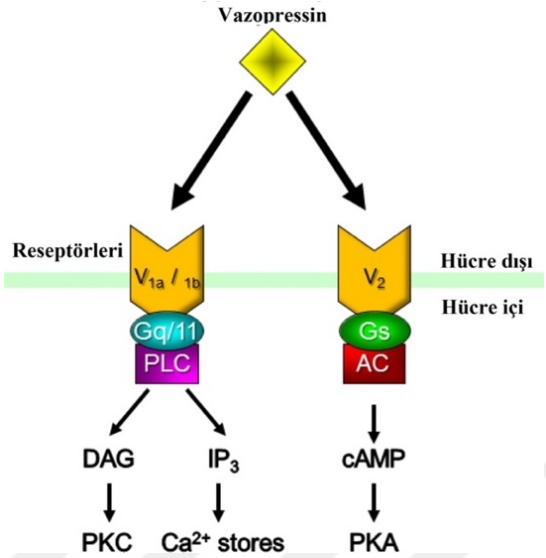
2014; Mouri ve ark., 1993). Bu nöronlar parvoselüler nöronlardır ve ME'nin eksternal tabakasına projeksiyon yaparak, kapiller yatakta sonlanan sinir uçlarından hipofiz portal damarlarına salınmaktadır (Fellmann ark., 1984). Hem CRF hem de VP, ön hipofizdeki kortikotroplardan adrenokortikotropik hormon sekresyonunu uyarır ve ön hipofiz hücrelerine birlikte uygulandıklarında ACTH sekresyonunda sinerjik olarak hareket ettikleri görüşü hakimdir (Fischman, & Moldow, 1984; Gillies, Linton, & Lowry, 1982; Hashimoto, Murkami, Hattori, & Ota, 1984). Hayvanlar stres altındayken ve adrenalektomi durumunda CRH nöronlarında VP ekspresyonunun artışına bağlı olarak hipofiz portal damarlarındaki VP konsantrasyonunun arttığı ortaya koyulmuştur (Plotsky, 1987; Plotsky, & Sawchenko, 1987; Sawchenko, Swanson, & Vale, 1987). Sıçanlarda, CRF ve VP'nin aynı vezikül içinde taşındığı immünohistokimyasal olarak gösterilmiştir (Whitnall, Mezey, & Gainer, 1985). Bu nedenle hem CRF hem de VP, hipofizde ACTH için fizyolojik salgılatıcılar olarak kabul edilmektedir (Mouri ve ark., 1993; Whitnall ve ark., 1985). PVN'de VP üreten nöronların dördüncü popülasyonu çekirdeğin posterolateral kısmında bulunmuştur. Bunların ekstrahipotalamik alanlara ve omuriliğe projeksiyon yaptığı bildirilmiştir. Ayrıca yapılan çalışma ile bu nöron grubunun otonomik çıktının düzenlenmesinde rol aldığı gösterilmiştir (Sawchenko, & Swanson, 1982).

Tüm bunlara ek olarak VP nöronları, stria terminalis'in yatak çekirdeği (BNST) ve amigdalanın medial çekirdeği (MeA) dahil olmak üzere çeşitli ekstra-hipotalamik ön beyin çekirdeklerinde de bulunmuştur (De Vries ve ark., 1984).

2.6.1 Vazopressin Reseptörleri

Hepsi G protein bağlı reseptörler (GPCR) olmak üzere üç tip vazopressin reseptörü vardır. Bunlar V1a, V1b ve V2 reseptörü olarak adlandırılmaktadır. V1a ve V1b reseptörleri Gq/11'e bağlanırken, V2 reseptörü Gs'ye bağlanır (Şekil 7). Reseptörlerin fizyolojisi ve dağılımı farklıdır. V1a reseptörlerinin, aktivasyonlarının vazokonstriksiyona neden olduğu, vasküler düz kaslara ek olarak olfaktor bulbus, hipokampus, PVN ve suprakiazmatik çekirdek gibi beynin farklı bölümlerinde de

eksprese edildiği gösterilmiştir (Ostrowski, Lolait, & Young, 1994; Tobin ve ark., 2010; Tribollet, Baberis, Dubois-Dauphin, & Dreifuss, 1992).

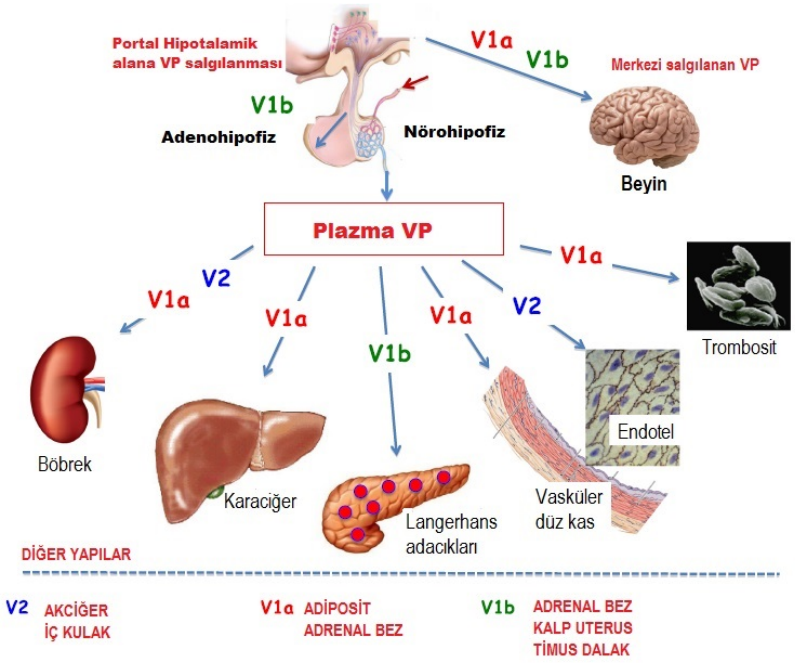


Şekil 7. Vazopressin reseptörleri. Bilinen üç vazopressin reseptörü vardır; V1a, V1b ve V2 reseptörleri, bunların hepsi G proteinine bağlı reseptörlerdir. V1a ve V1b, Gq/11'e ve IP3/DAG sinyal yoluna bağlanır ve V2 reseptörleri, Gs'ye ve cAMP sinyal yoluna bağlanır (Ohbuchi, Hamm, &Tasker, 2015'ten uyarlanmıştır).

V1b reseptörleri ağırlıklı olarak adenohipofizde eksprese edilir ve hipotalamik-hipofiz-adrenal (HPA) ekseninin aktivasyonunda yer aldığı gösterilmiştir (Hernando, Schoots, Lolait, & Burbach, 2001). Ancak aynı zamanda düşük seviyelerde beyinde eksprese edildiği ortaya koyulmuştur (Young, Li, Wersinger, 2006). V2 reseptörleri esas olarak böbrekte eksprese edilmektedir ve burada vasopressinin suyun geri emilimini kontrol etmedeki kritik rolüne aracılık ettiği yapılan çalışma ile gösterilmiştir (Erlenbach, & Wess, 1988; Robben, Knoers, & Deen, 2004). Yakın zamanda hipotalamustaki vazopressin nöronlarının hacminin düzenlenmesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Sato, Numata, Saito, Ueta, & Okada, 2011). Bunun yanında vazopressinin oksitosin reseptör (OTR) üzerinden de etki gösterdiği bildirilmiştir (Rigney ve ark., 2023). Vazopressin reseptörleri Şekil 8'de gösterildiği gibi birçok doku ve organda eksprese edilmektedir.

Birçok dokuya özgü sinyaller, transkripsiyonel olarak veya transkripsiyon sonrası VP reseptörü ekspresyonunu etkilediği bildirilmiştir. Toplama kanalında metabolik asidozun V1aR'yi arttırdığı ve V2R ifadesini azalttığı gösterilmiştir (Machida ve ark., 2007; Tashima ve ark., 2001). Ayrıca dehidrasyonun V2R

ifadesini düzenlediği ve V2R ekspresyon seviyelerinin cinsiyete bağlı olduğu ortaya koyulmuştur (Liu ve ark., 2011).



Şekil 8. Vazopressin reseptörleri dağılımı (Bankir, Bichet, Morgenthaler, 2017'de uyarlanmıştır).

2.6.2. Vazopressinin İşlevleri

Vazopressin, kan osmolalitesini, hacmini ve basıncını kontrol ederek sıvı homeostazında kritik bir rol oynar. Nörohipofizden vazopressin salgılanması, yüksek plazma ozmolalitesi, hipovolemi ve düşük arteriyel kan basıncı ile uyarılmaktadır ve kan ozmolalitesinde bir azalmaya, kan hacmi ve basıncında bir artışa neden olmaktadır. Vazopressin, böbreğin distal nefronundaki su emilimini uyaran ve adenil siklazı etkinleştiren V2 reseptörlerine bağlanır ve tübül epitel hücrelerinin sitoplazmasında siklik adenozin monofosfat (cAMP) oluşmasına neden olur. Bu da hücre içi veziküllerinde bulunan aquaporin-2'nin fosforilasyonuna yol açarak veziküllerin hücre zarının apikal kısmına yerleşmesine ve böylece suya geçirgenliği yüksek olan alanların artmasını sağlayarak idrar hacmini azaltır. (Knepper, & Inoue, 1997). Vazopressinin V2 reseptör aracılı etkisi V1a aracılı etki ile ortadan kısmen kaldırılmaktadır. Vazopressin ile V1a reseptörlerinin aktivasyonu sonucu toplayıcı

kanallardan prostaglandin üretimi uyarılır. Bu durum V2 reseptör uyarımında adenilat siklaz cevabını azaltır (Bankir, Bichet, & Bouby, 2010). VP aynı zamanda iç medullar toplama kanalında bulunan üre taşıyıcı UT-A1'i düzenleyerek renal su reabsorptif kapasitesini de arttırır (Smith, 2009). VP ayrıca toplayıcı kanal hücrelerinin sodyum geçirgenliğini artırır (Bankir, Fernandes, Bardoux, Bouby, & Bichet, 2005). Özetle, VP uyarım yokluğunda, toplayıcı kanal epiteli sodyum, üre ve suya çok düşük geçirgenlik sergilemektedir. Bu özel geçirgenlik özellikleri büyük miktarlarda hipotonik idrar atılımına neden olmaktadır.

Vazopressin ayrıca sıvı homeostazının düzenlenmesine katkıda bulunan içme davranışını da modüle etmektedir. Ekstraselüler sıvıda hiperosmotik durumun susama hissine neden olduğu, su alımını uyardığı ve VP salgısı ile böbreklerden su geri emilimini sağlandığı gösterilmiştir (Zimmerman ve ark., 2016). Tersi olarak ise yapılan çalışmalarda insan ve sıçanlarda hipoosmotik ekstraselüler sıvının vazopressin salınımı baskıladığı bildirilmiştir (Claybaugh, Sato, Crosswhite, & Hassel, 2000). Ayrıca, daha önce bahsedildiği gibi, vazopressin, arteriyel V1a reseptörlerinin aktivasyonu yoluyla vazokonstriktif bir etkiye de sahiptir ve bu etki dehidrasyon, kanama, adrenal yetmezlik gibi sıvı hacmin tehdit edildiği durumlarda görünmektedir. Ancak bu etkinin, dolaşımda yüksek peptit seviyeleri gerektirdiği bildirilmiştir (Johnston, 1985).

Beyinde ise VP sosyal davranışı düzenleyen bir nöropeptit olarak işlev görmektedir. PVN'de ayrı bir parvoselüler nöron grubunun, sosyal ve diğer güdülenmiş davranışların yanı sıra fizyolojiyi de modüle etmek için merkezi olarak beyin bölgelerine projeksiyon yaptığı bildirilmiştir. Bunun yanında esas olarak BNST ve MeA bulunan VP nöronlarının çeşitli davranış fizyolojilerinin düzenlenmesinde ilişkileri ortaya koyulmuştur (Rigney ve ark., 2023)

2.7. Oksitosin Sistemi

Klasik olarak, nonapeptit oksitosin, hipotalamusta paraventriküler çekirdek, supraoptik çekirdek ve aksesuar çekirdekte magnoselüler nöronlar tarafından sentezlenmektedir. Burada yerleşik magnoselüler nöronlar projeksiyonlarını nöohipofize yaparak oksitosinin sistemik dolaşıma salgılanmasını sağlarlar

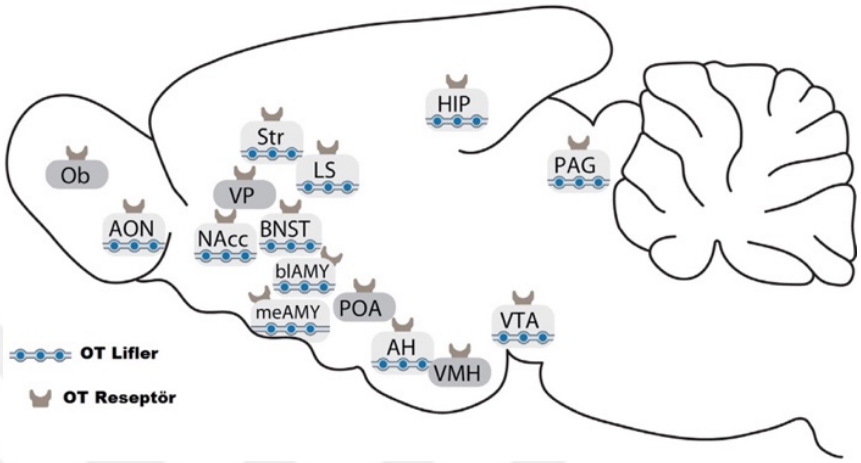
(Makarenko ve ark., 2000). Uzun yıllar boyunca magnoselüler oksitosin nöronları, doğum için rahimdeki düz kas hücrelerinin ve süt salgılamasını sağlamak için meme bezlerindeki miyoepitelyal hücrelerin kasılmasını indükleyen plazma OT'nin ana kaynağı olarak araştırmacıların ana odak noktası olmuştur (Leng ve ark., 2015). Ancak, çok yakın bir zamanda yapılan çalışmalar, magnoselüler OT nöronlarının, arka hipofize olan projeksiyonlarına ek olarak, korku ve olfaktör sinyalleri işleme için prefrontal korteks, arkuat çekirdek ve hipokampus dahil ön beyne kolateral projeksiyonlar yaptığını ortaya koymuştur (Knobloch ve ark., 2012; Oettl ve ark., 2016). Sıçan hipotalamusu yaklaşık 7600 OT hücresi içerdiği ve büyük çoğunluğunun (>%99) ise magnoselüler OT nöronlar olduğu gösterilmiştir (Althammer, & Grinevich, 2018). Magnoselüler OT nöronları oksitosin çalışmalarında esas olarak çalışılsa da 1980'lerin başında PVN'de magnoselüler OT nöronlarından daha küçük ve farklı hücre gövdesi şekline sahip ikinci bir hücre grubu tanımlanmıştır. Parvoselüler oksitosin nöronları olarak adlandırılan bu hücrelerin, projeksiyonlarını nörohipofiz yerine omurilik ve birkaç beyin sapı çekirdeğine yaptığı (Sawchenko, & Swanson, 1982) ve gıda alımının düzenlenmesi (Blevins, Schwartz, & Baskin, 2004), solunum (Mack ve ark., 2002), ereksiyon ile çiftleşme (Melis, Argiolas, & Gessa, 1986), kardiyovasküler reaksiyonlar (Petersson, 2002), mide refleksleri (Sabatier, Leng, & Menzies, 2013) ve ağrı algısı (Rash, Aguirre-Camacho, & Campbell, 2014) gibi işlevlere etki ettiğini ortaya koymuştur. Ayrıca, PVN'nin parvoselüler OT nöronların, ipsilateral SON ve kontrolateral PVN'ye akso-somatik, akso-dendritik projeksiyon yaparak SON'da bulunan magnoselüler OT nöron aktivitesini kontrol ettiği öne sürülmüştür (Eliava ve ark., 2016; Honda, Sudo, & Ikeda, 2013). Son 5 yıldır OT sisteminin modülasyonunun yeni oyuncuları olarak kabul edilen bu küçük hücre alt popülasyonunun hem merkezi hem de periferik düzeyde yanıtlarda, sosyal etkileşim sırasında somatosensoriyel sinyal entegrasyonunda (Tang ve ark., 2020), nosiseptif koordinasyonunda hayati bir rol oynadığı ortaya çıkmıştır (Eliava ve ark., 2016). Aslında bu çalışmalar, parvoselüler OT nöronlarının, çeşitli koşullar altında magnoselüler OT nöron aktivitesini sıkı bir şekilde kontrol eden ve düzenleyen ana düzenleyiciler olabileceğini düşündürmektedir.

2.7.1. Oksitosin Reseptörü

Vazopressinden farklı olarak oksitosin için tek oksitosin reseptör (OTR) tanımlanmıştır. OTR, G protein kenetli reseptör ailesi arasındadır. OTR'lerinin Gq/11 ve Gi/Go komplekslerine bağlandığı gösterilmiştir ve bu çift bağlanma çeşitli in vitro hücre sistemlerinde araştırılmıştır. Gq/11 aracılı kalsiyuma bağımlı bir yolun aktivasyonu ve Gi aracılı cAMP seviyelerindeki düşüşün, miyometriyal hücrelerde, OTR aracılı kasılmaya katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Zhou, Lutz, Steffens, Korth, & Wieland, 2007). İnsan embriyonik böbreğinde, OTR'leri kararlı bir şekilde eksprese eden HEK293 hücrelerinde Gq/11 ile hücre büyümesini uyarırken, Gi ile bunu inhibe ettiği yapılan çalışmalar ile ortaya koyulmuştur (Zhou ve ark., 2007; Rimoldi ve ark., 2003). Kısaca, farklı G proteinlerine OTR bağlanmasının, hücre içeriğine bağlı olarak sinerjistik veya zıt etkilere aracılık etme yeteneğine sahip olduğu görülmektedir.

Oksitosin reseptörü doğum ve emzirme için kilit bir alıcı sistemdir. Ancak son yıllarda OT reseptörünü (OTR) kodlayan genin yeni ifade bölgelerinin keşfedilmesi ve diğer yandan OT üretiminde yeni bölgelerin çözülmesi nedeniyle, klasik oksitosin kavramı büyük ölçüde genişlemiştir. OTR'nin türler ve dokular boyunca ifadesi, spesifik OTR ligandları kullanılarak otoradyografi ve mRNA çalışmaları ile aydınlatılmıştır. OTR'nin uterus, kalp, böbrek, pankreas, timus, adipositler ve beyin dahil olmak üzere çeşitli dokularda ifade edildiği bildirilmiştir (Zingg, & Laporte, 2003). Nöronlarda ifade edilen OTR'lerin, hipotalamus (dorsomedial, ventromedial, magnoselüler çekirdekler), limbik beyin yapıları (amigdaloid çekirdekler, medial preoptik çekirdek, septal çekirdekler), hipokampus, koku işleme yapıları (priform korteks, koku alma çekirdekleri) ve beyin sapı (ağız ve yüzü düzenleyen duyusal ve motor sinir çekirdekleri) dahil olmak üzere birçok beyin bölgesinde yaygın olarak dağıldığı insanlarda ortaya koyulmuştur (Quintana ve ark., 2019). Beyin bölgeleri arasındaki OTR dağılımı oldukça türe özgüdür. Sıçan beynindeki OT terminallerinin (Knobloch ve ark., 2012; Sofroniew, 1983) ve OTR'lerin (Tribollet, Charpak, Schmidt, Dubois-Dauphin, & Dreifuss, 1989; Yoshimura, Kimura, Watanabe, & Kiyama, 1996) dağılımı yeniden ele alındığında temelde tam bir örtüşme olduğu açıklanmıştır (Şekil 9). Ancak OT lifleri ve OTR'ler

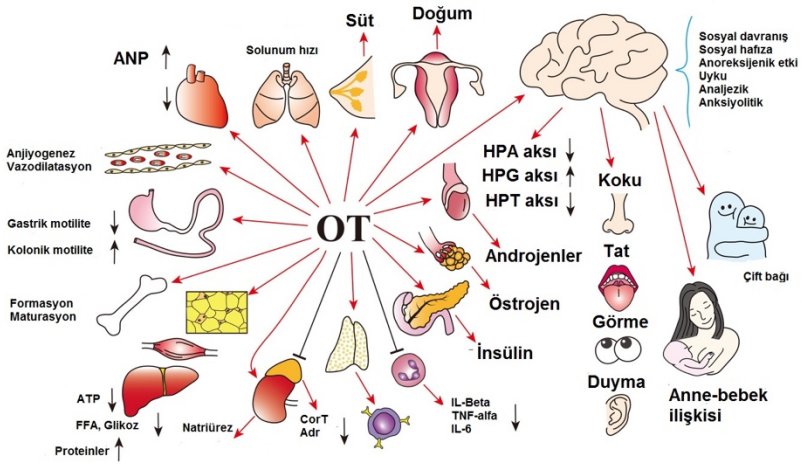
arasındaki bariz uyumsuzluk, olfaktor bulbus, ventral pallidum, medial preoptik alan ve ventromedial hipotalamik çekirdekte gösterilmiştir. (Grinevich, Knobloch-Bollmann, Eliava, Busnelli, & Chini, 2016).



Şekil 9. Sıçan beyninde oksitosin reseptörlerinin ve oksitosinerjik aksonların bölgesel dağılımı. Olfaktor bulbus (Ob), ventral pallidum (VP), medial preoptik alan (POA) ve hipotalamusun ventromedial çekirdeği (VMH), ön hipotalamus (AH), ön koku alma çekirdeği (AON), bazolateral amigdala (blAMY), stria terminalisin yatak çekirdeği (BNST), hipokampus (HIP), lateral septum (LS), nukleus akumbens (NAcc), medial amigdala (meAMY), periakuaduktal gri (PAG), striatum (Str), ventral tegmental alan (VTA) (Grinevich ve ark., 2016'dan uyarlanmıştır).

2.7.2. Oksitosinin İşlevleri

Hormonlar, vücut gelişimi ve çevresel değişikliklere adaptif tepkiler için önemli faktörlerdir. Pek çok hormon arasında oksitosin, sadece süt salgılama refleksinde anahtar faktör olmakla kalmaz, aynı zamanda içgüdüsel davranışların (yeme-içme, uyku-uyanıklık vb.) ve otonom sinirsel aktivitelerin (kalp ritmi, mide-bağırsak sistemi kasılması, nefes alma ritmi ve terleme vb.) düzenlenmesinde işleve sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Liu, Yang, Han, & Ma, 2022; Yang, Wang, Han, &Wang, 2013; Wang ve ark, 2015; Wang ve ark., 2019; Wang ark., 2022) (Şekil 10).



Şekil 10. Oksitosinin fonksiyonlarının özeti. Kısaltmalar: Adrenalin (Adr), Atriyal natriüretik peptit (ANP), Kortikosteroidler (CorT), Serbest yağ asitleri (FFA), Gonadotropin salgılayan hormon (GnRH), Hipotalamik-hipofiz-adrenal (HPA) ekseni, Hipotalamik hipofiz gonad (HPG) eksen, Hipotalamik hipofiz tiroid (HPT) ekseni, İnterlökin (IL) ve Tümör nekroz faktörü (TNF)-α (Wang ve ark., 2022'den uyarlanmıştır).

Hamilelik sırasında OT sadece fetüsün gelişimi ve korunması için değil, aynı zamanda laktasyon sırasında maternal pulsatil OT salgı mekanizmasının olgunlaşması için de önemlidir. Gebeliğin ortasından itibaren SON, PVN, BNST ve medial POA'da merkezi OTR bağlanmasının kademeli olarak artttığı (Bealer, Lipschitz, Ramoz, & Crowlwy, 2006), blokajının OT salınımını geciktirdiği ve emzirme sırasında süt verimini azalttığı bildirilmiştir (Lipschitz, Crowley, & Bealer, 2003). Doğumda serviks veya vajinal duvarlar gerildiğinde, nöral sinyaller hipotalamusun SON ve PVN'sine ulaşır ve OT nöronları aktive olur. OT'nin salımının, sıçanlarda kendi kendine devam eden uterus kasılmaları döngüsünü başlattığı gösterilmiştir (Higuchi, & Okere, 2002). Tüm memelilerde OT, OT nakavt farelerde kanıtladığı gibi anneler tarafından yavrularına süt sağlamak için kullanılan temel bir hormondur (Winslow, & Insel, 2002). Emzirme ile artan OT sekresyonu, beyindeki annelik davranışlarının sürdürülmesi ve sıçanlarda meme bezlerinin gelişimi için gereklidir (Li ve ark., 2021). Emzirme uyarısına yanıt olarak, meme bezlerinden gelen ve hipotalamusa ulaşan nöral sinyaller, SON ve PVN'deki OT nöronlarını aktive ederek arka hipofizden OT'nin pulsatil bir şekilde salınmasına ve süt çıkışına neden olur (Wakerley, 2006).

İnsanlarda OT, gelişim sırasında beyin fonksiyonları için gereklidir. Oksitosinin, doğumda anti-enflamasyonda, gelişmekte olan fetal beynin korunmasında (Kingsbury, & Bilbo, 2019), anne yenidoğan ilişkisinde (Galbally,

Lewis, Ijzendoorn, Van, & Permezel, 2011) ve çocukların ve ergenlerin davranışlarında rolleri tanımlanmıştır.

Ebeveyn davranışlarının oluşturulmasında PVN muhtemelen dişi sıçanlarda (Munetomo, Ishii, Miyamoto, Sakuma, & Kondo, 2016) ve erkek farelerde (Shabalova ve ark., 2020) merkezi bir konuma sahiptir. PVN'deki OT nöronlarının, sıçanlarda ve dişi tavşanlarda sosyal davranışları modüle eden anahtar yapılar olarak bilinen hipokampus, amigdala, ventral striatum, hipotalamus, nukleus akumbens (NAc, ventral striatumda) ve beyin sapı çekirdeklerine projeksiyon yaptığı gösterilmiştir (Ruthschilling ve ar., 2012; Jiménez, Young, Rio, Laprairie, & Gonzales-Mariscal, 2015). Bu özellik, OT'nin ebeveyn davranışlarını modüle etmede temel olduğunu ortaya koymuştur. Bunun yanında özellikle SON'daki OT nöronlarında, son zamanlarda farelerde yapılan çalışmalarda annelik gibi davranışlarının sürdürülmesinde de rol oynadığı gözlemlenmiştir (Li ve diğerleri, 2020; Li ve ark., 2021). Bu durum SON bölgesindeki nöronların sıçanlarda anne davranışlarını düzenleyen beyin bölgeleriyle olan yapısal bağlantısıyla açıklanmıştır (Zhang ve ark., 2021).

Oksitosin, savunma davranışını, yeme ve içmeyi, cinsel davranışı, kadın üremesini, uykuyu ve diğer içgüdüsel davranışları doğrudan veya limbik sistem ve diğer beyin yapılarının aktivitesini modüle ederek düzenleyebilmektedir. 912 katılımcıyla yapılan 26 çalışma, OT'nin ekzojen olarak uygulanmasının gıda alımını azalttığını göstermiştir (Skinner ve ark., 2018). İntranasal oksitosin uygulanmasının erkeklerde tokluk sinyallerini arttırırken, yemek yemeyi engellediği bildirilmiştir (Plessow Marengi, Perry, & Lawson, 2021). Diğer bir çalışmada intraserebroventriküler OT uygulamasının enjeksiyon dozuna bağlı olarak gıda alımını azalttığı ve arkuat, dorsomedial çekirdek, lateral hipotalamus, PVN ve ventromedial hipotalamusta c-Fos ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (McConn ve ark., 2019). Oral olarak OT uygulanmasının farelerde plazma OT seviyerinde artış ve PVN'de c-Fos ekspresyonunda artış olduğu tespit edilmiştir (Maejima ve ark., 2020). Bu gerçekler, OT'nin beslenmeyi azaltabileceği önerisini desteklemektedir.

OT'nin üreme ve üreme düzenleyici aktiviteler üzerinde etkisi açıklanmıştır. Cinsel süreçleri teşvik ettiği, plazma OT seviyelerinin hem erkek hem de dişilerde artması ile gösterilmiştir (Cera ve ark., 2021). Menstrual siklus, steroid hormon

üretimindeki bir dizi değişiklik tarafından yönlendirilen ve OT tarafından düzenlendiği ortaya koyulan fizyolojik süreçtir. Yapılan çalışmalarda plazma OT seviyesinin, döngünün farklı aşamalarında farklı olduğu, luteal faz ile karşılaştırıldığında, ovülasyon fazında OT seviyelerinin önemli ölçüde yükseldiği bildirilmiştir (Evans, Reid, Wakeman, Croft, & Benny, 2003).

Duyusal-motor aktivite üzerindeki OT etkileri, otonomik nöral aktivite, spesifik duyumu ve somatik duyu-motor aktivitelerini içermektedir. OT, PVN-DVC-vagal-organ yoluyla parasempatik sinir aktivitesini ve RVLM yolu ile sempatik çıkışları artırabilir. Sıçanlarda, bu yolun aktivasyonunun, insülin seviyelerini arttırdığı (Björkstrand, Eriksson, & Uvnas-Moberg, 1996), kalp atış hızını ve kalp kontraktilitesini azalttığı (Houshmand, Faghini, & Zahediasl, 2015), sindirim sisteminin yiyecek ve su alımını baskıladığı (Niimi, Murao, & Taminato, 2001), mide boşalmasını yavaşlattığı (Tolentino ve ark., 2021) ve hepatik metabolik aktiviteyi düzenlediği (Dos Santos, Moraes, Da Silva, & Antunes, 2021) yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir.

Kalp atış hızı değişkenliği (HRV), birbirini izleyen kalp atışları arasındaki aralıktaki değişimi ifade eder. Düşük HRV, potansiyel otonom sinir sistemi işlev bozukluğunun bir göstergesidir. OT nakavt farelerde daha yüksek sempatik ton ve daha yüksek kalp hızı varlığı ortaya koyulmuştur (Michelini, Marcelo, Amico, & Morris, 2003). Histolojik olarak, sıçanlarda RVLM bölgesine projeksiyon yapan PVN nöronlarının %80'inin OT nöronları olduğu gösterilmiştir (Lee, Ryu, & Lee, 2013) ve OT'nin sıçan RVLM'sine mikroenjeksiyonu, kan basıncı artışıyla sempatik çıkışları arttırdığı bildirilmiştir (Ishizuka, Wei, & Kubo, 1993). Ayrıca PVN'deki bir OT nöron popülasyonunun üst torasik omurilikte sempatik preganglionik nöronlara projeksiyon yaptığı ve bu OT aktivasyonu ile, sıçanlarda kalp atış hızını seçici olarak artırdığı görüşü hakimdir (Yang, Han, & Coote, 2009).

Yapılan çalışmalarda OT'nin sosyal tanınmayı destekleyebileceği göstermektedir. İntihar mağdurlarında, sosyal yaşam kalitesine ilişkin olumsuz algılarla ilişkili olarak serum OT konsantrasyonlarının önemli ölçüde düşük olduğu gösterilmiştir (Jahangard ve ark., 2020). Şizofreni hastalarında beyin omurilik sıvısındaki OT seviyelerinin arttığı, serumlarında ise azaldığı bulunmuştur (Hernández-Díaz ve ark., 2021). Bunların yanında oksitosinin, ebeveynlik

davranışını, çift bağını ve ilişki kurma davranışını etkileyebildiği gösterilmiştir (de Jong, & Neumann, 2018). Daha olumsuz koşullar altında büyüyen insanların, daha düşük içsel OT'ye sahip olma eğiliminde olduğu ortaya koyulmuştur (Ellis, Horn, Carter, van Ijzendoorn, & Bakermans-Kranenburd, 2021). Böylece OT, sosyal yakınlığı, bağlanmayı ve toplum yanlısı davranışları artırabildiği çalışmalarla ortaya koyulmuştur. Bu işlevler, OT'nin nöromodülasyondaki temel rolünü göstermektedir.

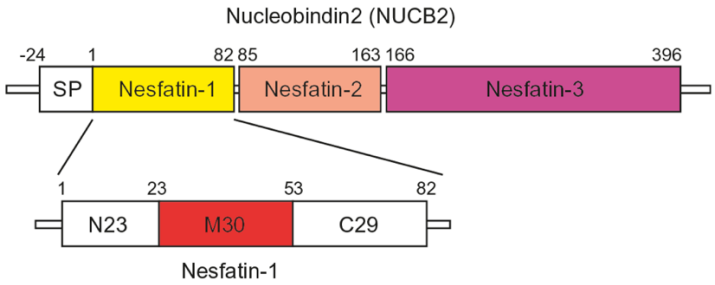
2.8. Nesfatin-1

2.8.1. Nesfatin-1'in Keşfi ve Yapısı

Hipotalamik iştahı düzenleyen çekirdeklerde, bir kalsiyum bağlama alanına (EF alanı) ve DNA bağlama alanına sahip olan bir salgı proteini NEFA'nın (Nükleer EF-el asidik, Ca2+ bağlama) veya nükleobindin 2 (NUCB2)'nin mevcut olduğu gösterilmiştir (Barnikol ve ark., 1994). Yeni tokluk maddeleri bulmak için yapılan çalışmada peroksizom proliferatörü ile aktive edilen reseptör γ (PPARγ) agonisti olan troglitazon tarafından aktive edilen genler araştırılmış ve NEFA/NUCB2 geninin hem beyinde hem de adipositlerde up-regüle edildiği bulunmuştur. İn siliko analizler, NUCB2'nin prohormon dönüştürücüler (PC) tarafından proteolitik işlenmesi, 82 amino asitten oluşan bir N-terminal fragmanı elde edilmesi ile sonuçlanmıştır. Nesfatin, posttransyonal olarak 399 amino asitlik protein NUCB2'den prohormon dönüştürücüler PC3/1 ve PC2 tarafından N-terminal nesfatin-1 [1–82aa], nesfatin-2[85–163aa] ve C-terminal nesfatin-3[166– 396aa]'e ayrılmaktadır (Şekil 11) (Oh-I ve ark., 2006; Palasz ve ark., 2012). Nesfatin-1, insanlarla memeliler ve hatta alt omurgalılar arasındaki sekanslarında %85'in üzerinde önemli bir homolojiye sahip olduğu bildirilmiştir (Gonzales, Kerbel, Chun, & Unniappan, 2010).

Sıçanlarda, NUCB2'nin N-terminal fragmanının PVN ve beyin omurilik sıvısındaki ekspresyonunun açlıkla azaldığı gösterilmiştir. Farelerde bu parçanın intraserebroventriküler (i.s.v.) enjeksiyonunun gıda alımını baskılaması ile bu işlenmiş peptit nesfatin-1 (NEFA/nucleobindin-2 Encoded Satiety and FAT influencing proteIN-1) olarak adlandırılmıştır (Oh-I ve ark., 2006). Aynı çalışmada nesfatin-1'in gıda alımını baskıladığı, hatta leptin geni susturulmuş olan obez

farelerde de besin alımını baskıladığı bulunmuştur. Bu bulgu, nesfatin-1'in leptin yolundan bağımsız olarak çalıştığını ortaya koymuştur (Oh-I ve ark., 2006).



Şekil 11. NUCB2 ve Nesfatin-1 oluşum şeması (Garcia-Galiono ve ark., 2010a'dan uyarlanmıştır).

Nesfatin-1'in yapısı üç bölümden oluşur; ilk bölüm N-terminal ucundan başlar ve 23. aa'ya (N23) kadar devam eder. İkinci kısım 23aa ile 53aa arasındaki 30 aa'lık (M30) orta segmentini içerir. Üçüncü bölüm ise 53aa ile 82aa arasında 29 aa'lık (C29) C-terminal segmenti içerir (Şekil 11). M30 yani orta segmentin gıda alımı ve iştah kontrolünde etkili olduğu gösterilmiştir (Oh-I ve ark., 2006). Hatta orta segment, alfa-melanosit uyarıcı hormon (a-MSH)'un ve agouti ile ilişkili peptitin (AgRP) amino asit dizisine benzerdir ve bu dizinin, anoreksijenik aktivitesi açısından kritik öneme sahip olduğu bildirilmiştir (Shimizu ve ark., 2009a).

2.8.2. Nesfatin-1 Ekspresyonu

Sıçan hipotalamusunda, arkuat çekirdek, paraventriküler çekirdek, supraoptik çekirdek, dorsomedial hipotalamus, lateral hipotalamusta ve zona insertada lokalize olan nöronlar, nesfatin-1 ekspresyonu ile karakterize edilmektedir (Gok-Yurtseven, Kocoglu, Minbay, Eyigor, 2020; Shimizu ve ark., 2009b; Stengel ve ark., 2010,). Nesfatin-1'in anoreksijenik etkisinin çoğunlukla ilk üç düzenleyici hipotalamik merkezde gerçekleştirildiği varsayılmaktadır. Nesfatin-1 immünopozitif nöronlar, beyin sapında ve serotoninerjik nöronları içeren raphe pallidus (RPa), raphe obscurus (ROb) ve kolinerjik nöronları içeren Edinger-Westphal çekirdeği (EW) ve vagus sinirinin dorsal çekirdeğinde de gösterilmiştir (Foo, Brismar, & Broberger, 2008). Bazı sempatik aksonlar raphe çekirdeklerinden köken alıp kahverengi yağ hücrelerinde sonlandıkları için nesfatin-1'in termogenezin düzenlenmesinde rol

aldığı ileri sürülmüştür (Brailoiu ve ark., 2007). Yapılan çalışmada, vagus sinirinin sinaptik uçlarından salınan nesfatin-1'in, gastrointestinal sistemin sekretuvar ve motor aktivitesini etkilediği ve sindirim fonksiyonlarını düzenleyebileceğini ortaya koymuştur (Goebel, Stengel, Wang, Lambrecht, & Tache, 2009b; Stengel ve ark., 2010). Ayrıca, beyin sapının diğer yapılarında, soliter çekirdekte (NST), dorsal raphe çekirdeğinde, rafe magnus çekirdeğinde, gigantoselüler retiküler çekirdekte, lateral parabrakiyal çekirdekte, omuriliğin torasik, lumbar ve sakral segmentlerinden köken alan sempatik ve parasempatik preganglionik nöronlarda da nesfatin-1 varlığı tespit edilmiştir (Goebel ve ark. 2009b).

Hipotalamusun PVN ve SON bölgelerinde nesfatin-1, oksitosin ve vazopressin ile birlikte eksprese edilmektedir. PVN bölgesinde nesfatin-1 eksprese eden nöronların %24'ünün oksitosin, %18'inin vazopressin, %13'ünün kortikotropin salgılatıcı hormon (CRH) ve %18'inin tirotropin salgılatıcı hormon (TRH) için de pozitif olduğu gösterilmiştir. SON'de nesfatin-1 pozitif nöronların %35'inin oksitosin ve %28'inin vazopressin eksprese ettiği bildirilmiştir (Kohno ve ark., 2008). ARC'de nesfatin-1'in kokainamfetamin ile düzenlenen transkript (CART) ile tirozin hidroksilaz, lateral hipotalamik alanda ise CART ve melanin konsantre edici hormon (MCH) ile ko-lokolize olduğu ortaya koyulmuştur. Nesfatin-1 ayrıca dorsal vagus sinirinde kolin asetil transferaz, soliter traktus çekirdeği (NTS)'inde tirozin hidroksilaz ve kaudal raphe'de 5-hidroksitriptamin ile birlikte lokalize olduğu bildirilmiştir (Brailoiu ve ark., 2007; Fort ve ark., 2008).

Nesfatin-1'in merkezi sinir sistemi dışında yağ dokusu, mide mukozası, endokrin pankreatik beta hücreleri ve testis gibi periferik dokulardan da salgılandığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Mide oksintik mukozasında ekspresyon düzeyi beyne göre 20 kat daha yüksek bulunmuştur (Garcia-Galino ve ark., 2010b; Goebel-Stengel, & Wang, 2013; Gonzales ve ark., 2009; Stengel, & Tache, 2010; Stengel ve ark., 2009b; Price ve ark., 2007).

Nesfatin-1'in, pasif difüzyon mekanizma yoluyla KBB'yi geçtiği rapor edilmiştir, bu da midede üretilen nesfatin-1'in merkezi olarak etki edebilme olasılığını sağlamaktadır. Nesfatin-1'in dolaşımdaki yarı ömrü 9-10 dakika olarak bulunmuştur (Pan, Hsuchou, & Kastin, 2007; Price ve ark., 2007).

2.8.3. Nesfatin-1'in İşlevleri

Nesfatin-1'in anoreksijenik etkisi, nesfatin-1'in merkezi olarak enjekte edildiği ad libitum beslenen sıçan ve farelerde (Maejima ve ark. 2009, Goebel-Stengel, Wang, Stengel, & Tache, 2011; Gotoh ve ark., 2013; Könczöl ve ark. 2012; Stengel ve ark. 2009a; Yosten, & Samson 2009) ve aç bırakılan hayvanlarda (Wernecke, Lamprecht, Jöhren, Lehnert, & Schulz, 2014; Yosten & Samson 2009) yapılan çalışmalarla da doğrulanmıştır. Yalnızca bir çalışma nesfatin-1'in, aç bırakılmış hayvanlarda sisterna magnaya verildiğinde aydınlık fazda gıda alımını baskılamada başarısız olduğunu göstermiştir (Stengel ve ark., 2009a). Nesfatin-1'in intranazal olarak verildiğinde, leptine benzer şekilde gıda alımını azalttığı bulunmuştur (Shimizu ve ark., 2009b). Nesfatin-1'in periferik uygulamadan sonra gıda alımının baskılanmasındaki rolleri de araştırılmıştır. İntraperitoneal (i.p.) olarak uygulanmasının hem zayıf hem de db/db leptine dirençli obez farelerde gıda alımını azalttığı bildirilmiş ve periferik nesfatin-1'in de leptinden bağımsız bir şekilde anoreksiyi tetiklediğini öne sürmüştür. (Shimizu ve ark. 2009a)

Endojen NUCB2/nesfatin-1'in kendisi beslenme davranışını düzenlese de ekspresyonu beslenme durumu tarafından da düzenlenebilir. Kemirgenlerde, merkezi olarak hem SON hem de PVN'de (Oh-I ve ark., 2006; Kohno ve ark., 2008; Garcia-Galiano ve ark., 2010b) periferik olarak ise deri altı yağ dokusunda (Ramanjaneya ve ark., 2010) ve plazmada (Stengel ve ark., 2009a), NUCB2 mRNA ve nesfatin-1 protein düzeylerinin açlıkta azaldığı, yeniden beslenmeyle normale döndüğü bulunmuştur.

Nesfatinerjik sistemin beslenme davranışını düzenlediği ve birçok sistemle etkileşime girdiği gösterilmiştir. Örneğin nesfatin-1'in neden olduğu anoreksijenik etki, MC3/4 reseptör antagonisti SHU9119'un merkezi uygulanmasıyla bloke edilmiştir (Oh-I ve ark. 2006, Yosten, & Samson 2009). Nesfatin-1'in merkezi veya periferik uygulanmasının sıçanlarda, hipotalamik alanlarda görülmeyen ancak soliter traktust çekirdeğinde (NTS) proopiomelanokortin (POMC) ve kokain ve amfetamin ile ilişkili transkript (CART) mRNA ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Oh-I ve ark., 2006, Shimizu ve ark., 2009b; Wernecke ve ark., 2014). Bu iki sistem arasındaki etkileşim, PVN'de α-melanosit uyarıcı hormon (α-MSH) uygulamasının

Nucb2 mRNA ekspresyonunu arttırdığının (Oh-I ve ark., 2006) ve NUCB2/nesfatin-1 nöronlarını aktive ettiğinin (Sedbazar, Ayush, Maejima, & Yada, 2014) bulunmasıyla da desteklenmiştir.

Nesfatin-1'in oksitosinerjik sistemle ilişkisi ortaya koyulmuştur. Yapılan çalışmalarda endojen nesfatin-1'in PVN'de oksitosin salınımını değiştirdiği gösterilmiştir (Maejima ve ark., 2009). Bununla birlikte, nesfatin-1'in merkezi olarak uygulanmasının, sıçanlarda plazma bazal oksitosin seviyelerini etkilememiştir (Yosten, & Samson, 2010). Bu da magnoselüler PVN ve/veya SON nöronlarından aksonal oksitosin salınımının etkilenmediğini göstermektedir.

Nesfatinerjik sistemin aynı zamanda beslenme davranışını modüle etmek için kortikotropin salıverici faktör (CRF)/CRF2 reseptör sistemi ile etkileşime girdiği de bulunmuştur. Nesfatin-1'in CRF eksprese eden nöronların uyarılabilirliğini etkilediği (Price ve ark., 2008) ve aynı zamanda PVN'de CRF protein seviyelerini arttırdığı (Gotoh ve ark., 2013) gösterilmiştir. Ön beyine enjekte edilen spesifik bir CRF2 reseptör antagonistinin (astresin2-B) nesfatin-1'in anoreksijenik etkisini tamamen ortadan kaldırdığı görülmüştür (Stengel ve ark., 2009a).

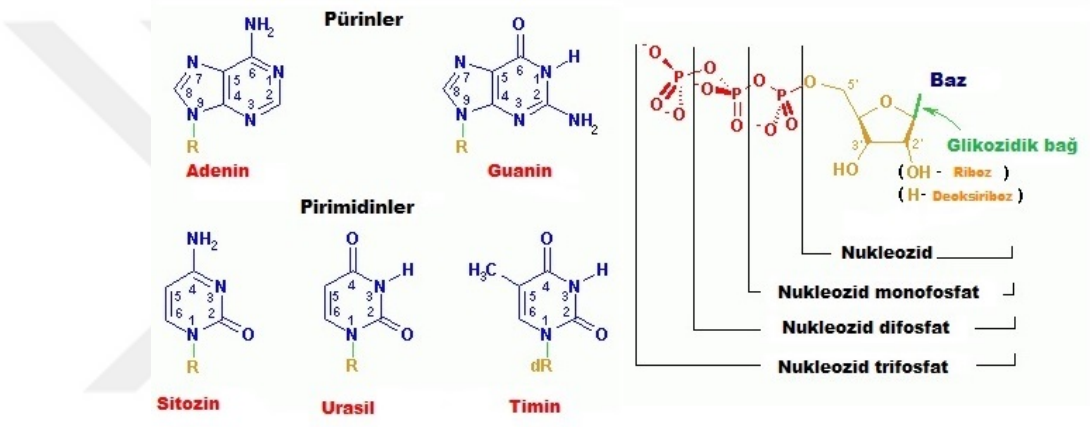
Nesfatin-1'in sadece beslenme davranışında değil aynı zamanda vücut sıvı düzenlenmesinde de rol oynadığı gösterilmiştir (Yosten, & Samson, 2009, 2010; Könczöl ve ark. 2012, Yosten, Redlinger, & Samson, 2012, Yoshimura ve ark., 2014). İlk yapılan çalışmada nesfatin-1'in i.s.v. enjeksiyonunun su alımını azalttığı ve bu etkiyi MC3/4 ve oksitosin reseptörleri üzerinden yaptığı gösterilmiştir (Yosten, & Samson, 2009).

Yapılan çalışmalar nesfatin-1'in besin alımının düzenlenmesine ek olarak üreme süreçlerinde, strese yanıtta, zihinsel ve nörolojik bozuklukların patolojisinde de önemli rol oynayan bir nöropeptit olduğunu ortaya koymuştur (Aydin ve ark., 2011; Dore ve ark., 2017; Ekizceli, Halk, Minbay, & Eyigor, 2021; Könczöl ve ark., 2010; Ogiso ve ark., 2011).

2.9. Nükleotidler

Nükleotidler, hücresel metabolizmada önemli roller oynarlar. Hücrelerin hormonlara ve ekstrasellüler uyarılara tepkisindeki kimyasal bağlantılar için

gereklidir. Genetik bilginin moleküler depoları olan deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asitin (RNA) bileşenidirler. Hücreler, genetik bilginin kullanımı ve saklanması, metabolik düzenlemeyi içeren çeşitli hücresel süreçlerde merkezi bir rol oynayan birçok nükleotid türü içerir. Nükleotidler, azot içeren bir baz, beş karbonlu bir şeker (pentoz) ve bir veya daha fazla fosfat gruplarından oluşur. Pürinler ve pirimidinler, azotlu bazların bileşenleridir. Pürin bazları çift halka sistemi içerirken, pirimidin bazları tek halka yapısını içerir. Nükleotidlerde bulunan pürin bazları Adenin (A) ve guanin (G), primidin bazları ise Sitozin (C), Timin (T) ve urasil (U)'dir (Bowater, & Gates, 2015) (Şekil 12).



Şekil 12. Nükleotidlerin yapısı (''Nükleotid'', 2023).

Organizmaların hücre içi ve hücre dışı sıvılarında bulunan nükleozidler, nükleotidlere çok benzer yapılara sahiptir, ancak sadece β-N-glikozit bağıyla bir şekerle birleşen bazdan oluşur (Şekil 12). Nükleotidler, şekerin 5' hidroksil grubuna bağlı esterleşmiş bir, iki veya üç fosfat grubuna sahip nüklezidlerdir. Nükleozid monofosfatlar esterleşmiş tek fosfat esterine sahiptir. Nükleozid difosfatlar iki fosfat grubu içerirken, nükleozid trifosfatlar üçüncü bir fosfat daha içerir. Tablo 2'de nükleotid, nükleozidler ve çeşitli nükleozid fosfat formları gösterilmektedir.

Tablo 2. Nükleozid ve Nükleotidlerin Terminolojisi

BAZLAR		PÜRİNLER		PİRİMİDİNLER	
		ADENİN (A)	**GUANİN**	**SİTOZİN**	**URASİL TİMİN**
Nükleozidler	**RNA' da**	Adenozin	Guanozin	Sitidin	Uridin
	DNA' da	Deoksiadenozin	Deoksiguanozin	Deoksisitidin	Deoksisitidin
Nükleotidler	**RNA' da**	Adenilat	Guanilat	Sitidilat	Uridilat
	DNA' da	Deoksiadenilat	Deoksiguanilat	Deoksisitidilat	Deoksitimidilat
Nukleozid monofosfatlar		AMP	GMP	CMP	UMP
Nukleozid difosfatlar		ADP	GDP	CDP	UDP
Nukleozid trifosfatlar		ATP	GTP	CTP	UTP

2.10. Üridin

Üridin, RNA sentezi için gerekli bir pirimidin nükleoziddir. Memelilerde novo biyosentez yolağı ile sentezlenebilir (Connolly, & Duley, 1999; Urasaki, Pizzorno, & Le, 2011; Yamamoto ve ark., 2011). Üridin sitotoksisiteyi azaltmada (McEvilly, Popelas, & Tremmel, 2011) ve nörofizyolojik fonksiyonları iyileştirmede yaygın olarak kullanılmaktadır (Gallai, Mazzotta, Montesi, Sarchilli, & Del Gatto, 1992; Mironova ve ark., 2018). Üridin insanlarda kan ve beyin omurilik sıvısında bulunur ve plazmada üridin içeriği diğer pürin ve pirimidin nükleozidlerinden çok daha yüksektir (Cao, Leffert, McCabe, Kim, & Pizzorno, 2005; Le, Urasaki, & Pizzorno, 2014).

Birçok doku üridin sentezleyemez, hücresel fonksiyonları sürdürebilmek için plazma üridinini kullanmaktadırlar (Greenhill, 2017; Yamamoto ve ark., 2011). Bu nedenle plazma üridini endojen pirimidin sentezi için kullanılabilir. Üridin biyosentezi karaciğer ve yağ dokuda düzenlenir. Üridinin atılımı ise esas olarak böbreklerden ve dokudan pirimidin katabolizması yoluyla olmaktadır (Ison ve ark., 2016). Birçok araştırma, üridin homeostazının sistemik metabolizmayı düzenleyen çeşitli faktörlerden etkilendiğini göstermiştir. Üridin konsantrasyonunu düzenlediği kabul edilen faktörler arasında üridin fosforilaz (UPaz), beslenme davranışı ve ATP tükenmesi yer alır (Le ve ark., 2013).

2.10.1. Üridin Biyosentezi ve Katabolizma Yolu

Pirimidin nükleotid metabolizması, de novo sentez yolağı, kurtarma sentez yolağı ve katabolizma ile düzenlenir. Nükleotidler hücrede *de novo* sentezi ile basit bir metabolitten sentezlenir veya kurtarma sentez yolu tarafından tekrar geri dönüştürülür (Yamamoto ve ark., 2011). Üridin normal vücut fonksiyonlarını sürdürmek için yetersiz olduğunda, normal büyüme ve hücre fonksiyonlarının devamlılığı için diyetle eksojen alınmaktadır (Vincenzetti, Polzonetti, Micozzi, & Pucciarelli, 2014). Katabolizma sırasında üridin β-alanine dönüştürülür ve bunu beyin ve kas dokularına sekresyonu takip ettiği bildirilmiştir (Yamamoto ve ark., 2011).

2.10.2. Üridinin Biyosentez Mekanizması

Üridin *de novo* sentez yolağı ile glutaminden oluşur ve üridin biyosentezi sırasında hız sınırlayıcı enzimleri kodlayan CAD proteini tarafından katalize edilir. CAD, karbamoil fosfat sentetaz (CPS II), aspartik transkarbamoilaz (ATCase) ve dihidroorotaz (DHO) enzimlerini içerir (Vincenzetti ve ark., 2016). *De novo* yolunda, glutaminin CAD tarafından katalizlenmesi ile ara metabolitler olan karbamoil fosfat, karbamoil aspartat ve dihidroorotat oluşur. Pirimidin biyosentezindeki dördüncü adım, önemli bir ara madde olan orotat oluşturmak için dihidroorotat dehidrojenaz (DHODH) tarafından katalize edilir (Vincenzetti ve ark. 2014). Sonra orotat, orotat fosforiboziltransferaz ile sırasıyla orotidin monofosfata (OMP) ve üridin monofosfat (UMP) dönüştürülür. Daha sonra UMP, nükleotidaz ile üridin'e defosforile edilir. Ek olarak üridin sitidin deaminaz tarafından sitidin'den de oluşturulur (Greenhill, 2017; Le ve ark., 2013; Yamamoto ve ark., 2011). Ayrıca, üridin pirimidin kurtarma yoluyla UTP ve sitozin trifosfat (CTP)'tan elde edilebilir.

Pirimidin nükleotid kurtarma sentez yolunda, üridin/sitidin kinaz 2 (UCK2) pirimidin nükleotidlerinin monofosfat gruplarına fosforile edilmesinden sorumlu fosforilaz olarak görev yapar. Nükleosid monofosfat kinaz, üridin difosfat (UDP) ve sitozin difosfat (CDP) üretmek için UMP ve CMP'yi fosforile eder. Sonra UTP ve CTP üretmek için UDP ve CDP nükleozid difosfat kinaz tarafından fosforile edilir.

Daha sonra UTP ve CTP sadece gen çoğaltılması için kullanılır (Vincenzetti ve ark., 2016).

2.10.3. Üridin Katabolizması

Üridin katabolizması, protein asetilasyon artışına neden olan β-alanin ve asetil-CoA üretir (Le ve ark., 2013; Urasaki, Pizzorno, Le, 2014). Üridin UPP geni tarafından kodlanan üridin fosforilaz (UPase) tarafından urasile indirgenir. UPase'in omurgalılarda UPase1 ve UPase2 olmak üzere iki homolog formu bulunmaktadır (Cao, & Pizzorno, 2004; Cao ve ark., 2005; Le ve ark., 2013). UPP1 geni tarafından kodlanan UPase1 üridin homeostazını düzenler ve her yerde ifade edilir. UPase1'i kodlayan genin nakavt edilmesi veya UPase1'in enzimatik aktivitesinin inhibisyonunun, plazma ve dokuda yüksek üridin seviyelerine neden olduğu gösterilmiştir (Cao ve ark., 2005; Cao ve ark., 2011). Son aşamada urasil dihidropirimidin dehidrogenaz (DPD) ve hidropirimidin hidrataz (dihidropirimidinaz olarak da bilinir) tarafından dihidrourasil ve N-karbamoil-β-alanin'e ayrıştırılır. Sonraki aşamada β-üreidopropionaz aracılığıyla β-alanin oluşur. β-alanin vücuttan atılır veya beyin ve kas dokulardaki bazı yapılara katılabilir (Zhang ve ark., 2020).

2.10.4. Üridin Konsantrasyonunu Düzenlenme Mekanizması

Memelilerde plazma üridin konsantrasyonu 3-8 μM olarak bulunmuştur. Bu miktar diğer pirimidin nükleotidlerinden ve bazlardan daha yüksektir (Pizzorno, Cao, Leffert, Russel, Zhang, & Handschumacher, 2002; Yamamoto ve ark., 2011). Plazma üridin konsantrasyonu hem insanlar hem de kemirgenlerde, çeşitli faktörler tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir (Deng ve ark., 2017).

2.10.4.1. Beslenme Davranışında Plazma Üridin Konsantrasyonu

Son zamanlarda yapılan bir dizi araştırma, dinamik plazma üridin düzenlenmesinin beslenme davranışı ile ilgili olduğunu göstermiştir (Zhang ve ark., 2020). Üridin biyosentezinde ana organ olan karaciğerin, farklı beslenme

durumlarında, glukoz metabolizmasını düzenleyerek üridin homeostazını koruduğunu ortaya koyulmuştur (Deng ve ark., 2017; Greenhill, 2017). Besleme döneminde, üridin sentezi esas olarak karaciğer dokusunda meydana gelir. Ancak, açlık döneminde, üridin sentezi adipositlere bağlıdır, çünkü karaciğer glikoz üretimine odaklanır (Greenhill, 2017). Yapılan deneyler açlık ve yeniden beslemenin plazmada üridin seviyerinde nasıl değişikliklere neden olabileceğini C57BL/6 farelerinde, Sprague-Dawley sıçanlarda ve sağlıklı dişi bireylerde ortaya koymuştur. Açlık durumunda yağ dokusu, üridin biyosentezi ile üridin plazma konsantrasyonunu arttırırken, beslenme sonrası üridin seviyeleri hızlıca düşmektedir. Gerçekleşen azalma yağ dokusunda azalan üridin biyosentezi ile ilişkilendirilmiştir (Henricks ve ark., 2018).

2.10.4.2. Yağ Dokusu ve Plazma Üridin

Son çalışmalar, yağ dokusunun plazma üridin homeostazında vazgeçilmez bir rol oynadığını göstermiştir. Plazma üridin seviyeleri ATP yıkımı tarafından indüklenen pirimidin degredasyonu ile yükseltilebilir. Apoptoz ile adipositleri seçici olarak ortadan kaldırılan FAT-ATTAC farelerinde, farklı beslenme koşullarında açlık durumunda yağ dokusunun plazma üridin seviyelerinin düzenlenmesinde rol alıp almadığı değerlendirilmiştir. Ek olarak, Agpat 2 (1-asilgliserol-3-fosfat-O-asiltransferaz 2) susturulmuş farelerde (beyaz ve kahverengi yağ bulunmayan) açlık durumunda plazma üridin seviyesi artışı için yağ dokusunun önemli olduğu gösterilmiştir. Yağ dokusunun plazma üridin homeostazını düzenleme mekanizmasını açıklayabilmek için araştırmacılar, ürettikleri yağ dokusuna özgü bir CAD nakavt farelerde, 24 saat açlıktan sonra plazma üridin seviyelerinde artış olmadığını ortaya koymuştur. Bu durum açlıkla indüklenen plazma üridin seviyelerindeki artışın adipositlerdeki üridin biyosentezi ile ilişkili olduğunu ortaya çıkarmıştır (Deng ve ark., 2017).

2.10.4.3. ATP Tükenmesi ve Üridin Konsantrasyonu

Yapılan çalışmalarda ATP ve üridin arasındaki ilişki ortaya koyulmuştur. Bu durum UTP'nin, ATP'yi fosfat olarak kullanarak UDP'de üretmesiyle açıklanmıştır. Diğer taraftan ATP konsantrasyonundaki bir azalma, UDP'nin UTP'ye fosforilasyonunda bir azalmaya yol açmaktadır ve bu durum UDP ve UMP'de artışına neden olmaktadır. ATP konsantrasyonunda bir artış ise urasil nükleotidlerin (UTP⟶UDP⟶UMP⟶üridin) parçalanmasını hızlandırır ve plazma üridin artar (Yamamoto ve ark., 1997; Yamamoto ve ark., 1999).

2.10.5. Üridinin Taşınması

Beynin dolaşımdaki üridini aldığı 1970'lerin başından beri bilinmektedir. (Hogans, Guroff, & Undenfriend, 1971). Daha sonra Cornford ve Oldendorf (1975), tek bir enjeksiyon metodu kullanarak adenin, adenozin, guanosin, inosin ve üridinin, sıçan KBB'yi geçebildiğini, sitidin, timidin ve ilgili bazların geçemediğini göstermiştir.

Nükleozid taşınması üzerine daha ileri çalışmalar, nükleozid taşıyıcılarının, nükleozid analogu S-(4-nitrobenzil)-6-tiyoinosine (NBTI) duyarlılıklarına göre, NBTI'ye duyarlı veya NBTI'ye duyarsız olarak iki gruba sınıflandırılabileceğini öne sürmüştür (Belt, 1983). Birkaç yıl sonra, fare bağırsak epitel hücrelerinde tamamen farklı tipte bir nükleozid taşıyıcı ailesinin bulunması (Vijayalakshmi, & Belt, 1988), nükleozid taşıyıcılarının yeni bir sınıflandırmasına, yani dengeleyici (Na+'dan bağımsız, düşük afiniteli) ve konsantre (Na+'ya bağımlı, yüksek afiniteli) taşıyıcı aileleri şeklinde sınıflandırılmasına yol açmıştır.

Pirimidin nükleozidleri iki farklı taşıyıcı protein ailesi olan konsantre edici nükleozid taşıyıcısı (Concentrative Nucleoside Transporter-CNT) ve dengeleyici nükleozid taşıyıcısı (Equilibrative Nucleoside Transporter-ENT) ile hücrelere alınırlar. CNT ailesi, Na^+-bağımlı yüksek afiniteli taşıma, ENT ailesi ise Na^+-bağımsız düşük afiniteli taşıma özelliğine sahiptir. Dengeleyici nükleozid taşıyıcısı ENT1-4 olmak üzere 4 gen tarafından, konsantre edici nükleozid taşıyıcısı ise CNT1-3 olmak üzere 3 gen tarafından kodlanır (King, Ackley, Cass, Young, & Baldwin, 2006; Rose, & Coe, 2008). Beyin endotel hücrelerinin ENT1, ENT2 ve CNT2

içerirken, koroid pleksus epitel hücrelerinin de CNT3'ü eksprese ettiği gösterilmiştir (Redzic ve ark., 2005). İnsan koroid pleksus epitel hücrelerinde ENT2 ve CNT'ün baskın olduğu ortaya koyulmuştur (Redzic, Malatiali, Grujicic, & Isakovic, 2010). Ayrıca yapılan çalışmada beyin endotel hücrelerinde bulunan CNT2 ve ENT2'nin interstisyel sıvıya bakan hücre yüzeyinde, koroid pleksusta bulunan CNT'lerin ise beyin omurilik sıvısına bakan yüzeyde bulunduğu belirlenmiştir (Redzic ve ark., 2005). Dolaşımdaki üridinin KBB boyunca dengeleyici taşıyıcılar tarafından taşındığı ve bu sürece ENT1 ve ENT2'in aracılık ettiği fare ve sıçanlarda gösterilmiştir (Murakami ve ark., 2005; Redzic ve ark., 2005). RT-PCR ve immünoblotlama yöntemleri ile adenozin gibi pürinleri ve üridin gibi pirimidenleri taşıyan bir CNT proteini olan CNT2'nin sıçan KBB'sinde ifade edildiği gösterilmiştir (Li, Boado, & Pardridge, 2001; Redzic ve ark., 2005).

Bileşiklerin beyne başka bir geçiş yolu koroid pleksus (KP) epiteli olabilir. Önceki araştırmalar nükleozidlerin KP epiteli yoluyla beyne taşındığını göstermiştir (Spector, & Berlinger, 1982; Spector, & Huntoon, 1983; Spector, 1985). Ayrıca pürinler ve pirimidinler için taşıyıcı proteinlerden ENT1, ENT2 ve CNT3'ün (Gray, Owen, & Giacomini, 2004), sıçan (Anderson, Baldwin, Young, Cass, Parkinson 1999a; Anderson ve ark., 1999b; Redzic ve ark., 2005) ve tavşan (Wu, Yuan, Brett, Hui, & Giacomini, 1992; Wu, Gutierrez, & Giacomi, 1994) beyninin KP epitel hücrelerinde lokalize olduğu gösterilmiştir.

Üridinin beyinde ekstrasellüler sıvıdan alımı, bu iki nükleozid taşıyıcı ailesi üyeleri tarafından yönetilmektedir. Her iki aileden nükleozid taşıyıcıları, tüm beyin homojenatlarında elde edilmiştir (Lu, Chen, & Klaassen, 2004; Redzic ve ark., 2005). Topografik ve hücresel incelemeler, taşıyıcının tipine göre beyindeki lokalizasyonlarında farklılıklar olduğunu göstermiştir. (Guillén-Gómez ve ark., 2004). Beyinde üridinin uzaysal alımındaki farklılıklar, hücre dışı üridin konsantrasyonundaki farklılıklarla ilişkilendirilmiştir (Dobolyi ve ark., 1998).

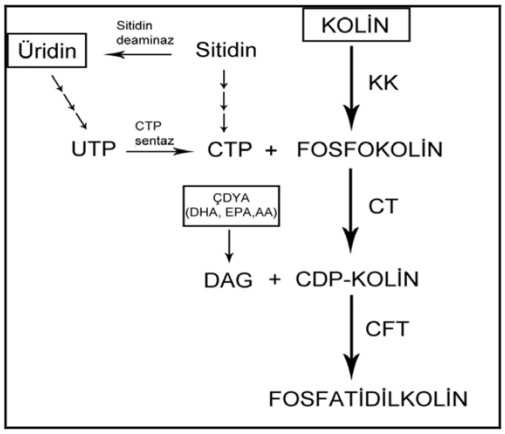
2.10.6. Merkezi Sinir Sisteminde Üridin

Üridin, beyinde pirimidin metabolizmasında önemli bir role sahiptir. Sinir dokusuna destek sağlar ve bir dizi önemli metabolik sürece katılır. Üridin ve

nükleotid türevleri ayrıca merkezi sinir sisteminde sinyal molekülleri olarak görev yapmaktadır (Dobolyi, Juhansz, Kovacs, & Kardos, 2011).

Diyetteki pürinler ve pirimidinler gastrointestinal sistemde emilir (Sonoda ve ark., 1978). İnsan ve gerbillerde plazmada sitidin deaminaz aktivitesi nedeniyle üridin baskın formken sıçanlarda sitidinin plazma konsantrasyonu fazladır (Cansev, 2006). Beyinde, elektrofizyolojik aktivite için gerekli pirimidinin *de novo* sentezi düşük olup çoğu plazma kaynaklıdır (Bourget, & Tremblay, 1972; Cornford, & Oldendorf, 1975, Geiger, & Yamasaki, 1956). Oral olarak üridin ve sitidin uygulamasının plazma üridin seviyelerini değiştirdiği deney hayvanlarında ve insanlarda gösterilmiştir (Cansev, Watkins, Van Der Beek, Wurtman 2005; Van Groeningen, Peters, Nadal, Laurensse, Pinedo, 1991; Wurtman ve ark., 2000). Bunun yanında oral ya da sistemik olarak uygulamayı takiben üridinin plazma ve beyin seviyesinde değişim olduğu gösterilmiştir (Cansev ark., 2005; Peters ve ark., 1987). Yapılan çalışmada gerbillerde, üridin kaynağı olarak, oral yolla verilen tek doz üridin monofosfatın hem plazmada hem de beyinde üridin seviyesinde 2 kat artışa neden olduğu ortaya koyulmuştur (Cansev ve ark., 2005). Diğer bir çalışmada ise farelere intraperitoneal (i.p.) üridin enjeksiyonu sonrası, plazma seviyesinde 3 kat, beyinde ise 7 kat artış olduğu gösterilmiştir (Peters ve ark.,1987).

Beyin hücrelerinde pirimidin nükleozidlerinin aracılık ettiği biyolojik süreçlerin başında fosfolipid sentezi gelmektedir. Üridin ve sitidin'in sinir hücrelerinde CTP'ye dönüşmek suretiyle Kennedy yolağı üzerinden beyinde fosfatidilkolin ve fosfatidiletanolamin gibi major fosfolipidlerin sentezine katıldıkları deneysel çalışmalarla kanıtlanmıştır (Şekil 12) (Cansev, 2006; Ignacio, & Wurtman, 1999; Kennedy, Weiss, 1956;).



Şekil 12. Kennedy Yolağı (Cansev, & Wurtman, 2007'den uyarlanmıştır).

Pirimidinler fosfolipid yapımına katılmanın yanısıra reseptör aktivasyonu aracılığı ile çeşitli beyin fonksiyonlarında rol oynuyor olabilirler. 1970'li yıllarda yapılan çalışmlarda ATP'nin klasik nörotransmitterlerle birlikte depolanıp salınması ile elde sonuçlar "pürinerjik nörotransmisyon" kavramına ortaya çıkarmıştır. Bu kavramda ilk olarak ATP'nin periferik sinir sisteminde ekstraselüler sinyal molekülü olarak tanımlanmasından sonra merkezi sinir sisteminde benzer etkinliği keşfedilmiştir (Verkhratsky, Ximmermann, Abbracchio, Illes, & Divirgilio, 2020)

Pirimidin nükleotidlerine duyarlı P2Y reseptörlerinin beyinde keşfi ve pirimidin nükleotidlerinin kültürdeki glial hücreler tarafından salgılanmasının ortaya koyulması, pirimidin nükleotidlerinin de ATP gibi ekstrasellüler sinyal molekülleri olabileceğini düşündürmüştür. Bu durum MSS'de pirimidinerjik transmisyonun varlığını kanıtlar niteliktedir. Nöronal hücrelere taşınma sistemi ile alınan üridinin pirimidin nükleotid sentezinde kullanıldığı hücre kültürü çalışmalarıyla gösterilmiştir (Cansev, 2006). Ayrıca üretilen pirimidin nükleotidlerinin hem bazal hem de stres koşullarıda glial hücrelerden salgılandığı bildirilmiştir (Lazarowski, Homolya, Boucher, & Harden, 1997; Lazarowski, Homolya, & Boucher, 2000).

2015 yılında in vivo "Pirimidinerjik Nörotransmisyon" kavramı bilimsel literatüre kazandırılmıştır. Bu çalışmada, beyinde bazal ve depolarizasyon ile indüklenen koşullarda ekstrasellüler alana üridin, UDP ve UTP'nin salınımı gösterilerek in vivo pirimidinerjik nörotransmisyon kanıtlanmış ve pirimidinerjik nörotransmisyonun aktive edilmesini takiben $P2Y_2$ reseptörleri aracılığıyla kolinerjik nörotransmisyonun uyarıldığı gösterilmiştir (Cansev ve ark., 2015).

2.11. P2Y Reseptörleri

Hücre dışındaki nükleotidler bir dizi reseptörü uyarabilirler. İlk olarak pürinerjik reseptörler 1976'da tanımlanmıştır (Burnstock, 1976). İki yıl sonra, P1 ve P2 reseptörleri tanımlanarak iki pürinoseptör ailesi önerilmiştir. Kısa bir süre sonra, P1 (adenozin) reseptörünün iki alt tipi ile (Londos, Cooper, & Wolff, 1980; Van Calker, Müller, & Hamprecht, 1979) 1985'te P2 reseptörünün iki alt tipi olan P2X ve P2Y tanımlanmıştır (Burnstock ve Kennedy, 1985). 1990'ların başında, P1 (adenozin) reseptörlerinin dört alt tipi (A_1, A2A, A2B ve A_3) olduğu gösterilmiştir (Fredholm, Ijerman, Jacaobson, Klotz, Linden, 2001). 1993 yılında ilk G proteinine bağlı P2Y reseptörleri (Lustig, Shiau, Brake, Julius, 1993; Webb ve ark., 1993) ve bir yıl sonra iki P2X ligand kapılı iyon kanalı reseptörü keşfedilmiştir (Brake, Wagenbach, Julius, 1994; Valera ve ark., 1994). 1994 yılında, moleküler yapı ve transdüksiyon mekanizmaları temelinde, purinoseptörlerin bu iki ana aileye ait olması gerektiği önerilmiştir (Abbracchio, & Burnstock, 1994). Şu anda, pürinlere ek olarak pirimidinlere duyarlı reseptörler de dahil olmak üzere yedi adet P2X reseptör alt tipi ve sekiz adet P2Y reseptör alt tipi tanınmıştır (Abbracchio ve ark., 2006; North, 2002; Ralevic, & Burnstock, 1998).

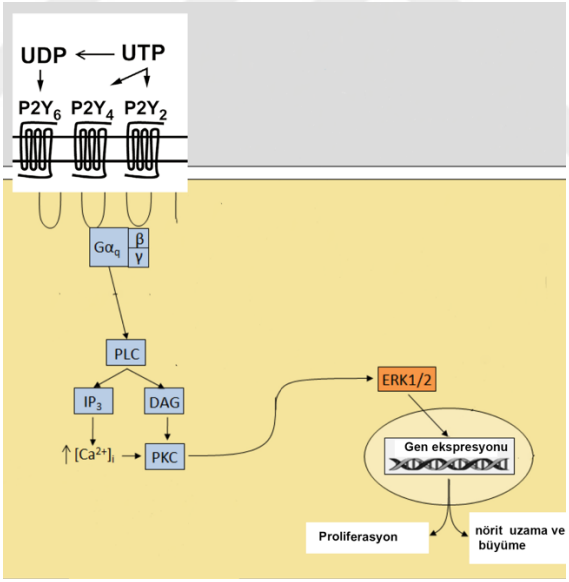
Hücre dışı nükleotidler, iyonotropik P2X ve metabotropik P2Y reseptörleri için ligandlardır. P2X reseptörleri adenin nükleotidlerinden, P2Y reseptörleri ise hem adenin hem de üridin nükleotidlerinden etkilenir. G proteinine bağlı P2Y reseptörleri beyin de dahil olmak üzere vücutta yaygın olarak bulunmaktadır (Burnstock, 2007).

2.11.1. P2Y reseptör alt tipleri

Tüm P2Y reseptörleri, hücre dışı nükleotidler için zara bağlı ve G-protein-bağlı (GPCR'ler) reseptörlerdir. (Burnstock, & Kennedy, 1985). P2Y reseptörlerinin iki alt ailesi, aminoasit dizileri ve sinyal iletim yollarındaki benzerliklerle tanımlanmıştır (Abbracchio ve ark., 2006). İlk alt aile $P2Y_1$ $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$ ve $P2Y_{11}$ reseptörlerinden oluşurken, ikinci alt aile ise $P2Y_{12}$, $P2Y_{13}$ ve $P2Y_{14}$ reseptörlerinden oluşmaktadır (Abbracchio ve ark., 2006; von Kügelgen, 2006; Jacobson ve ark., 2020). P2Y olarak tanımlanan bazı GPCR'ler hücre dışı

nükleotidler için reseptör olarak işlev görmez. Örneğin, "$P2Y_5$" reseptörü lizofosfatidik asit için bir reseptör olarak tanımlanmıştır (Pasternack ve ark., 2008).

7-transmembran reseptörleri (7-TM reseptörleri) olarak da bilinen G proteinine bağlı reseptörlerden olan P2Y reseptör proteinlerinin hücre dışı N-terminalinin agonist bağlanması için kritik bir önemi olmadığı, hücre içi C-terminalinin sinyal iletimini etkilediği bilinmektedir. P2Y reseptör alt tipleri arasında $P2Y_1$, P2Y2, $P2Y_4$, $P2Y_6$ ve $P2Y_{11}$ reseptörleri Gq proteinine bağlanır ve plazma zarı fosfolipid fosfatidilinositol 4,5-bisfosfatın (PIP2) hidrolizini destekleyen fosfolipaz C (PLC)'nin aktivasyonunu sağlar. Sonuçta hücre içi depolardan Ca2+ salınımını indükleyen ve protein kinaz C (PKC)'yi aktive eden ikincil haberciler, inositol 1,4,5-trisfosfat (IP3) ve diaçilgliserol oluşturmaktadırlar (Şekil 13). $P2Y_{12}$, $P2Y_{13}$ ve $P2Y_{14}$ reseptörleri Gi/o proteinlerine bağlanarak adenilat siklazın aktivitesini düzenlemektedir (Abbracchio ve ark.,2006; Erb ve ark., 2006).



Şekil 13. Hücre dışı üridin nükleotidleri tarafından aktive edilen sinyal yollarının şematik gösterimi (Weisman ve ark., 2012'den uyarlanmıştır).

2.11.1.1. $P2Y_1$ Reseptör

$P2Y_1$ reseptörünü kodlayan sekans farelerde 1995 (Tokuyama, Hara, Jones, Fan, Bell, 1995) ve insanda 1996'da yılında tanımlanmıştır (Ayyanathan ve ark., 1996; Janssens ve ark., 1996; Leon, Vial, & Cazenave, 1996). ADP, insan $P2Y_1$ reseptörünün endojen agonistidir (Ayyanathan ve ark., 1996; Jacobson ve ark., 2020;

Janssens ve ark., 1996; Leon, Vial, & Cazenave, 1996; Palmer, Boyer, Schachter, Nicholas,& Harden, 1998). ATP'nin kısmi bir agonist veya antagonist olarak hareket edebileceği gösterilmiştir (Hechler ve ark., 1998; Waldo, Harden, & 2004). Bu reseptörün, Gαq, Gα11 (Waldo, Harden, & 2004) ve β-arrestin yolunun (Reiner ve ark., 2009) aktivasyonuna bağlandığı çalışmalarda ortaya koyulmuştur. Aslında, insan saflaştırılmış $P2Y_1$ reseptörünün, ADP için ATP'ye kıyasla 100 kat daha fazla afinite gösterdiği bulunmuştur (Waldo, & Harden, 2004). ATP ve onun analogu dATPαS'ın, $P2Y_1$ reseptörü için kısmi agonistler olarak hareket ettikleri gösterilmiştir (Hechler ve ark., 1998; Schachter, & Harden, 1997; Waldo, & Harden, 2004).

2-Metiltio-ATP ve ATPγS, ADP ile karşılaştırıldığında benzer güçlerle $P2Y_1$ reseptöründe agonistler olarak işlev görmektedir. İnsan $P2Y_1$ reseptörü için daha yüksek potansiyele sahip 2-metiltio-ADP varlığı gösterilmiştir (Waldo, & Harden, 2004). Diğer bir analog olan N-metan-karba-2-metiltio-ADP (MRS2365)'in $P2Y_1$ reseptörü için $P2Y_{12}$ ve $P2Y_{13}$'e göre daha fazla seçici özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir. (Chhatriwala ve ark., 2004).

$P1Y_1$ için birkaç antagonist tanımlanmıştır. Suramin, PPADS, reaktif blue-2, NF023 (8'-[karbonilbis(imino-3,1-fenilenkarboniliminino)] bis-1,3,5-naftalin trisülfonik asit) ve MRS2210 (6-(2'-kloroazofenil)-piridoksal-a5-fosfat) düşük afiniteli antagonistler olarak tanımlanmıştır (Guo, Von Kügelgen, Moro, Kim, & Jacobson, 2002). Bisfosfat analogları olan MRS2179 (2´-deoksi-N6-metiladenozin-3´,5´-bifosfat), MRS2279 (2-kloro-N6-metil-(N)-metanokarba-2´-deoksiadenozin 3´,5´-bifosfat) ve MRS2500 (2-iyodo-N6-metil-(N)-metanokarba-2'-deoksiadenozin 3',5'-bifosfat) yüksek afiniteli antagonistler olarak tanımlanmıştır (Costanzi ve ark., 2012).

$P2Y_1$ reseptörünün, serebral korteks, hipokampus, kaudat çekirdek, putamen, globus pallidus, habenula, orta beyin ve serebellum dahil olmak üzere memeli beyninde yaygın olarak ifade edildiği gösterilmiştir (Moore, Chambers, Waldvogel, Faull, & Emson, 2000; Morán-Jiménez, & Matute, 2000; Simon, Webb, & Barnard, 1997). Ayrıca, hipotalamik çekirdeklerden SON ve PVN'de $P2Y_1$ reseptör ekspresyonu bildirilmiştir (Song, Gomes, & Stevens, 2009). Bunlara ek olarak $P2Y_1$, serebellumdaki Purkinje hücrelerinde, serebral kortekte, hipokampusun iskemiye

duyarlı bölgelerinde (Morán-Jiménez, & Matute, 2000) ve oligodendrositler ile astrositlerde (Fumagalli ve ark., 2003; Simon ve ark., 1997) eksprese edildiği bildirilmiştir.

2.11.1.2. $P2Y_2$ Reseptör

$P2Y_2$ reseptörü farede 1993'te (Lustig ve ark., 1993) insanda 1994 yılında tanımlanmıştır (Parr ve ark. 1996). Hem ATP hem de UTP, $P2Y_2$ reseptörü için endojen agonistler olarak işlev görmektedir (Lustig ve ark., 1993; Parr ve ark. 1996). $P2Y_2$ reseptörünün öncelikle Gq aktivasyonuna bağlandığı gösterilmiştir (Morris ve ark., 2012).

2-Thio-UTP ve ilgili analogları, seçici $P2Y_2$ reseptörü için agonist olarak tanımlanmıştır (El-Tayeb, Qi, & Müller, 2006, 2011; Ivanov ve ark., 2007; Xu ve ark., 2018). PSB-1114, $P2Y_2$'ye karşı $P2Y_4$ ve $P2Y_6$ reseptörleri için 60 kattan fazla seçicilik göstermektedir (El-Tayeb, Qi, Nicholas, & Müller, 2011). Ek olarak dinükleosid analoğu P1-(üridin5')-P4-(2'-deoksisitidin-5') tetrafosfat (INS37217)'ın $P2Y_2$ reseptörünü aktive ettiği gösterilmiştir. Ayrıca $P2Y_2$ reseptörleri için ATP'nin UTP ile eşdeğer etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Abbracchio ve ark., 2006).

$P2Y_2$ için suramin ve reaktif blue-2, düşük afiniteli antagonist olarak tanımlanmıştır (Brunschweiger, & Müller, 2006; Weyler ve ark., 2008). Son zamanlarda seçici ve güçlü antagonist AR-C118925 geliştirilmiştir (Kemp, Sugar, Jackson, 2004; Kindon ve ark., 2017; Rafehi, Burbiel, Attah, Abdelrahman, & Müller, 2017a).

2.11.1.3. $P2Y_4$ Reseptör

İnsan $P2Y_4$ reseptörünü kodlayan dizi 1995 yılında tanımlanmıştır (Communi, Pirotton, Parmentier, & Boeynaems, 1995). UTP, insan $P2Y_4$ reseptörüne etki eden endojen bir agonist olarak tanımlanmış ve ATP'nin ise antagonistik veya kısmi agonistik özellikler gösterdiği bildirilmiştir (Communi ve ark., 1995; Communi, Pirottoni Parmentier, & Boeynaems, 1996). Bu durum türler arasında farklılık göstermektedir. İnsan $P2Y_4$ reseptörünün UTP tarafından aktive edildiği,

ancak UDP veya ADP tarafından aynı etkiyi göstermediği ortaya koyulmuştur (Nicholas ve ark., 1996; Kennedy ve ark., 2000). Tersine, hem UTP hem de ATP, sıçanda $P2Y_4$ reseptörünün agonistleridir (Bogdanov, Wildman, Clements, King, Burnstock, 1998). $P2Y_4$ reseptörü, Gq aracılığıyla ve fosfolipaz C-β, protein kinaz C, MAP kinazlar ve iyon kanalları aracılığıyla sinyal vermektedir (Communi ve ark, 1995; Filippov, Simon, Barnard, & Brown, 2003; Scodelaro, Bilbao, Boland, & Santilan, 2010).

MRS4062 (N(4)-(Fenilpropoksi)-CTP), MRS2927 (bir 3'-deoksi-3'-floroglukoz analoğu) ve N(4)-(feniletoksi)-CTP agonistlerinin $P2Y_2$ ve $P2Y_6$ reseptörlerine göre insan $P2Y_4$'ü tercih ettiği bildirilmiştir (Maruoka ve ark., 2011).

PPADS ve reaktif blue-2 $P2Y_4$ reseptörü için antagonistlerdir (Bogdanov ve ark., 1998; Wildman, Unwin, & King, 2003). Son olarak PSB-16133 güçlü yeni bir antagonist olarak keşfedilmiştir (Rafehi ve ark., 2017b).

$P2Y_4$ reseptörlerinin yüksek ekspresyon seviyeleri bağırsakta, beyin ve hipofizde bulunmuştur (Abbracchio ve ark., 2006; Song ve ark., 2011). Özellikle hipotalamusun magnoselüler nöroendokrin nöronlarının $P2Y_4$ reseptörlerini eksprese ettiği ortaya koyulmuştur (Song ve ark., 2011).

2.11.1.4. $P2Y_6$ Reseptör

İnsan $P2Y_6$ reseptörünü kodlayan sekans 1996 yılında tanımlanmıştır. Reseptör için UDP endojen agonist olarak bildirilmiştir. $P2Y_6$ reseptörünün Gq sinyal yolu üzerinden aktivasyon sağladığı bildirilmiştir (Communi, Parmentier, Boeynaems, 1996). Yapılan çalışmalarda UDPβS ve Up3U'nun $P2Y_6$ reseptöründe agonist olarak görev yaptığı bildirilmiştir (Hou ve ark., 2002; Shaver ve ark., 2005). 3-fenasil-UDP (PSB-0474; El-Tayeb ve ark., 2006), 5-iyodo-UDP (MRS2693; Besada ve ark., 2006), α,β-metilen-UDP (MRS2782; Ko ve ark., 2008), INS48823 (Korcok, Raimundo, Du, Sims, & Dixon, 2005; Brunschweiger, & Müller, 2006) ve 5-O-metil-UDP'nin (Ginsburg-Shmuel ve ark., 2010) $P2Y_6$ reseptörünü aktive eden güçlü agonistler arasında olduğu bildirilmiştir.

$P2Y_6$ reseptörü, reaktif blue-2, PPADS ve suramin tarafından antagonize edilmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalarda 4,4'-Diizotiyosiyanatostilben-2,2'-

disülfonat (Von Kügelgen, 2006) ve analogu MRS2578'in (Mamedova, Joshi, Gao, Von Kügelgen, & Jacobson, 2004), insan ve sıçan $P2Y_6$ reseptörlerinin geri dönüşümsüz blokerleri olarak işlev gördüğü ortaya koyulmuştur.

$P2Y_6$ reseptör mRNA'sı, insan beyninin tamamında eksprese edilir, ancak en yüksek seviyelerde amigdala, singulat girus, nukleus akumbens ve putamende ifade edildiği gösterilmiştir (Moore ve ark., 2001). $P2Y_6$ reseptör mRNA ayrıca fare superior servikal ganglion, sıçan dorsal-kök ganglion nöronları ve sıçan piramidal hipokampal nöronlarda tanımlanmıştır (Ralevic, & Burnstock, 1998; Calvert ve ark., 2004). Sıçanların serebellum ve korteksindeki astrositlerin de $P2Y_6$ reseptör aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir (Fumagalli ve ark., 2003; Gillian ve ark., 2003). Ayrıca $P2Y_6$ reseptörünün, plasenta, timus, dalak, böbrek, vasküler düz kas, akciğer, barsak, kemik, yağ hücrelerinde yaygın olarak eksprese edildiği bildirilmiştir (Abbracchio ve ark., 2006; Von Kügelgen, & Wetter, 2000).

2.11.1.5. $P2Y_{11}$ Reseptör

İnsan $P2Y_{11}$ reseptörünü kodlayan dizi 1997 yılında tanımlanmıştır. ATP, insan $P2Y_{11}$ reseptörü için endojen fizyolojik agonist olarak bildirilmiştir (Communi, Govaerts, Parmentier, Boeynaems, 1997). İlginç bir şekilde, bu GPCR, fare veya sıçan genomunda mevcut değildir ve insan reseptörüne %70 homolog olan köpek $P2Y_{11}$ reseptörünün, ADP tarafından ATP'den daha güçlü bir şekilde aktive edildiği gösterilmiştir (Qi, Zambon, Insel, & Nicholas, 2001). Rekombinant insan reseptörünün, 1321N1 insan astrositoma hücrelerinde Gq ve Gs sinyal yolu üzerinden aktivasyon sağladığı gösterilmiştir (Communi, 1997).

NAD^+ ve $NAADP^+$, $P2Y_{11}$ reseptöründe etkili olan doğal agonistler olarak tanımlanmıştır. (Moreschi ve ark., 2006; Moreschi ve ark., 2008). $P2Y_{11}$ reseptörü için etki eden sentetik agonistler ATPγS, P2Y12 reseptörü antagonisti 2-propiltio-β,γ-diklorometilen-D-ATP (AR-C67085) ve adenosin-5'5'-O-(α-boranotrifosfat) diastereoizomerler olarak gösterilmiştir (Ecke, Tulaparkur, Nahum, Fischer, & Reiser, 2006). İlginç bir şekilde, suramin analoğu NF546'nın $P2Y_{11}$ reseptörünü aktive ettiği rapor edilmiştir (Meis ve ark., 2010).

İnsan $P2Y_{11}$ reseptörü için Suramin ve analogu NF157, düşük afiniteli antagonist olarak tanımlanırken, (Moreschi ve ark., 2006; Ullmann ve ark, 2005) NF340 daha güçlü bir antagonist olarak tanımlanmıştır (Meis ve ark., 2010).

$P2Y_{11}$ reseptörü insan dalağında, karaciğerinde, bağırsaklarında, beyin ve hipofizde eksprese edildiği bildirilmiştir (Abbracchio ve ark., 2006; Von Kügelgen, & Wetter, 2000).

2.11.1.6. $P2Y_{12}$ Reseptör

İnsan $P2Y_{12}$ reseptörünü kodlayan dizi 2001 yılında tanımlanmıştır (Hollopeter ve ark., 2001). ADP, insan $P2Y_{12}$ reseptörünü aktive eden endojen agonist (Chhatriwala ve ark., 2004; Hollopeter ve ark., 2001), ATP ise antagonist olarak tanımlanmıştır. $P2Y_{12}$ reseptörü, Gi sinyal yolu üzerinden aktivasyon sağlamaktadır (Kauffenstein, Hechler, Cazenave, & Gachet, 2004).

2-Metiltio-ADP, reseptörde güçlü bir agonist görevi görmektedir. Bu reseptör için AR-C67085 ve cangrelor (ARC69931MX) nükleotid analoglarını içeren bir dizi güçlü antagonist geliştirilmiştir (Ingall ve ark., 1999).

Son zamanlarda $P2Y_{12}$ reseptörü için Ap4A türevleri, antagonist olarak geliştirilmiştir. (Yanachkov ve ark., 2016). Üridin trifosfat tiyo analoglarının da $P2Y_{12}$ reseptörünü inhibe ettiği yapılan çalışma ile gösterilmiştir (Gündüz ve ark., 2017). Suramin ve reaktif mavi-2'nin $P2Y_{12}$ reseptöründe antagonistler olarak hareket ettiği bildirilmiştir. (Von Kügelgen, & Wetter, 2000; Von Kügelgen, 2006).

2.11.1.7. $P2Y_{13}$ Reseptör

İnsan $P2Y_{13}$ reseptörü 2001 yılında klonlanmıştır. ADP, $P2Y_{13}$ reseptöründe etkili olan endojen agonisttir (Communi ve ark., 2001). ATP, kısmi bir agonist olarak hareket edebilir. $P2Y_{13}$ reseptörü, Gi-proteinleri aracılığıyla sinyal oluşturmaktadır (Marteau ve ark., 2003; Communi ve ark., 2001).

Suramin, reaktif blue-2 ve PPADS, düşük afiniteli antagonistler olarak tanımlanmıştır (Marteau ve ark., 2003). PPADS'nin 2-kloro-5-nitro analoğunun (MRS2211), insan P2Y13 reseptöründe rekabetçi bir antagonist olarak hareket ettiği

gösterilmiştir (Kim ve ark., 2005). Ayrıca bu çalışma ile MRS2211 için, $P2Y_1$ reseptörü ve $P2Y_{12}$ reseptörü ile karşılaştırıldığında $P2Y_{13}$ reseptörü için daha etkin bir antagonist olduğu ortaya koyulmuştur. Bunların yanında Cangrelor (ARC69931MX), $P2Y_{12}$ reseptörüne ek olarak $P2Y_{13}$ reseptörünü bloke etmiştir (Marteau ve ark., 2003; Fumagalli ve ark., 2004).

$P2Y_{13}$ reseptörünün dalakta, kemik iliğinde, periferal lökositlerde, beyinde, karaciğerde, pankreasta ve kalpte eksprese edildiği bildirilmiştir (Abbracchio ve ark., 2006; Communi ve ark., 2001).

2.11.1.8. $P2Y_{14}$ Reseptör

İnsan $P2Y_{14}$ reseptörünü kodlayan dizi 2000 yılında tanımlanmıştır. UDP ve UDP-şekerleri olan UDP-galaktoz ve UDP-glukoz, reseptör için agonist görevi görür. $P2Y_{14}$ reseptörü, Gi-proteinlerine bağlanma yoluyla sinyal vermektedir (Carter ve ark., 2009; Chambersve ark., 2000; Freeman ve ark., 2001).

5-iyodo-UDP (MRS2690) dahil olmak üzere UDP türevleri ve α,β-metilen-2-tiyo-UDP (MRS2905), $P2Y_{14}$ reseptörünün etkili, güçlü ve seçici agonistleri olarak geliştirilmiştir (Carter ve ark., 2009; Das ve ark., 2010; Ko, Fricks, Ivanov, Harden, & Jacobson, 2007).

PPTN (4-[4-(4-piperidinil)fenil]-7-[4-(trifloromethil)fenil] 2naftalinkarboksilik asit) seçici ve güçlü bir antagonist olarak tanımlanmıştır (Barret ve ark., 2013).

$P2Y_{14}$ reseptörü mRNA'sının plasenta, dalak, kemik, kemik iliği, timus, mide, bağırsak, yağ dokusu ve beyinde ifade edildiği bildirilmiştir (Abbracchio ve ark., 2006). $P2Y_{14}$ reseptörünün proinflamatuar rolleri nötrofillerde (Barrett ve ark., 2013; Harden, Sesma, Fricks, & Lazarowki, 2010; Sesma ve ark., 2012;), böbrek iltihabında (Azroyan ve ark., 2015) ve mast hücrelerinde (Gao ve ark., 2013) gösterilmiştir.

Memeli P2Y reseptör alt tiplerinin agonist ve antagonistleri Tablo 3'de özetlenmiştir (Burnstock, 2018).

Tablo 3. P2Y reseptörlerinin alt tiplerinin özellikleri

Reseptör	Dağılımı	Agonistler	Antagonistler	İletim mekanizmları
$P2Y_1$	Epitel ve endotel hücreleri, trombositler, bağışıklık hücreleri, osteoklastlar, beyin	MRS2365 > 2-Me-SADP = Ap5(γB) >> ADPβS > ATP > 2-Me-SATP = ADP	MRS2500 > MRS2279 > MRS2179, PIT, A3P5P	Gq/G11;PLC-β aktivasyonu
$P2Y_2$	Bağışıklık hücreleri, epitel ve endotel hücreleri, böbrek tübülleri, Osteoblastlar, beyin	2-tiyo-UTP > UTP, MRS2698 ⩾ ATP,INS365>INS 37217, UTPγS > Ap4A > MRS 2768, Up4-fenil ester	AR-C126313 > Suramin > RB2, PSB-716, MRS2576, PSB-0402, AR-C118925	Gq/G11 ve Gi/Go; PLC-β aktivasyonu
$P2Y_4$	Endotel hücreleri, plasenta, dalak, timüs, beyin	2'-azido-dUTP > UTPγS, UTP ⩾ ATP ⩾ Ap4A Up4U MRS4062	ATP (insan) > Reactive blue-2 > Suramin, MRS2577, PPADS	Gq/G11 Gi; PLC-β aaktivasyonu
$P2Y_6$	Hava yolu ve bağırsak epitel hücreleri, plasenta, T hücreleri, timus, mikroglia (Aktif), beyin	MRS2693 > UDPβS, PSB0474 > INS48823, Up3U, 3-phenacyl- UDP >> UDP > UTP >> ATP, α,β-meUDP MRS2957, MRS4129, 5-OMe-UDP αB	MRS2578 > Reactive blue-2, PPADS, MRS2567, MRS2575 (insan)	Gq/G11;PLC-β aktivasyonu
$P2Y_{11}$	Dalak, bağırsak, granülositler	ATPγS > AR-C67085MX > BzATP ⩾ ATP, NF546, NAD+, NAADP+, Sp-2-propiltiyo-ATP-α-B	NF157 > Suramin > RB2, 5'-AMPS, NF340, AMP-α-5	Gq/G11 ve GS; PLC-β aktivasyon
$P2Y_{12}$	Trombositler, glial hücreler	2-MeSADP ⩾ ADP > ATP, ADP-β-S	AR-C69931MX > AZD6140 (Ticagrelor), INS50589 > RB2 > 2-MeSAMP AR-C66096, CT50547, PSB-0413, Carba-nucleosides, MRS2395, AR-C67085, AZD1283	Gαi;adenilat siklaz inhibisyonu
$P2Y_{13}$	Dalak, beyin, lenf düğümleri, kemik kemik iliği, eritrositler	ADP = 2-MeSADP > 2-MeSATP, ATP	AR-C69931MX > AR-C67085 > MRS2211, 2-MeSAMP	Gi/Go
$P2Y_{14}$	Plasenta, yağ dokusu, mide„ betyin	MRS2690 > UDP > UDP glukoz ⩾ UDP-galaktoz, UDP-glukozamin, MRS2905	PPTN	Gq/G11

2.12. Nöronal Aktivasyon

‘‘Immediate-Early’’ genleri (IEG), c-Fos durumunda olduğu gibi, spesifik ve yakın tarihli bir uyarana yanıt olarak hemen aktive olan ve yeni proteinlerin sentezini gerektirmeyen bir grup gen içerir. *c-fos* geni, Fos adı verilen bir nükleer proteini kodlamaktadır. c-Fos ailesinin üyeleri, c-Jun proteini ile dimerize olarak hücre farklılaşması ve proliferasyonu, öğrenme, motor kontrolü ile ilgili çok sayıda ve çeşitli genlerin transkripsiyonunu aktive eden transkripsiyon faktörü AP-1’i oluştururlar (Cruz-Mendoza, Jauregui-Huerta, Luquin, Agilar-Delgadillo, & Garcia-Estrada, 2022).

Hem nöronlar hem de glia için *c-fos* geni ve c-Fos proteini, hücresel aktivasyonun belirteçleridir ve hem zararlı hem de zararlı olmayan çok çeşitli uyaranlardan sonra kolayca ifade edilmektedirler. Günümüzde c-Fos immünohistokimyası hala yaygın olarak kullanılmaktadır. Aktif hücrelerin temsili bir siyah nükleer etiket aracılığıyla tanımlanmasına ve ardından ölçülmesine olanak tanımaktadır. IEG’ler, diğer genlerin ekspresyonunu değiştiren transkripsiyon faktörlerini oluşturan hücresel uyarı üzerine hızlı ve geçici olarak aktive edilir. Bu IEG’ler, davranışsal görevlere yanıt olarak belirli beyin bölgelerinde indüklenir (Lara Aparicio ve ark., 2022).

Fos terimi ilk olarak Finkel-Biskis-Jinkins tarafından mürin osteojenik sarkom virüsü (FBJ-MSV) tarafından kodlanan onkogeni tanımlamak için kullanılmıştır ve bu nedenle viral onkogen (*v-fos*) adını almıştır. Fos, diğer tüm IEG’ler için geçerli olan bir terminoloji olan *c-fos* olarak adlandırılan hücresel genlerden ve *v-fos* olarak adlandırılan viral genlerden türetilmiştir (Curran, Miller, Zokas, & Verma, 1984).

"*Immediate-Early*" terimi ilk olarak virologlar tarafından viral entegrasyonun hemen ardından (yaklaşık 2 dakika) konak hücreler tarafından *de novo* olarak kopyalanan özel viral düzenleyici faktörleri tanımlamak için kullanılmıştır. Bu süre aşıldıktan sonra “delayed early expression” terimi türetilmiştir. Daha sonra bu kavram, araştırmacılar tarafından belirli IEG'ler için maksimum zirvelere ulaşan zaman eşiği 2 dakikadan 30 ve 60 dakikaya çıkarılmıştır (Cruz-Mendoza ve ark., 2022; Herrera, & Robertson, 1996).

IEG'ler iki gruba ayrılmaktadır. Birinci grup belirli bir DNA sekansına bağlanarak diğer genlerin ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörlerini kodlamaktadır. Bunlar düzenleyici transkripsiyon faktörleri (RTF'ler) olarak adlandırılmaktadır. İkinci grup ise sitoplazmada bulunan proteinleri kodlayarak hücre fonksiyonunu doğrudan değiştirmektedir. Bunlar ise efektör IEG'ler olarak adlandırılmaktadır (Cruz-Mendoza ve ark., 2022; Herrera, & Robertson, 1996). Bazı IEG örnekleri ve işlevleri Tablo 4'de gösterilmiştir (Lara Aparicio ve ark., 2022).

c-fos'un bazal ifadesi, fareler, sıçanlar, kediler, maymunlar ve insanlar dahil olmak üzere çeşitli türlerde incelenmiştir. Bazal seviyeleri, mRNA'sının kararsızlığı nedeniyle nispeten düşük olmasına rağmen, transkripsiyonunun hızlı olduğu (ilk 5 dakika içinde) ve 15-20 dakikaya kadar devam ettiği gösterilmiştir. mRNA'sının birikimi, stimülasyondan 30 ila 45 dakika sonra zirve yapmaktadır ve kendi Fos proteini (negatif geri besleme döngüsü) tarafından transkripsiyonu kendi kendine baskılayan yaklaşık 10–20 dakikalık kısa bir yarı ömürle birlikte azalır. *c-fos*'un hızlı transkripsiyonu, bir IEG olarak sınıflandırılmasına yol açmıştır (Hyeon ve ark., 2015; Morgan, & Curran, 1991; Rahmsdorf ve ark., 1987; Saha, & Dudek, 2013).

c-Fos ve *c-fos*'un bazal ekspresyon süresinin hücre büyümesi, farklılaşması veya hayatta kalması gibi hücre fonksiyonuna ve beyin bölgelerine bağlı olduğu gösterilmiştir. Öte yandan c-Fos ve *c-fos*'un uyaranlardan sonraki ifadesinin türe bağlı olduğu da ortaya koyulmuştur. Örneğin, bir omurilik yaralanmasından sonraki c-Fos seviyeleri, epileptik nöbetlerden sonra elde edilenlerden farklı bulunmuştur ve bunlar, farmakolojik indüksiyon vb. yoluyla meydana gelenlerden farklıdır. *c-fos* ve c-Fos'un bazal ekspresyon zamanı ile ilgili çalışmalar hakkında çok az bilgi olmasına rağmen, bulunan çalışmaların *c-fos* geni (mRNA) ve c-Fos proteini için benzer zamanları gösterdiği görülmektedir (Lara Aparicio ve ark., 2022).

c-Fos'un sentezi, genin mRNA'sının birikimini takip eder ve stimülasyondan 20 ila 90 dakika sonra immünohistokimya (IHC) ile tespit edilebilmektedir. Ayrıca stimülasyondan 24 saat sonrasına kadar da gözlemlenmiştir. Bu proteinin yarı ömrü yaklaşık 2 saattir (Saha ve ark., 2013). c-Fos aktivasyonu, Ca^{2+}, siklik adenozin monofosfat (cAMP) veya mitojenle aktive olan protein kinazlar (MAPK'ler) dahil olmak üzere çeşitli transkripsiyonel düzenleyicilerle olan etkileşimlerle düzenlenmektedir (Cruz-Mendoza ve ark., 2022).

Tablo 4. IEG'lerin sınıflandırılması ve işlevleri.

İmmediate-Early genleri (IEG)	Fonksiyonları
***Arc* (Arg3.1)**	Öğrenme ve hafıza ile ilişkili spesifik nöronları düzenler. Bu fonksiyonlar ayrıca c-fos ve egr-1 ile ilişkilidir.
c-fos c-jun	Hücre aktivasyonu (hücre çoğalması ve farklılaşması) ve protein transkripsiyonları. c-fos için: duyusal bilgi işleme, ağrı düzenleme mekanizmaları, uzun vadeli güçlenme, nöral plastisite, öğrenme ve hafıza, enflamatuar sitokinlerin ekspresyonunun doğrudan kontrolü, kainik asit reseptörü ve GluR6'nın ekspresyonunu düzenleyerek nöronal uyarılabilirliğe aracılık etmektedir.
cyr 61	Hücre adezyonu, migrasyonu ve anjiyogenezisi.
***egr-1* (*tis 8*)**	Merkezi sinir sisteminin işleyişi ve gelişiminin yanı sıra prostat kanseri, timik T hücrelerinin gelişimi. Hematopoetik hücrenin kaderini belirler
erp* or *MKP-1	Hücre büyümesinin düzenlenmesi için gerekli olan MAP'lerin fosforilasyonu.
Homer1a	Uzun vadeli güçlenme, bellek konsolidasyon süreçleri ve glutamaterjik sinyal yollarının modifikasyonu.
krox-24	Uzun vadeli güçlendirme, nöral esneklik, öğrenme ve hafıza.
c-myc	Normal hücre gelişimi, hücre malignitesi, hücre proliferasyonu ve apoptoz.
***nur1 nur77* (*NGFI-B*)**	Görme, duyusal bilgi işleme, ağrı düzenleme mekanizmaları, işitsel uyarım ve stres mekanizmaları
***N-10* (thyroid hormone receptor)**	Hücre farklılaşması ve çoğalması.
pip92*, *Chx1* or *ETR101	Nöronal farklılaşma ve hücre ölümü.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Deney Hayvanları

Tez çalışmasında 4-6 aylık Sprague-Dawley ırkı erkek (300-350 g) sıçanlar kullanıldı. Deney öncesinde sıçanlar, 4'lü gruplar halinde tutuldu ve su ve yem gereksinimleri ad libitum olarak karşılandı. Sıçanların bulunduğu havalandırmalı odaların ısısı 20-24°C olacak şekilde sabit tutuldu ve oda 12 saat aydınlık-12 saat karanlık (07.00-19.00 arası aydınlık) döngüsüyle aydınlatıldı. Tüm hayvan deneyleri Laboratuvar Hayvanlarının Bakım ve Kullanılması El kitabı (National Research Council, A.B.D.)'na uygun olarak yapıldı. Deneysel işlemler Bursa Uludağ Üniversitesi Deneysel Etik Kurulu tarafından onaylandı (No: 2021-13/09).

3.2. İntraserebroventriküler Kanül Yerleşimi

Merkezi (intraserebroventriküler; i.s.v.) yolla ilaç uygulamak için sıçanların sağ lateral ventriküllerine bir enjeksiyon kanülü implante edildi. Bu yöntemde sıçanlar sevofluran (%100 O_2 içerisinde %3-5 sevofluran) ile anestezi altına alınarak stereotaksik aparata yerleştirildikten sonra kafa derilerinde 2 cm boyunda bir insizyon açıldı ve kafatası görünür hale getirildi. Kafatasındaki fasya ve kan temizlendi. Orta hattın 1,5 mm laterali ile bregmanın 1 mm posteriorunun çakıştığı noktaya ince bir matkap ucu yardımıyla delik açıldı. Bu deliğe el yapımı 21G paslanmaz çelik bir kanül yerleştirildikten sonra kanül dişçi akriliği ile kafatasına sabitlendi. İntrakraniyal implantasyonlar için Paxinos ve Watson'un sıçan beyin Atlası referans alınarak tespit edildi (Paxinos, & Watson, 2007). Kanül yerleşimini sonrası uygun analjezik ve antibiyotik uygulaması ile sıçanların ayılması beklendi ve takiben sıçanlar tek tek kafeslere alındı.

3.3. Deney Grupları

Her grupta 5 hayvan olacak şekilde deney grupları özgün hedefler doğrultusunda aşağıdaki şekilde oluşturuldu.

3.3.1. Özgün Hedef 1- Merkezi yolla uygulanan üridin ve üridin nükleotidlerinin vazopressin, oksitosin, nesfatin-1 nöronları üzerindeki aktive edici etkisinin belirlenmesi

Bu amaçla oluşturulan deney gruplarında, sıçanlara üridin ve üridin nükleotidleri olan UMP, UDP ve UTP i.s.v. olarak Tablo 5'te belirtilen dozlarda uygulandı.

Tablo 5. Üridin ve üridin nükleotidlerinin dozları

Gruplar	Uygulanan madde	Doz*	Üretici Firma	Katolog no
Salin Grubu	%0,9 NaCl	5 mikrolitre		
Üridin Grubu	Üridin	1 µmol	Sigma	U3750
UMP Grubu	Üridin monofosfat (UMP)	1 µmol	Sigma	U1752
UDP Grubu	Üridin difosfat (UDP)	1 µmol	Sigma	94330
UTP Grubu	Üridin trifosfat (UTP)	1 µmol	Sigma	U6625

* Belirtilen dozlar 5 µl çözücüde hazırlandı.

3.3.2. Özgün Hedef 2- Merkezi yolla uygulanan üridin ve üridin nükleotidlerinin vazopressin, oksitosin, nesfatin-1 nöronlar üzerindeki aktive edici etkisini P2Y reseptörler üzerinden gerçekleştirdiğinin gösterilmesi

Üridin nükleotidlerince aktive edilen $P2Y_2$, $P2Y_6$, $P2Y_{14}$ reseptörlerini bloke etmek amacıyla reseptör antagonistleri sıçanlara i.s.v. olarak Tablo 6'da belirtilen dozlarda uygulandı.

Tablo 6. Antagonist madde dozları

Gruplar	Ön uygulama	Doz*	Uygulanan madde	Doz
$P2Y_2$ Antagonist grubu	AR-C 118925XX (Tocris Biotechne-4890)	0,1 µmol	üridin trifosfat (UTP)	1 µmol
$P2Y_6$ Antagonist grubu	MRS2578 (Sigma-M0319)	1 µmol	üridin difosfat (UDP)	1 µmol
$P2Y_{14}$ Antagonist grubu	PPTN hidroklorür (Tocris Biotechne-4862)	1 µmol	üridin difosfat (UDP)	1 µmol

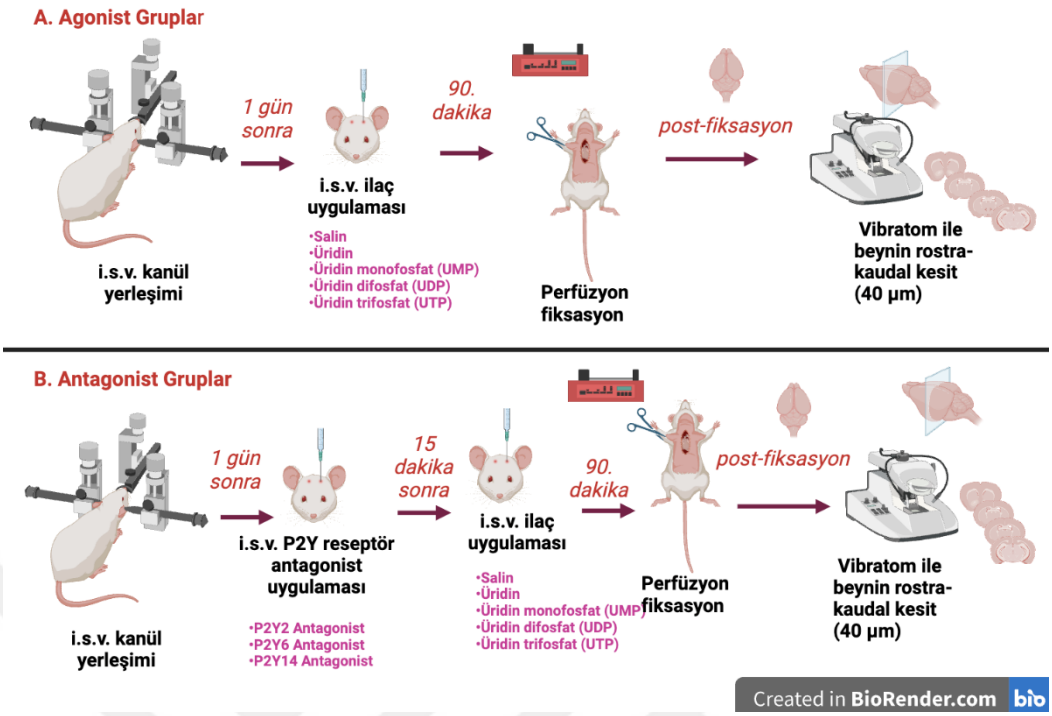
* Belirtilen dozlar 5 µl çözücüde hazırlandı.

3.3.3. Özgün Hedef 3- Vazopressin, Oksitosin ve Nesfatin-1 Nöronlarında P2Y Reseptörlerinin Varlığının Belirlenmesi

Herhangi bir etken madde verilmemiş deneklerde, UTP nükleotidinin bağlandığı $P2Y_2$ reseptörünün vazopressin, oksitosin ve nesfatin-1 nöronlarında ekspresyonunu değerlendirmek amacıyla ikili immünofloresan yöntem ile işaretlemeler yapıldı.

3.4. İntraserebroventriküler Uygulama

Cerrahi kanül yerleştirme işlemi uygulanan denekler bir gün dinlendirildikten sonra, uyanık ve serbestçe dolaşır halde iken 20x20 cm ebatlarında kutulara alındı. 30 dakika kadar sakinleşmeleri beklendikten sonra sıçanlara kılavuz kanül aracılığıyla i.s.v. olarak salin, üridin, üridin monofosfat (UMP), üridin difosfat (UDP) üridin trifosfat (UTP) uygulandı. Bahsi edilen maddeler 5 µl hacimde hazırlanarak Hamilton enjektörü içinde kılavuz kanüle bir enjeksiyon aparatı ile iliştirilmiş polietilen bir kanül vasıtası ile 5 µl/dk hızında ayarlanmış bir pompa (CMA Microdialysis AB, Kista, Sweden) ile sağ lateral ventriküle enjekte edildi. P2Y reseptör antagonisti kullanılan deney gruplarında üridin ve üridin nükleotidlerinin enjeksiyonundan 15 dakika önce antagonistler aynı yöntemle sağ lateral ventriküle enjekte edildi (Şekil 14). Çalışmanın yukarıda tanımlanan bölümü BUÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD'da Arş. Gör. Cansu KOÇ ile birlikte gerçekleştirildi.



Şekil 14. Deney gruplarının şematik gösterimi.

3.5. Çalışmada Kullanılan Doku, Teknik ve Antikorlar ile İlgili Genel Bilgiler

3.5.1. Perfüzyon Fiksasyon ile Dokuların Eldesi

Son i.s.v. enjeksiyonundan 90 dakika sonra denekler perfüzyon fiksasyon yöntemi ile sakrifiye edildi. Derin eter anestezisi sonrası sıçanların toraksları açılarak aortaya kateter yerleştirildi. Önce serum fizyolojik (%0,9 NaCl), perfüzyon pompası yardımıyla damar sistemine gönderildi ve kandan temizlendi. Sonraki aşamada her denek için 400 ml, 0.13 M Sorenson'un fosfat tamponu ile hazırlanan %4'lük paraformaldehit solüsyonu fiksatif olarak verildi. Alınan beyin dokuları %4'lük paraformaldehit içinde +4 ^{0}C'de tüm gece post-fiksasyona bırakıldı. Fiksasyon tamamlandıktan sonra, vibratom ile rostra-kaudal ekseninin tamamını içerecek şekilde 5 seri halinde ve 40 µm kalınlığında alınan beyin kesitleri 0,05 M Tris–HCl tamponu ile yıkanarak fiksatiften arındırıldı ve kriyoprotektan içinde -20°C'de saklandı. Doku ve kesitlerin eldesi, saklanması ve immünohistokimyasal boyamalar sırasında kullanılan solüsyonların içerik ve hazırlanması Tablo 7'de açıklanmıştır.

Elde edilen kesitlere aşağıda ayrıntı olarak verilen protokol kullanılarak histolojik, immünohistokimyasal ve immünofloresan boyamalar yapıldı.

Tablo 7. İmmünohistokimyasal işlemlerde kullanılan solüsyonların içeriği ve hazırlanışı.

Solüsyon Adı	İçerik	Hazırlanışı
0,13 M Sorenson'un Fosfat Tamponu	Solüsyon A, 46,54 gr/lt. [$Na_2HPO_412H_2O$ (0,13 M), (Merck)] Solüsyon B, 17,68 gr/lt. [KH_2PO_4 (0,13 M), (Merck)]	pH7,4 olana kadar Solüsyon A üzerine Solüsyon B eklenir.
%4'lük Paraformaldehit	100 ml distile su 40 gr Paraformaldehit (Merck, Cat. No:104005) 1 N. NaOH (Merck) 0,13 M Sorenson'un fosfat tamponu Konsantre hidroklorik asit	Distile su ve paraformaldehit manyetik karıştırıcıda 58^0C'ye kadar karıştırılarak ısıtılır. Isıtılan solüsyona 1 N. NaOH solüsyon berraklaşana kadar yavaşça eklenir. Filtre kağıdından süzülen solüsyon fosfat tampon ile 1 lt.'ye tamamlanır. Konsantre hidroklorik asit ya da 1 N. NaOH ile pH7,4'e ayarlanır.
0,05 M Tris/HCl Tamponu	Trizma base (Merck, Cat. No: 108387) 6 gr 1000 ml distile su Konsantre hidroklorik asit	Tris/HCl ile distile su manyetik karıştırıcıda karıştırılır ve konsantre hidroklorik asit ile pH7,6'ya ayarlanır.
Kriyoprotektan solüsyon	500 ml 0,05 M Tris/HCl tamponu 300 gr Sükroz (BDH, Prod. No: 302997) 300 ml Etilen glikol (BDH, Prod. No: 282966) 10 gr Polivinilprolidon (Amresco, Cat. No: 1512B22) 300 ml distile su	Distile su dışındaki maddeler manyetik karışıtırıcıda karıştırılır ve distile su ile 1 litreye tamamlanır. Filtre kağıdından süzülür.
Bloklayıcı Serum Solüsyonu	%10 Normal at serumu %0,1 sodyum azid %0,2 triton-X 100 900 ml 0,05 M Tris/HCl tamponu	Normal at serumu, sodyum azid, triton-X 100 belirtilen oranlarda karıştırılır. Tris/HCl tamponu ile 1000 ml tamamlanır. Filtre kağıdından süzülür.

3.5.2. İntraserebroventriküler Kanül Lokalizasyonunun Doğrulanması

İntraserebroventriküler (i.s.v.) kanül yerleştirme işleminin doğru lokalizasyona yapıldığını teyit etmek amacıyla lamlara alınıp kurutulan vibratom kesitleri distile suda bekletildikten sonra %0,1 dilüsyonunda krezil viyole (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) ile 5 dk. inkübe edildi. Akabinde artan alkol serilerinde dehidrasyonu takiben ksilen serilerinde şeffaflandırılarak DPX ile kapatıldı. Uygulanan boyama prosedürü ayrıntıları ile Tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 8. Krezil viyole boyama prosedürü

Sıra	Yapılan İşlem	Süre
1	Distile su	5 dakika
2	% 0,1 Krezil viyole	5 dakika
3	%50 Alkol	30 saniye
4	%70 Alkol	30 saniye
5	%90 Alkol	30 saniye
6	%96 Alkol	30 saniye
7	Ksilen I	5 dakika
8	Ksilen II	5 dakika
9	Kapama	

3.5.3. İmmünohistokimyasal Yöntemlerde Uygulanan Genel Kurallar

İndirekt immünoperoksidaz yöntemi ve ikili immünofloresan yöntemleri ile işaretlemeler yapıldı. İşlemlerin tümü cam sintilasyon vialleri içinde bulunan yüzen kesitlere uygulandı. Kesitlerin inkübasyon ve yıkama işlemleri, orbital sallayıcı yardımı ile gerçekleştirildi. Yöntemdeki temel basamaklardan olan nonspesifik bağlanmayı bloklama işlemi ile primer antikor inkübasyonu arası hariç, kesitler 0,05 M'lık Tris-HCl tamponu ile yıkandı. Non-spesifik bağlanmayı bloklama ve tüm primer ve sekonder antikorların dilüe etmek için bloklayıcı tampon olarak Tris-HCI tamponunda hazırlanan %10'luk bloklama tamponu kullanıldı.

Çalışmada kullanılan primer antikorlar (Tablo 9) için öncelikle farklı dilüsyon, inkübasyon süresi ve sıcaklıklar denenerek optimal immünohistokimyasal işaretlemelerin elde edilmesi için boyamalar yapıldı. Optimizasyon sonucu elde edilen değerler Tablo 10'da özetlenmiştir. Kullanılan sekonder antikorlar ile ilgili ayrıntılar Tablo 11'de verilmiştir. İkili indirekt immünoperoksidaz tekniği ile işaretlenen kesitlerin kapatılmasında DPX (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) kullanıldı.

Tablo 9. Kullanılan primer antikorlar

Antikor	Üretici Firma	Katolog no
Tavşan anti- nesfatin-1	Phoenix Pharmaceuticals, Inc	H-003-22
Koyun anti- nesfatin-1	R&D Systems	AF6895
Tavşan anti- $P2Y_2$ reseptör	Alomone labs	APR-010
Tavşan anti-c-Fos	Millipore	ABE457
Guine pig anti-oksitosin	BMA BİOMEDİCAL	T-5021
Guine pig anti-vazopressin	BMA BİOMEDİCAL	T-5048

Tablo.10. Çalışmada kullanılacak antikorların optimize edilen dilüsyonları, inkübasyon süreleri ile sıcaklıkları

Kullanılan Antikor	Dilüsyon	İnkübasyon Süresi	İnkübasyon ^{0}C
Tavşan anti- nesfatin-1	1:40.000	1 gece	Oda Sıcaklığı
Koyun anti- nesfatin-1	1:10.000	1 gece	Oda Sıcaklığı
Tavşan anti- $P2Y_2$ reseptör	1:750	1 gece	Oda Sıcaklığı
Tavşan anti-c-Fos	1:10.000	1 gece	Oda Sıcaklığı
Guine pig anti-oksitosin	1:100.000	1 gece	Oda Sıcaklığı
Guine pig anti-vazopressin	1:40.000	1 gece	Oda Sıcaklığı

Tablo 11. Kullanılan sekonder antikorlar

Üretici Firma	Kullanılan Sekonder Antikorlar
Jackson immunoresearch	Biyotin konjuge eşek anti-tavşan IgG (H+L) (711-065-152) Biyotin konjuge eşek anti-guine-pig IgG (H+L) (705-065-147) FITC konjuge eşek anti-tavşan IgG (H+L) (711-095-152) Texas red konjuge eşek anti-guine pig IgG (H+L) (706-075-148)
Merck	Biyotin konjuge eşek anti-tavşan IgG (AP182P)
Thermo Fisher	Alexa Fluor® 594 eşek anti-koyun IgG (H+L) (A11016)

3.5.4. Nesfatin-1, Oksitosin ve Vazopressin Nöronlarında Ortaya Çıkan Nöronal Aktivasyonun Belirlenmesi

İlgili nöronların aktivasyonu, ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemiyle c-Fos immünoreaktivitesinin varlığının gösterilmesi ile değerlendirildi.

3.5.4.1. Nesfatin-1/Vazopressin/Oksitosin ve c-Fos İkili İmmünohistokimyasal İşaretleme Yöntemi

- -20°C'deki kriyoprotektan madde içinde bekleyen yüzen kesitler dondurucudan çıkarılarak yaklaşık 30 dk. oda sıcaklığında bekletildi.
- Oda sıcaklığına gelen kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3x10 dk yıkandı.
- Non-spesifik bağlanmayı baskılamak için kesitler %10'luk normal at serumu ile hazırlanan bloklama tamponunda 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Kesitler bloklama tamponunda 1:10.000 oranında dilüe edilen tavşan anti-c-Fos antikoru ile 1 gece oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Bloklayıcı tamponunda 1:300 oranında hazırlanan biyotin işaretli eşek anti-tavşan sekonder antikoru ile 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.

- Avidin biyotin kompleksi (ABC) solüsyonu (10 µl A ve 10 µl B solüsyonu/1ml 0,05 M Tris-HCl) ile 1 saat inkübe edildi.
- İmmünohistokimyasal reaksiyonu çekirdekte görünür hale getirmek için substrat kromojen solüsyonu Ni-DAB (2 g Nikel, 12,5 mg DAB, 1,3 µL H2O2/50 ml 0,05 M Tris-HCl) 20 dk uygulandı.
- Non-spesifik bağlanmayı baskılamak için kesitler %10'luk normal at serumu ile hazırlanan bloklama tamponu içinde 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Kesitler bloklama solüsyonunda dilüe edilen tavşan anti-nesfatin-1 (1:40.000), guine pig anti-vazopressin (1:40.000) ya da guine pig anti-oksitosin (1:100.000) primer antikor ile 1 gece oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Bloklayıcı tamponda dilüe biyotin işaretli eşek anti-tavşan (1:1000) ya da eşek anti-guine pig (1:300) sekonder antikoru ile 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Avidin biyotin kompleksi (ABC) solüsyonu (10 µl A ve 10 µl B solüsyonu/1ml 0,05 M Tris-HCl) ile 1 saat inkübe edildi
- İmmünohistokimyasal reaksiyonu sitoplazmada görünür hale getirmek için substrat kromojen solüsyonu DAB (12,5 mg DAB, 1,3 µL H_2O_2/25 ml 0,05 M Tris-HCl) 10 dk (nesfatin-1 için), 5 dk (vazoppressin için) ve 3,5 dk (oksitosin için) uygulandı.

Tüm basamaklar arasında (bloklayıcı tampondan primer antikor inkübasyona geçiş aşaması hariç) kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3x10 dk yıkandı.

3.5.4.2. Nesfatin-1, Oksitosin ve Vazopressin Nöronlarında $P2Y_2$ Reseptör Protein Ekspresyonun Gösterilmesi

- Kriyoprotektan madde içindeki kesitler -20°C'den çıkarılarak immünohistokimyasal boyama için yaklaşık 30 dk. oda sıcaklığında bekletildi.
- Oda sıcaklığına gelen vial içindeki kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3x10 dk yıkandı.
- Non-spesifik bağlanmayı baskılamak için kesitler %10'luk normal at serumu ile hazırlanan bloklama tamponu içinde 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Kesitler, aşağıda tablo 12'de belirtilen primer antikor karışımları ile oda sıcaklığında 1 gece inkübe edildi.

Tablo 12. İkili immünofloresan işaretlemede kullanılan primer antikorlar

Primer Antikor Karışımları		
Nesfatin-1/P2Y$_2$ için	**Vazopressin/P2Y$_2$**	**Oksitosin/P2Y$_2$**
Koyun anti-nesfatin-1 poliklonal primer antikor (1:10.0000) + Tavşan anti-P2Y$_2$ antikor poliklonal primer (1:750)	Guine pig anti-vazopressin poliklonal primer antikor (1:40.0000) + Tavşan anti-P2Y$_2$ poliklonal primer (1:750)	Guine pig anti-oksitosin poliklonal primer antikor (1:100.000) + Tavşan anti-P2Y$_2$ poliklonal primer (1:750)

- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3x10 dk yıkandı.
- Kesitler, aşağıda tablo 13'de belirtilen sekonder antikor karışımlarında oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi.

Tablo 13. İkili immünofloresan işaretlemede kullanılan sekonder antikorlar

Sekonder Antikor Karışımları		
Nesfatin-1/P2Y$_2$ için	**Vazopressin/P2Y$_2$**	**Oksitosin/P2Y$_2$**
Floresan işaretli eşek anti-koyun Alexa flour 594 sekonder antikor (1:600) + Floresan işaretli eşek anti tavşan FITC sekonder antikor (1:600)	Floresan işaretli eşek anti-guine pig Texas red sekonder antikor (1:600) + Floresan işaretli eşek anti tavşan FITC sekonder antikor (1:600)	Floresan işaretli eşek anti-guine pig Texas red sekonder antikor (1:600) + Floresan işaretli eşek anti tavşan FITC sekonder antikor (1:600)

- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3x10 dk yıkandı.
- Kesitler lamlara yayıldı ve floresan mikroskopta değerlendirme için floresan kapatma medyumu ile kapatıldı.

3.6. Preparatların İncelenmesi ve Hücre Sayımı

Çalışmalarda elde edilen kesitler Olympus BX–50 fotomikroskopta (Tokyo, Japan) ve Olympus BX–FLA Reflected Light Flourescence Attachment adapte edilmiş Olympus BX–50 mikroskopla, dijital kamera (Olympus DP71 CCD color camera, 1,5 million pixel) ile bilgisayar ortamına aktarılan görüntüler üzerinde incelendi. Sayım işlemlerinde labSens (Olympus Soft, Center Valley, PA, USA) analiz programı ve ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD) kullanıldı.

Elde edilen boyamalarda yapılan analizler beyin atlasına (Paxinos, & Watson, 2007) göre belirlenen koordinatlar arasındaki (Supraoptik çekirdek için bregma -0.48

mm ile -1.44 mm, Paraventriküler çekirdek için bregma -1.32 mm ile -1.92 mm ve Periventriküler çekirdek için bregma -0.24 mm ile -3.60 mm**)** kesitlerde yapıldı. Hücre sayımı her bir denek için, ilgili çekirdeği içeren rostrokaudal düzlemde birbirine eşit uzaklıkta 5 farklı seviyeden alınan kesitlerde yapıldı. Deneklerin her vialindeki 200 μm aralıklarla alınan kesitlerin tümü lama yayılarak yukarıda çekirdekler için belirtilen koordinatlar arasındaki SON, PVN ve PeV bölgelerinin tamamında sayım yapıldı. SON için 6, PVN için 6 ve PeV için ise 10 kesit sayılarak değerlendirildi. İkili immünoperoksidaz yöntemi kullanılarak işaretlenen kesitlerde SON ve PVN'de vazopressin ve oksitosin işaretli nöronlar içinde c-Fos işaretli nöronların yüzleri hesaplandı. SON, PeV ve PVN'de ise nesfatin-1 işaretli nöronlar içinde c-Fos işaretli nöronların yüzleri hesaplandı.

3.7. İstatistiksel Analiz

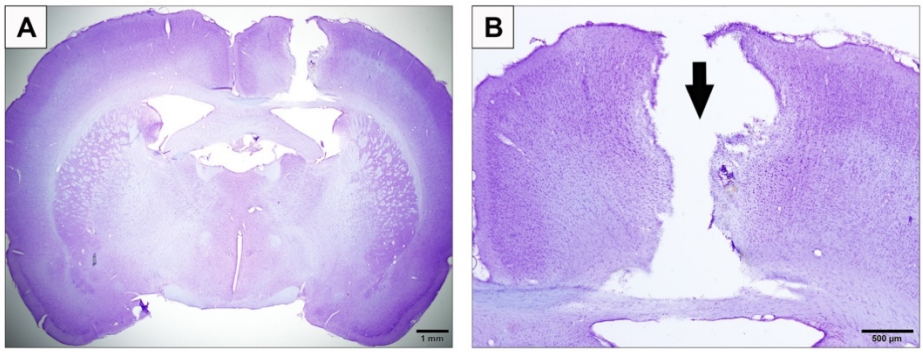
Her bir denek için elde edilen verilerin grup içi ortalama ± standart hataları belirlendi. Elde edilen verilerin analizinde IBM SPSS 20 (Armonk, NY), grafiklerin oluşturulmasında ise SigmaPlot 10.0 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) kullanıldı. Deney grupları arası varyans analizi ANOVA ile istatistiki anlamlılık karşılaştırması ise post-hoc Tukey testi ile yapıldı. İstatistiki anlamlılık sınır değeri olarak $p<0.05$ alındı.

4. BULGULAR

Özgün hedef 1 ve 2 kapsamında planlanan deneylerden elde edilen bulgular, her bir peptiderjik nöron grubu (sırasıyla nesfatin-1 nöronları, vazopressin nöronları ve oksitosin nöronları) için oluşturulan başlıklar altında birlikte verilecektir.

4.1. İntraserebroventriküler Kanül Yerleşiminin Doğrulanması

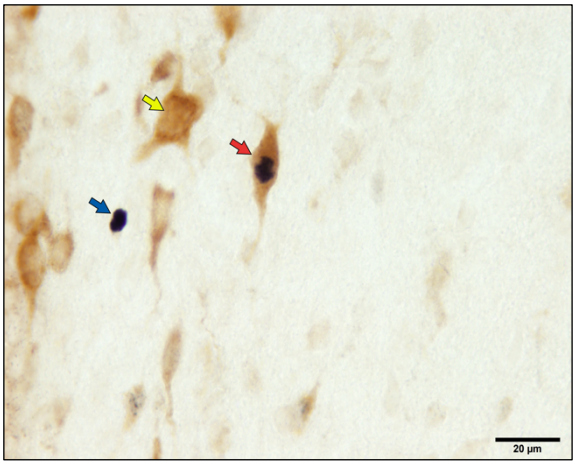
İntraserebroventriküler kanülün doğru yerleştirip yerleştirilmediği histolojik olarak teyit edildi. Bu amaçla, her bir deney grubu için bir hayvana ait beyin kesitleri krezil viyole ile boyandı (Şekil 15). Kanülün doğru lokalizasyonda olduğu tespit edilen deney grupları çalışmaya dahil edildi.



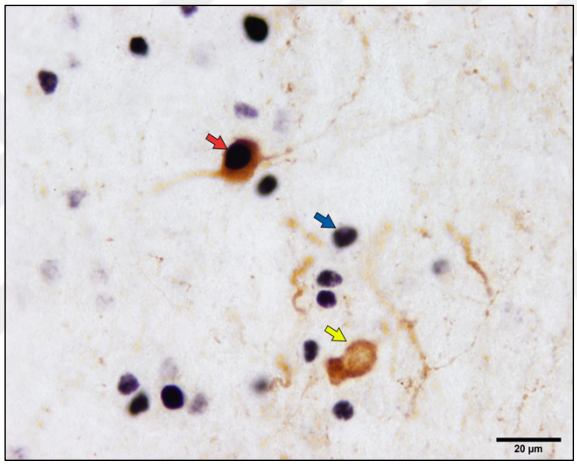
Şekil 15. (A) Krezil viyole boyamasıyla i.s.v. kanül yerleşiminin belirlenmesi 1,25X. (**B**) Sağ panelde ok ile implante edilen kanülün izi gösterilmektedir 40X.

4.2. Nesfatin-1, Oksitosin ve Vazopresssin Nöronlarında İmmünohistokimyasal İşaretlemelerin Değerlendirilmesi

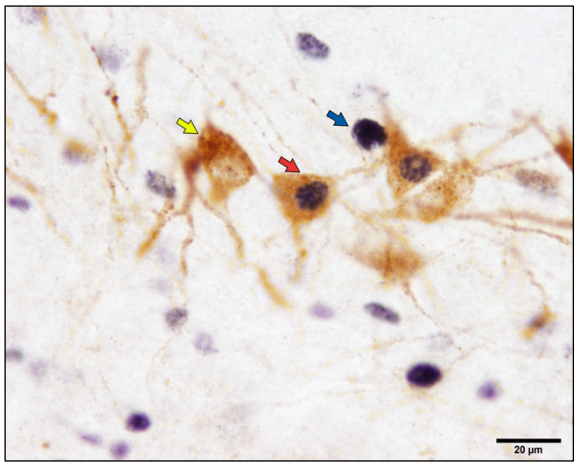
Deney gruplarından elde edilen kesitlerde ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi kullanılarak nesfatin-1, oksitosin, vasopressin nöronlarında c-Fos işaretlemeleri yapıldı. Nöronal çekirdeklerdeki c-Fos immünoreaktivitesi, nikel-DAB kromojen-substrat solüsyonu ile siyah renkte izlenirlen, aynı kesitlerdeki sitoplazmik nesfatin-1 (Şekil 16), vazopressin (Şekil 17), oksitosin (Şekil 18) immünopozitifliği DAB ile kahverengi olarak ile belirlendi. Hem sitoplazmik (kahverengi) hem de çekirdek (siyah) boyanması sahip ikili işaretlenmiş nöronlar, aktive nöron olarak kabul edildi.



Şekil 16. Nesfatin-1 nöronlarında immünohistokimyasal işaretlemeler. Paraventriküler çekirdekte c-Fos pozitif nöron çekirdekleri siyah renkli (mavi ok), nesfatin-1 pozitif nöron kahverengi renkli (sarı ok), c-Fos eksprese eden nesfatin-1 nöronları kırmızı ok ile gösterilmektedir.



Şekil 17. Vazopressin nöronlarında immünohistokimyasal işaretlemeler. Paraventriküler çekirdekte c-Fos-pozitif nöron çekirdekleri siyah renkli (mavi ok), vazopressin-pozitif nöron kahverengi renkli (sarı ok), c-Fos eksprese eden vazopressin nöronları kırmızı ok ile gösterilmektedir.



Şekil 18. Oksitosin nöronlarında immünohistokimyasal işaretlemeler. Paraventriküler çekirdekte c-Fos-pozitif nöron çekirdekleri siyah renkli (mavi ok), oksitosin-pozitif nöron kahverengi renkli (sarı ok), c-Fos eksprese eden oksitosin nöronları kırmızı ok ile gösterilmektedir.

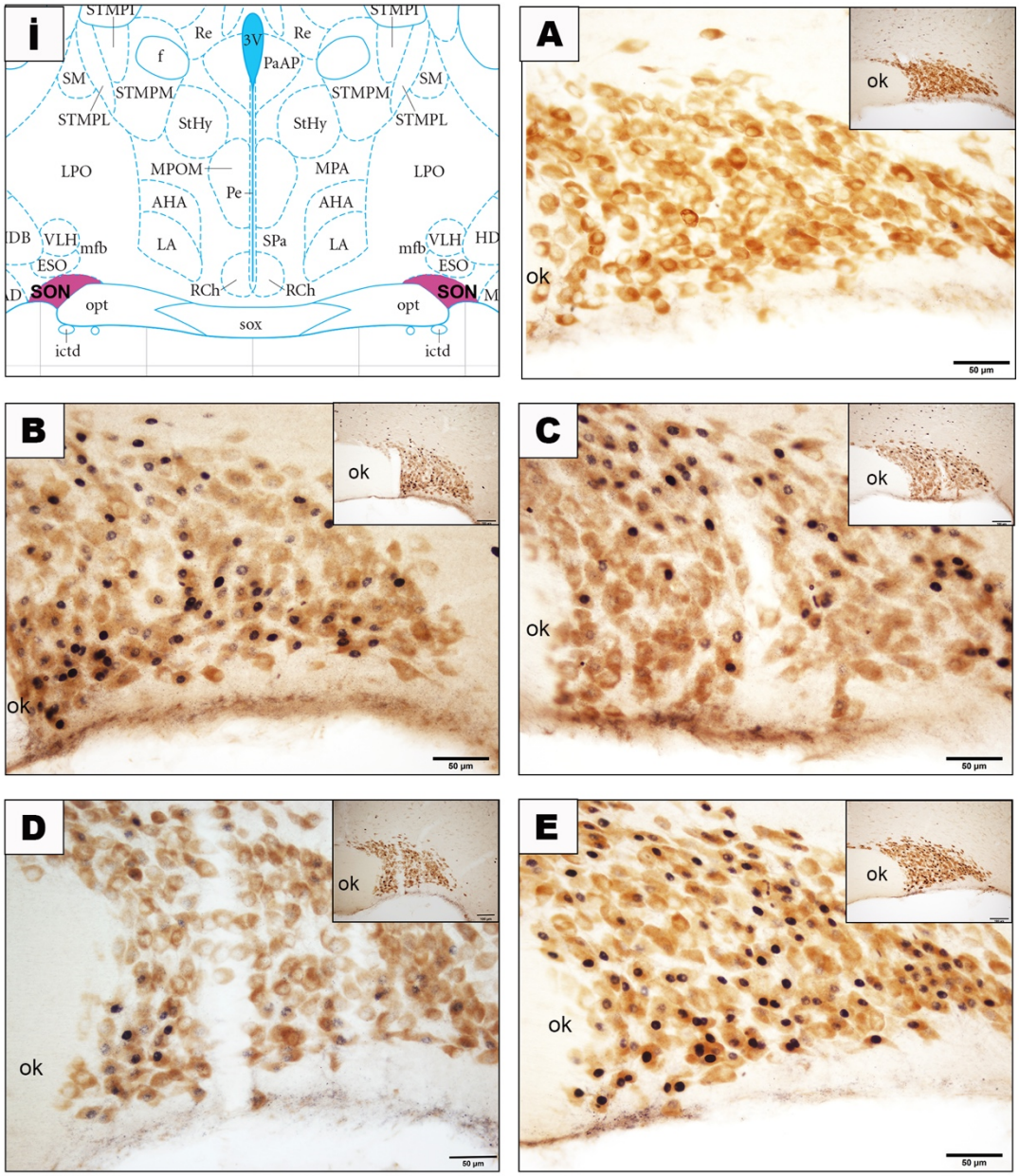
4.3. Üridin, Üridin Nükleotidleri ve Reseptör Antagonistlerinin Nesfatin-1 Nöronlarına Etkisinin Araştırılması

4.3.1. Üridin ve Üridin Nükleotidlerinin Supraoptik Çekirdekte Yerleşik Nesfatin-1 Nöronlarının Aktivasyonuna Etkisinin Araştırılması

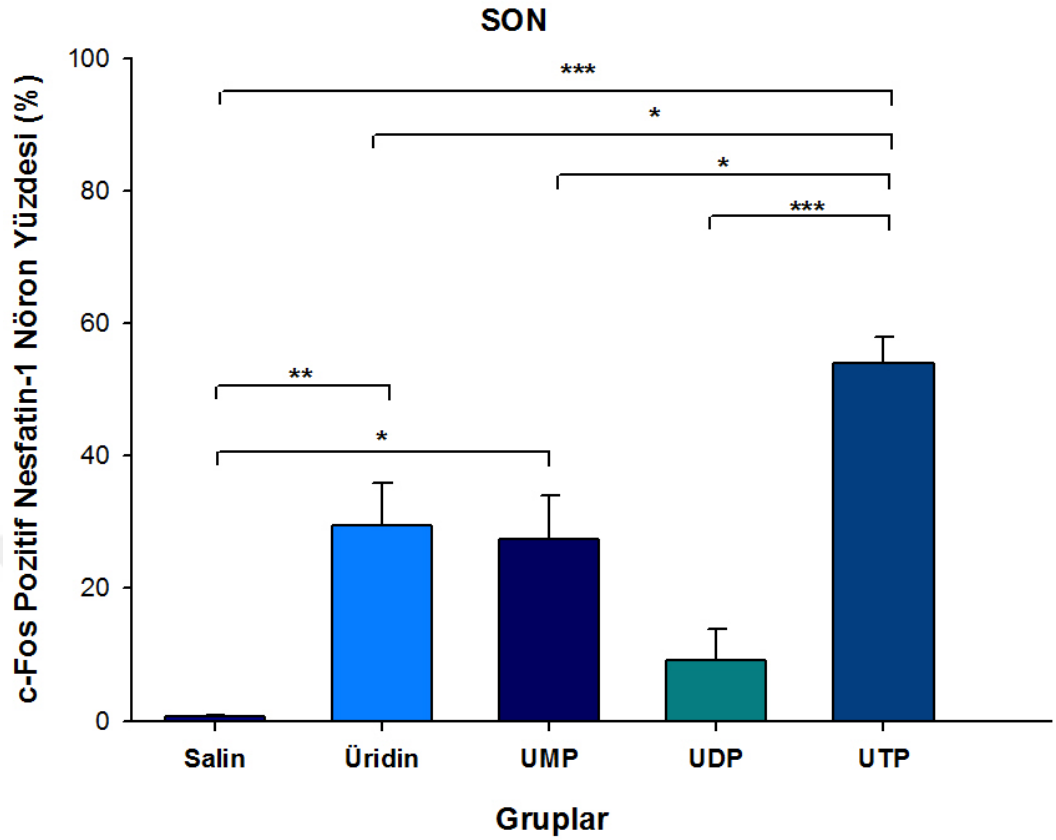
İntraserebroventriküler yolla uygulanan üridin ve üridin nükleotidleri; UMP, UDP ile UTP'nin supraoptik çekirdekte yerleşik nesfatin-1 nöronları üzerindeki etkisini incelemek amacıyla kesitler, nesfatin-1 ve c-Fos proteinleri için ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi ile boyandı (Şekil 19). Yapılan sayımlar sonucunda SON'de c-Fos-pozitif nesfatin-1 nöronlarının yüzdesi salin grubunda %0,69±0,23; üridin grubunda %29,43±6,62; UMP grubunda %27,38±6,65; UDP grubunda %9,24±4,63 ve UTP grubunda %53,99±4,06 olarak bulundu (Şekil 19, Şekil 20).

İstatistiksel analizler sonucunda; UTP grubunda, üridin, UMP ve UDP gruplarına göre c-Fos-pozitif nesfatin-1 nöronlarının yüzdesinin anlamlı olarak fazla olduğu bulundu (sırasıyla $p<0,001$; $p=0,043$; $p=0,014$; $p<0,001$). SON'de salin ve UMP grubu karşılaştırıldığında, UMP uygulamasının c-Fos-pozitif nesfatin-1 nöron yüzdesini salin grubuna göre anlamlı olarak arttırdığı belirlendi ($p=0,030$) (Şekil 20). Benzer şekilde salin ve üridin grubu karşılaştırıldığında, üridin uygulamasının aktive olmuş nesfatin-1 nöron yüzdesini salin grubuna göre anlamlı olarak arttırdığı gösterildi ($p=0,004$).

Supraoptik çekirdekte UDP uygulamasının, salin grubuna göre, c-Fos-pozitif nesfatin-1 nöronlarının oranını artırdığı gözlendi. Ancak istatistiksel olarak değerlendirildiğinde nöron aktivasyonundaki artışın anlamlı olmadığı bulundu ($p=0,777$) (Şekil 20).



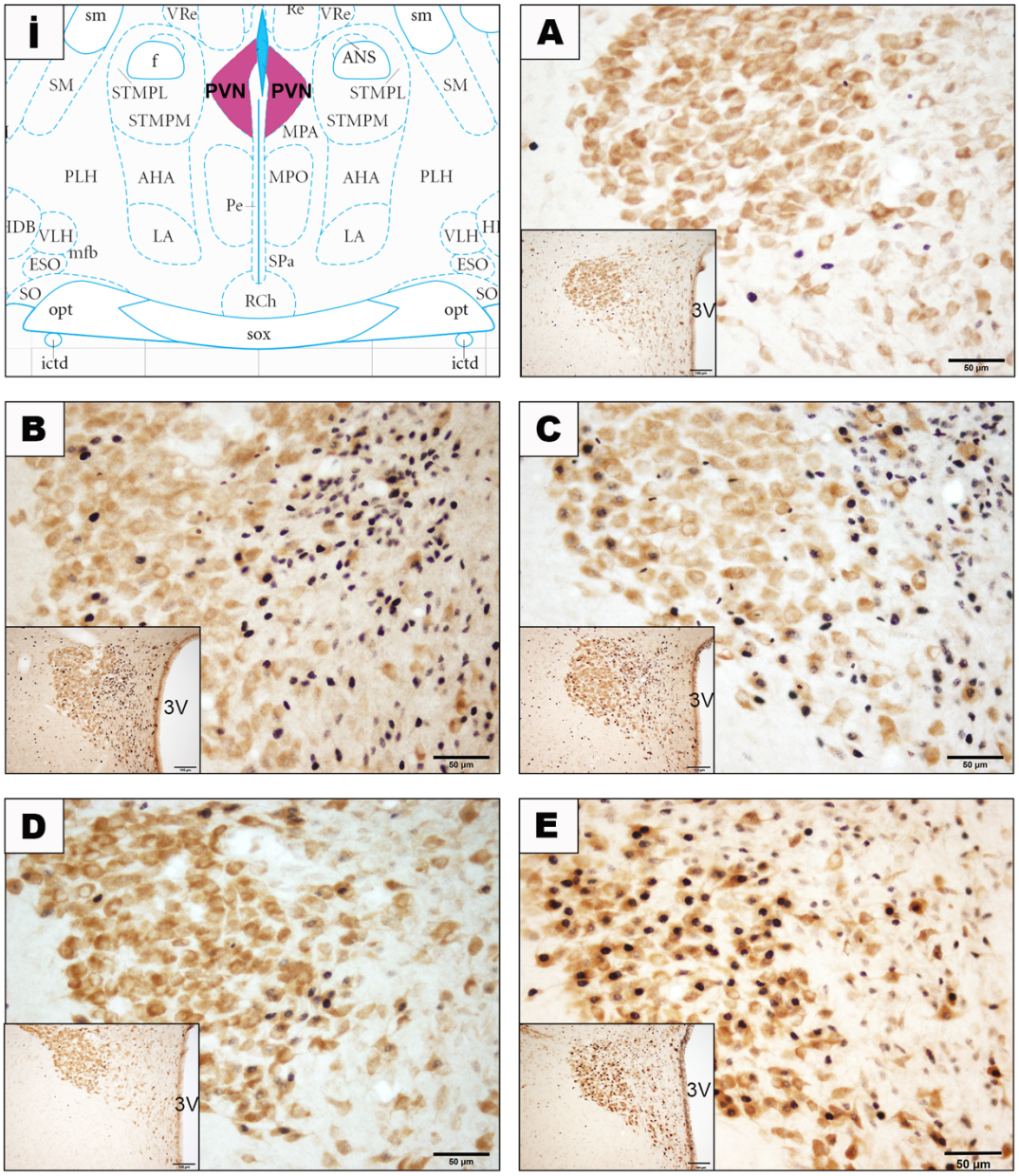
Şekil 19. Üridin ve üridin nükleotidleri gruplarında SON'de nesfatin-1 nöronlarında c-Fos ekspresyonu. (**i**) Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre SON'nin lokalizasyonu. **(A)** Salin grubu, (**B**) Üridin grubu, (**C**) UMP grubu, (**D**) UDP grubu, (**E**) UPT grubu 40X, 20X (küçük resimler). ok: Optik kiyazma.



Şekil 20. Üridin ve üridin nükleotidlerinin i.s.v. enjeksiyonu sonrası SON'de c-Fos-pozitif nesfatin-1 nöron oranlarının karşılaştırılması (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

4.3.2. Üridin ve Üridin Nükleotidlerinin Paraventriküler Çekirdekte Yerleşik Nesfatin-1 Nöronlarının Aktivasyonuna Etkisinin Araştırılması

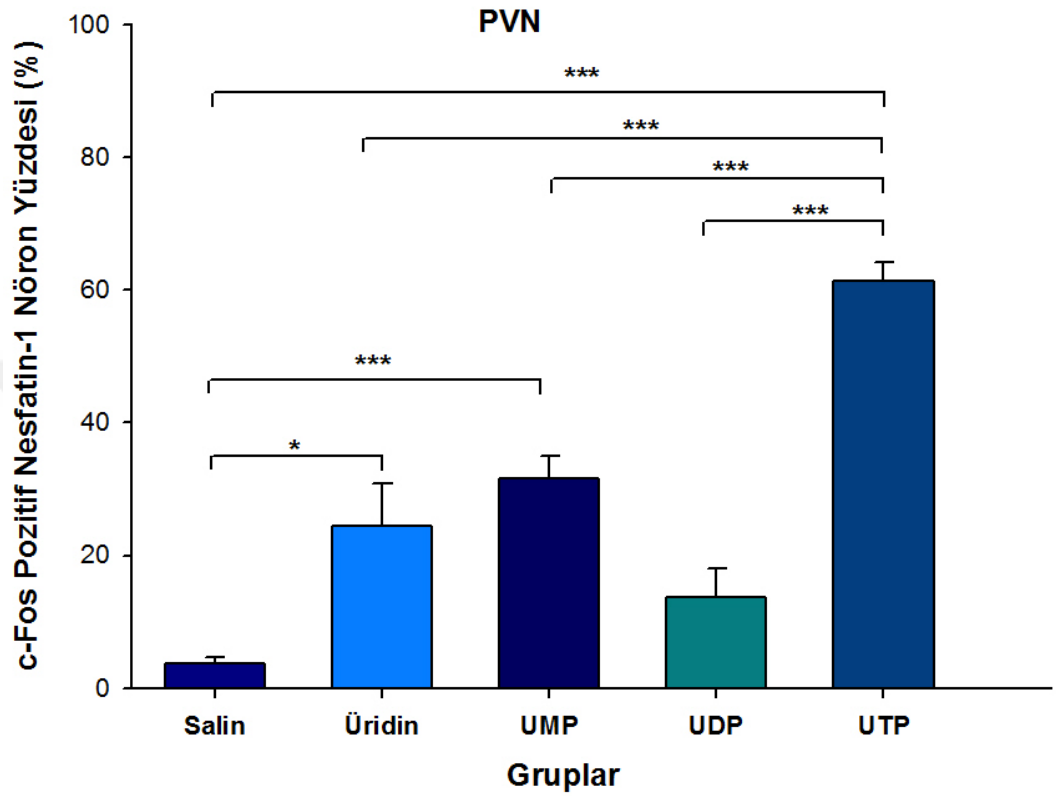
İntraserebroventriküler yolla uygulanan üridin ve üridin nükleotidleri UMP, UDP ve UTP'nin paraventriküler çekirdekte yerleşik nesfatin-1 nöronları üzerindeki etkisini incelemek amacıyla ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi uygulanan kesitlerde nesfatin-1-pozitif nöronların sayımı sonucunda, PVN'de c-Fos-pozitif nesfatin-1 nöronlarının oranı salin grubunda %3,81±0,89; üridin grubunda %24,43±6,34; UMP grubunda %31,68±3,27; UDP grubunda %13,71±4,41 ve UTP grubunda %61,40±2,71 olarak bulundu (Şekil 21, Şekil 22).



Şekil 21. Üridin ve üridin nükleotidleri gruplarında ikili indirekt immünoperoksidaz işaretleme tekniği ile PVN'de nesfatin-1 nöronlarında c-Fos ekspresyonu. (**i**) Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre PVN'nin lokalizasyonu. **(A)** Salin grubu, (**B**) Üridin grubu, (**C**) UMP grubu, (**D**) UDP grubu, (**E**) UTP grubu 40X, 20X (küçük resimler). 3V: 3. Ventrikül.

İstatistiksel analizler sonucunda; UTP grubunda c-Fos-pozitif nesfatin-1 nöronlarının yüzdesinin salin, üridin, UMP ve UDP gruplarından anlamlı olarak fazla olduğu bulundu ($p<0,001$). PVN'de salin grubu, üridin ve UMP grubu ile karşılaştırıldığında üridin ve UMP uygulamasının c-Fos-pozitif nesfatin-1 nöronlarının yüzdesini salin grubuna göre anlamlı olarak arttırdığı bulundu (sırasıyla $p=0,012$ ve $p<0,001$) (Şekil 22). Ayrıca PVN'de salin grubuna göre UDP

uygulamasında görülen nesfatin-1 nöron aktivasyonundaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu (p=0,421) (Şekil 22).



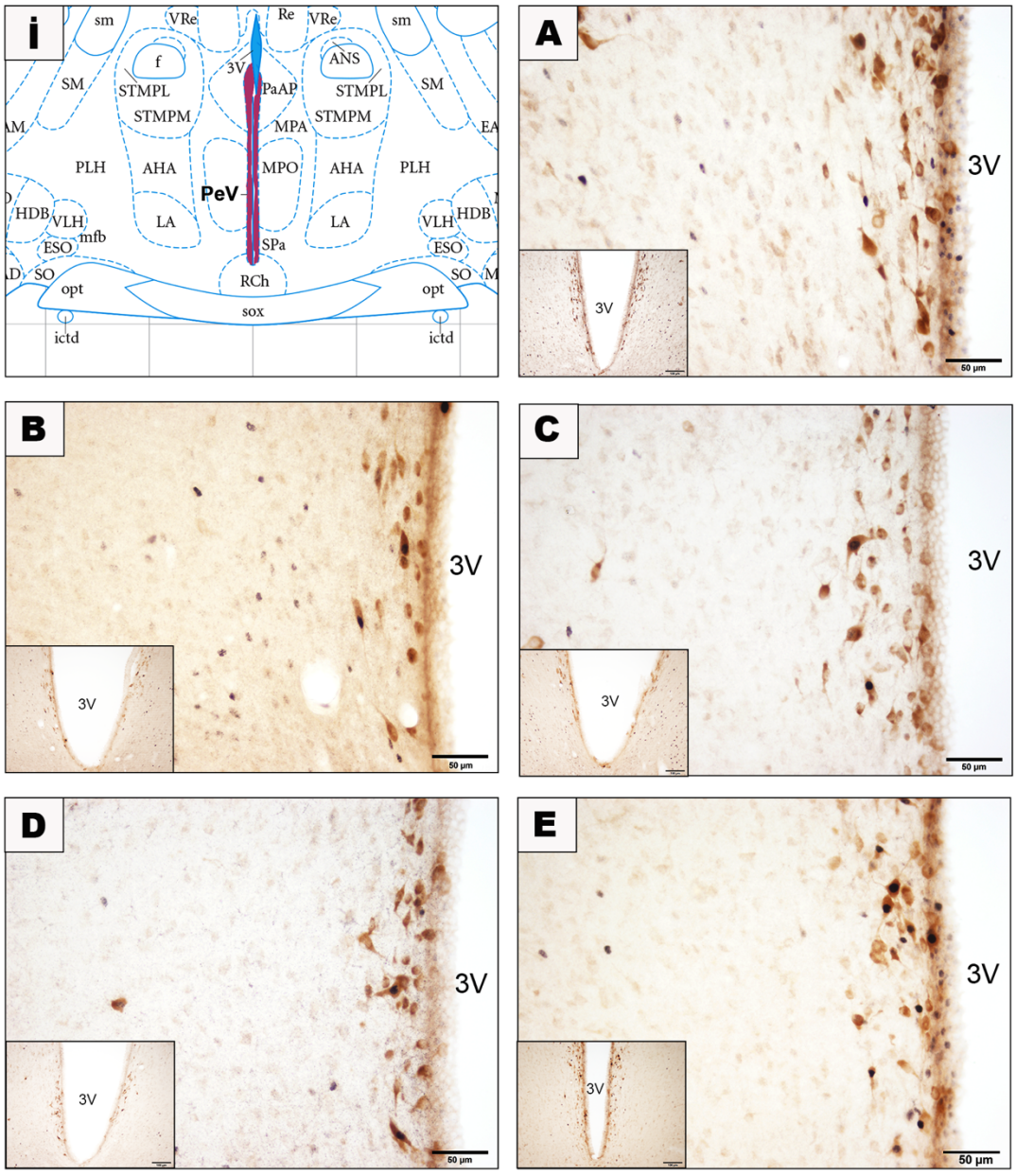
Şekil 22. Üridin ve üridin nükleotidlerinin i.s.v. enjeksiyonu sonrası deney gruplarında PVN'de c-Fos-pozitif nesfatin-1 nöron oranlarının karşılaştırılması (*p<0,05; ***p<0,001).

4.3.3. Üridin ve Üridin Nükleotidlerinin Periventriküler Çekirdekte Yerleşik Nesfatin-1 Nöronlarının Aktivasyonuna Etkisinin Araştırılması

İntraserebroventriküler yolla uygulanan üridin ve üridin nükleotidleri; UMP, UDP ve UTP'nin periventriküler çekirdeğin nesfatin-1 nöronları üzerinde etkisini incelemek amacıyla kesitlerde ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi ile nesfatin-1 ve c-Fos işaretlemeleri yapıldı (Şekil 23). Elde edilen sayımlar sonucunda PeV'de c-Fos-pozitif nesfatin-1 nöronlarının yüzdesi, salin grubunda %4,05±1,64; üridin grubunda %26,01±5,04; UMP grubunda %31,96±3,88; UDP grubunda %14,48±3,83 ve UTP grubunda %37,85±3,07 olarak bulundu (Şekil 23, Şekil 24).

Gruplar karşılaştırıldığında; UTP grubunda c-Fos-pozitif nesfatin-1 nöron yüzdesinin, salin, üridin, UMP ve UDP gruplarından daha fazla olduğu bulundu.

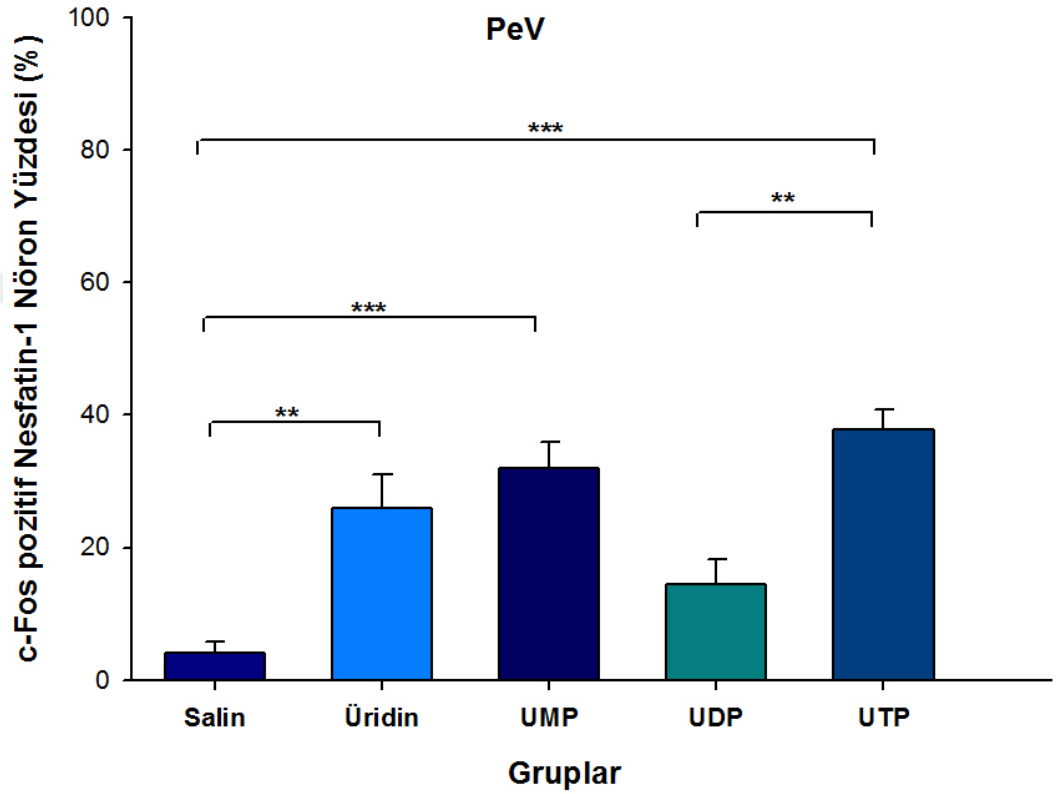
İstatistiksel analizler sonucu UTP uygulmasının neden olduğu bu artışın, salin ve UDP gruplarına göre anlamlı olduğu belirlendi (sırasıyla p<0,001 ve p<0,01) (Şekil 24).



Şekil 23. Üridin ve üridin nükleotidleri gruplarında ikili indirekt immünoperoksidaz işaretleme tekniği ile PeV'deki nesfatin-1 nöronlarında c-Fos ekspresyonu. (**i**) Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre PeV'nin lokalizasyonu **(A)** Salin grubu, (**B**) Üridin grubu, (**C**) UMP grubu, (**D**) UDP grubu ve (**E**) UTP grubu 40X, 20X (küçük resimler). 3V: 3. ventrikül.

PeV'de salin grubuna göre, üridin ve UMP uygulamasının c-Fos-pozitif nesfatin-1 nöronlarının yüzdesini anlamlı olarak arttırdığı bulundu (sırasıyla p=0,003

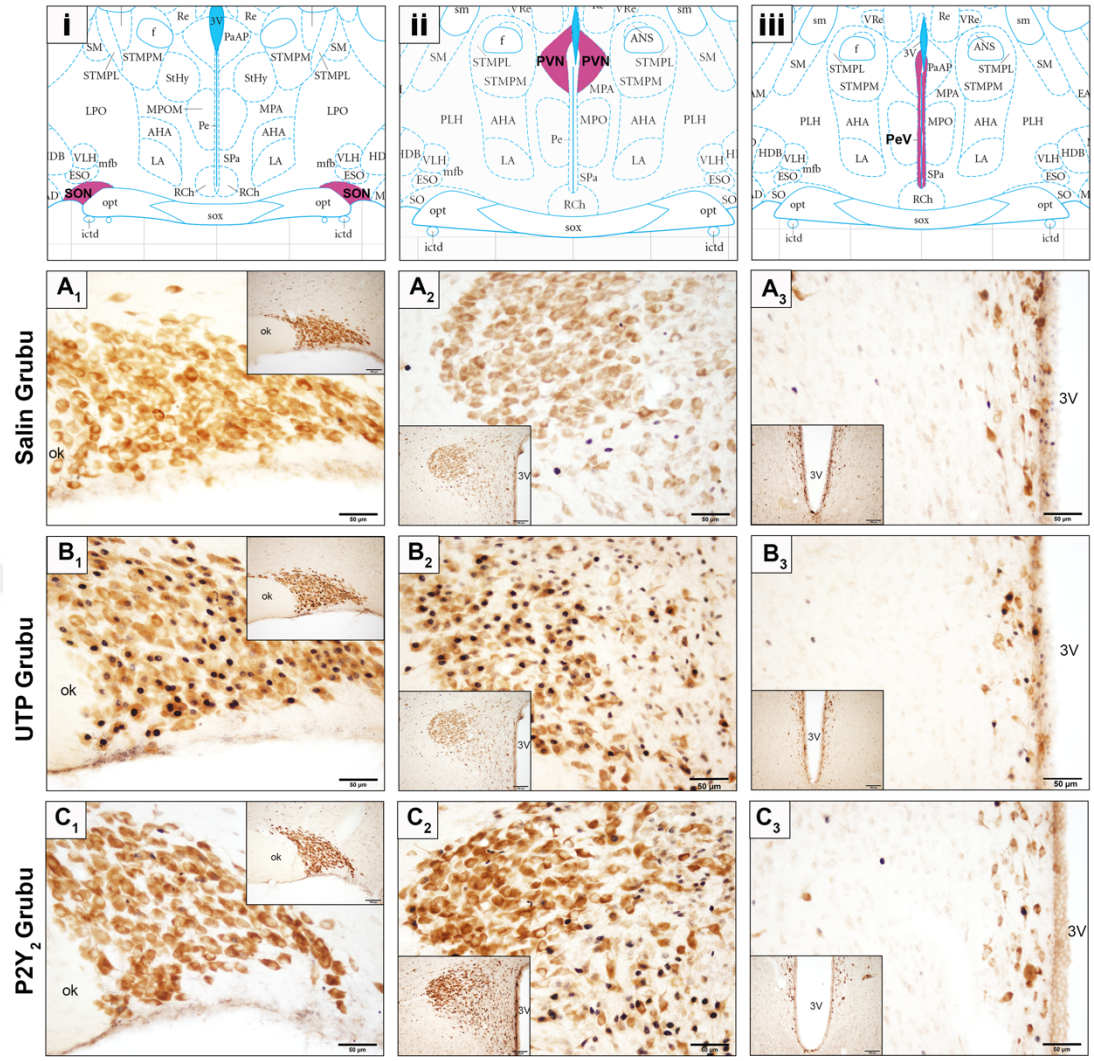
ve p<0,001) (Şekil 24). Ayrıca; salin grubuna göre UDP uygulamasında görülen nesfatin-1 nöron aktivasyonundaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu (p=0,298) (Şekil 24).



Şekil 24. Üridin ve üridin nükleotidlerinin i.s.v. enjeksiyonu sonrası PeV'de c-Fos-pozitif nesfatin-1 nöron oranlarının karşılaştırılması. (**p<0,01; ***p<0,001).

4.3.4. $P2Y_2$ Reseptör Antagonisti AR-C 118925XX Ön-uygulamasının, Üridin Nükleotidi UTP'nin SON, PVN ve PeV'de Yerleşik Nesfatin-1 Nöronlarının Aktivasyonuna Etkisini Baskılamasının Araştırılması

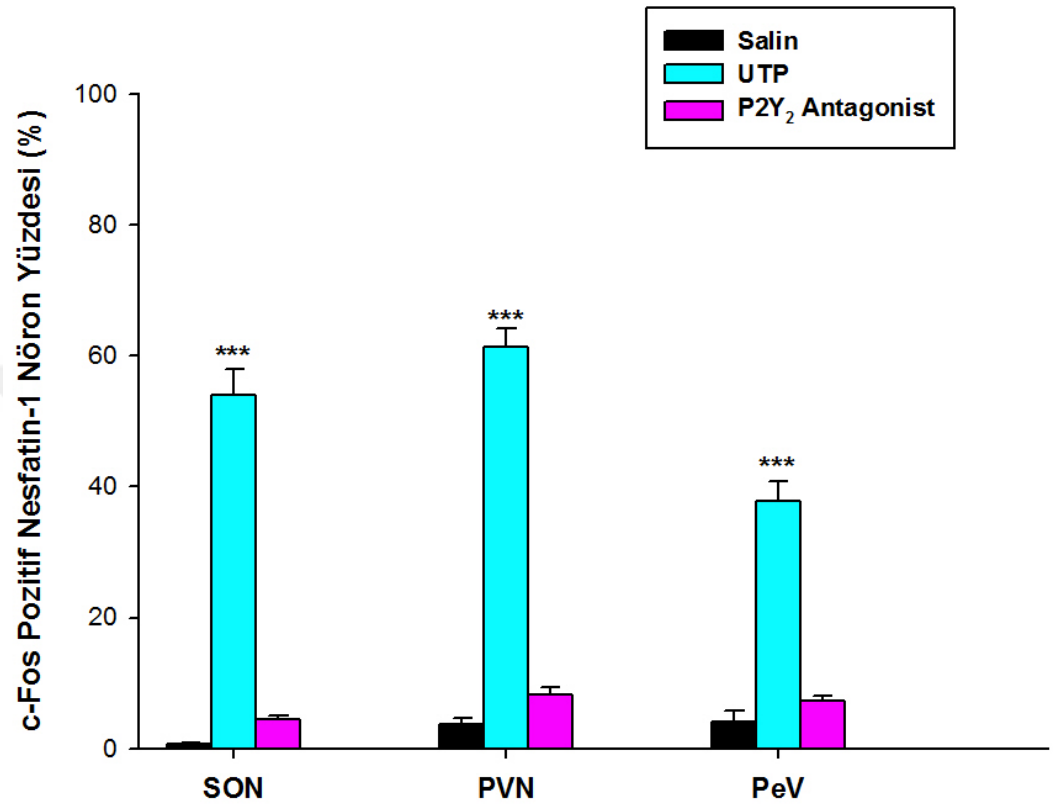
Üridin ve nükleotidlerinin bağlandıkları reseptörlerin ilgili nöron gruplarının aktivasyonundaki rolünü göstermek amacıyla i.s.v. yolla önce reseptörlerin inhibitörleri, 15 dakika sonrada ilgili reseptöre bağlanan nükleotidler i.s.v. yolla deneklere enjekte edildi. Bu deneklerden elde edilen kesitlere nesfatin-1 ve c-Fos proteinlerinin ekspresyonunu göstermek amacıyla ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi uygulandı (Şekil 25).



Şekil 25. $P2Y_2$ reseptör antagonisti (AR-C 118925XX) ve üridin nükleotidi UTP'nin SON, PVN ve PeV'de yerleşik nesfatin-1 nöronlarında c-Fos ekspresyonuna etkisi. Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre (**i**) SON, (**ii**) PVN, (**iii**) PeV'in lokalizasyonu. (**A_1-A_3**) Salin grubu, (**B_1-B_3**) UTP grubu, (**C_1-C_3**) $P2Y_2$ antagonist grubu 40X, 20X (küçük resimler). ok: Optik kiyazma, 3V: 3. ventrikül.

Supraoptik çekirdekte; UTP uygulamasının c-Fos-pozitif nesfatin-1 nöronlarının yüzdesini (%53,99±4,06) salin uygulanan grubuna göre (%0,69±0,23) anlamlı olarak arttırdığı bulundu ($p<0,001$). UTP'den önce $P2Y_2$ reseptör antagonisti verilen grupta nöronal aktivasyonun anlamlı olarak baskılandığı görüldü (%4,41±0,65). Benzer sonuçlar PVN'de yerleşik nesfatin-1 nöronları açısından da elde edildi (Salin: %3,81±0,89; UTP: %61,40±2,71; Antagonist: %8,31±1,06; $p<0,001$). Periventriküler çekirdekte ise salin gruba göre (%4,05±1,64) UTP'nin, anlamlı olarak yüksek sayıda nesfatin-1 nöronunu (37,85±3,07) aktive ettiği ve bu aktivasyonun $P2Y_2$ reseptör antagonisti (%7,22±0,75) ile baskıladığı belirlendi

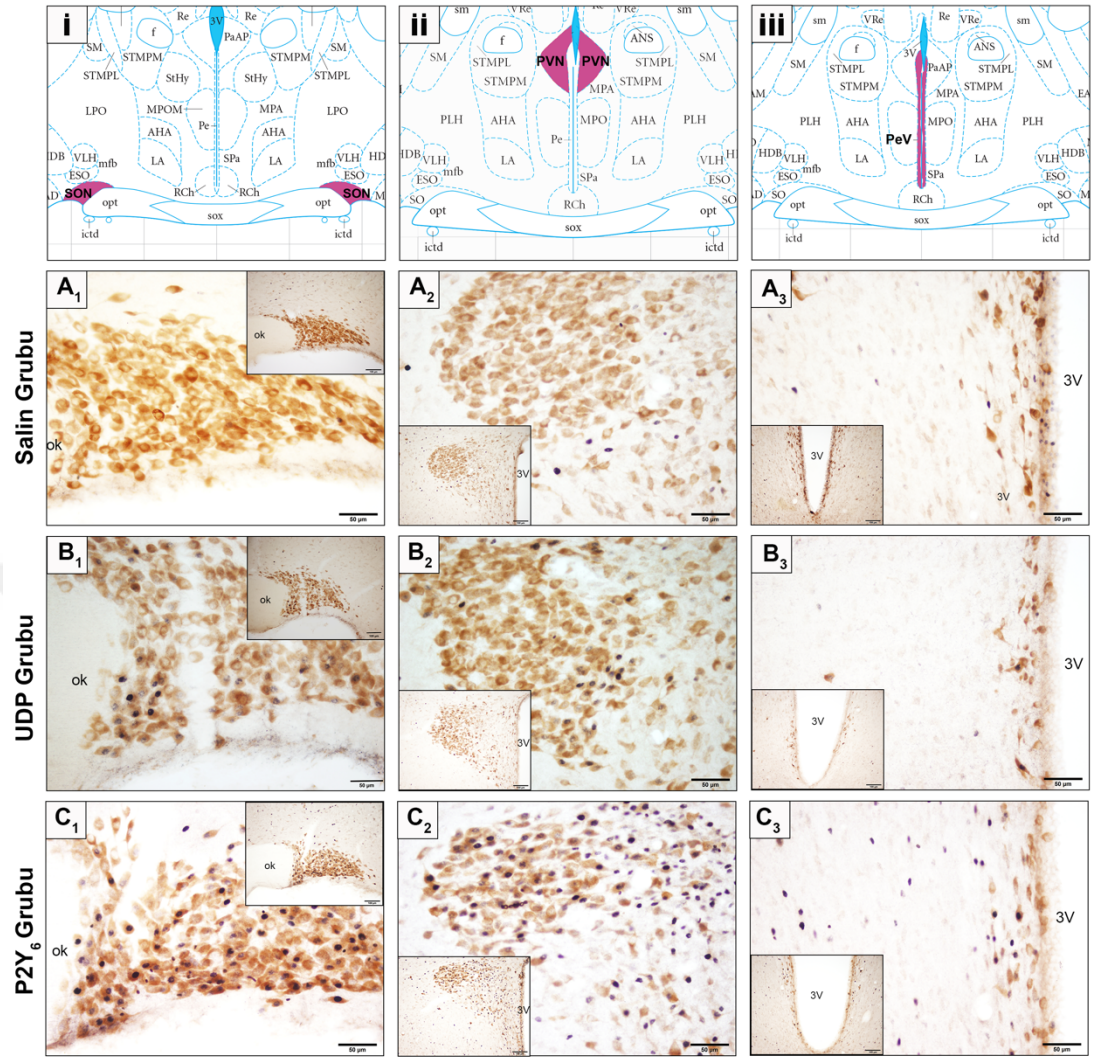
(p<0,001). Tüm çekirdeklerde salin ve $P2Y_2$ reseptör antagonist grupları arasında aktive olan nöron yüzdesi açısından anlamlı fark olmadığı istatistiksel olarak gösterildi (SON: p=0,529; PVN: p=0,210; PeV: p=0,539) (Şekil 25, Şekil 26).



Şekil 26. $P2Y_2$ reseptör antagonisti (AR-C 118925XX) ve üridin nükleotidi UTP'nin i.s.v. enjeksiyonu sonrası deney gruplarında SON, PVN ve PeV'de c-Fos-pozitif nesfatin-1 nöron oranlarının karşılaştırılması (***p<0,001).

4.3.5. $P2Y_6$ Reseptör Antagonisti MRS2578 Ön-uygulamasının, Üridin Nükleotidi UDP'nin SON, PVN ve PeV'de Yerleşik Nesfatin-1 Nöronlarının Aktivasyonuna Etkisini Baskılamasının Araştırılması

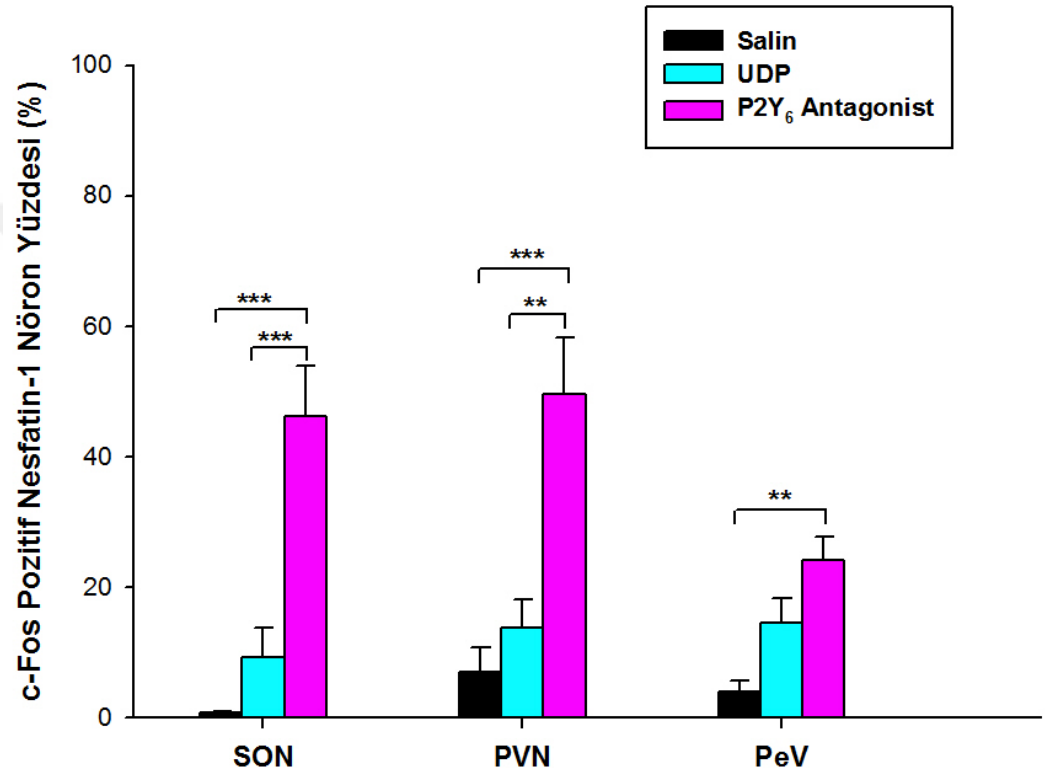
İntraserebroventriküler yolla uygulanan $P2Y_6$ reseptör antagonistinin ve UDP'nin SON, PVN ve PeV çekirdekte yerleşik nesfatin-1 nöronları üzerinde etkisini incelemek amacıyla ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi kullanılarak kesitlerde nesfatin-1 ve c-Fos işaretlemeleri yapıldı (Şekil 27).



Şekil 27. $P2Y_6$ reseptör antagonisti (MRS2578) ve üridin nükleotidi UDP'nin SON, PVN ve PeV'de nesfatin-1 nöronlarında c-Fos ekspresyonuna etkisi. Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre (**i**) SON, (**ii**) PVN, (**iii**) PeV'nin lokalizasyonu. (**A_1-A_3**) Salin grubu, (**B_1-B_3**) UDP grubu, (**C_1-C_3**) $P2Y_6$ antagonist grubu 40X, 20X (küçük resimler). ok: Optik kiyazma, 3V: 3. ventrikül.

Supraoptik çekirdekte; elde edilen sayımların istatistiki değerlendirmesi sonucunda, $P2Y_6$ reseptör antagonisti ön uygulamasının, beklenenin aksine, salin ve UDP grubuna göre nöronal aktivasyonu baskılamadığı hatta anlamlı olarak arttırdığı bulundu (Salin: %0,69±0,23; UDP: %9,24±4,63; Antagonist: %46,17±7,66; $p<0,001$). Benzer sonuçlar PVN'de yerleşik nesfatin-1 nöronları açısından da elde edildi (Salin: %3,81±0,89; UDP: %13,71±4,41; Antagonist: %49,56±8,74; salin-P2Y6 antagonisti $p<0,001$; UDP-P2Y6 antagonisti $p=0,005$). Periventrikükler çekirdekte elde edilen sonuçlar da $P2Y_6$ reseptör antagonistinin, UDP'nin nöron aktivasyonuna neden olan etkisini baskılamadığı gibi c-Fos-pozitif nöron sayısını

arttırdığı ancak; bu artışın istatistiksel anlamı olmadığı bulundu (Salin: %4,04±1,64; UDP: %14,48±3,83; Antagonist: %24,10±3,60; p=0,158). Ayrıca, periventriküler çekirdekte salin grubu ile antagonist verilen grup karşılaştırıldığında, MRS2578 uygulaması ile nöronal aktivasyonun anlamlı olarak arttığı bulundu (p=0,005) (Şekil 27, Şekil 28).

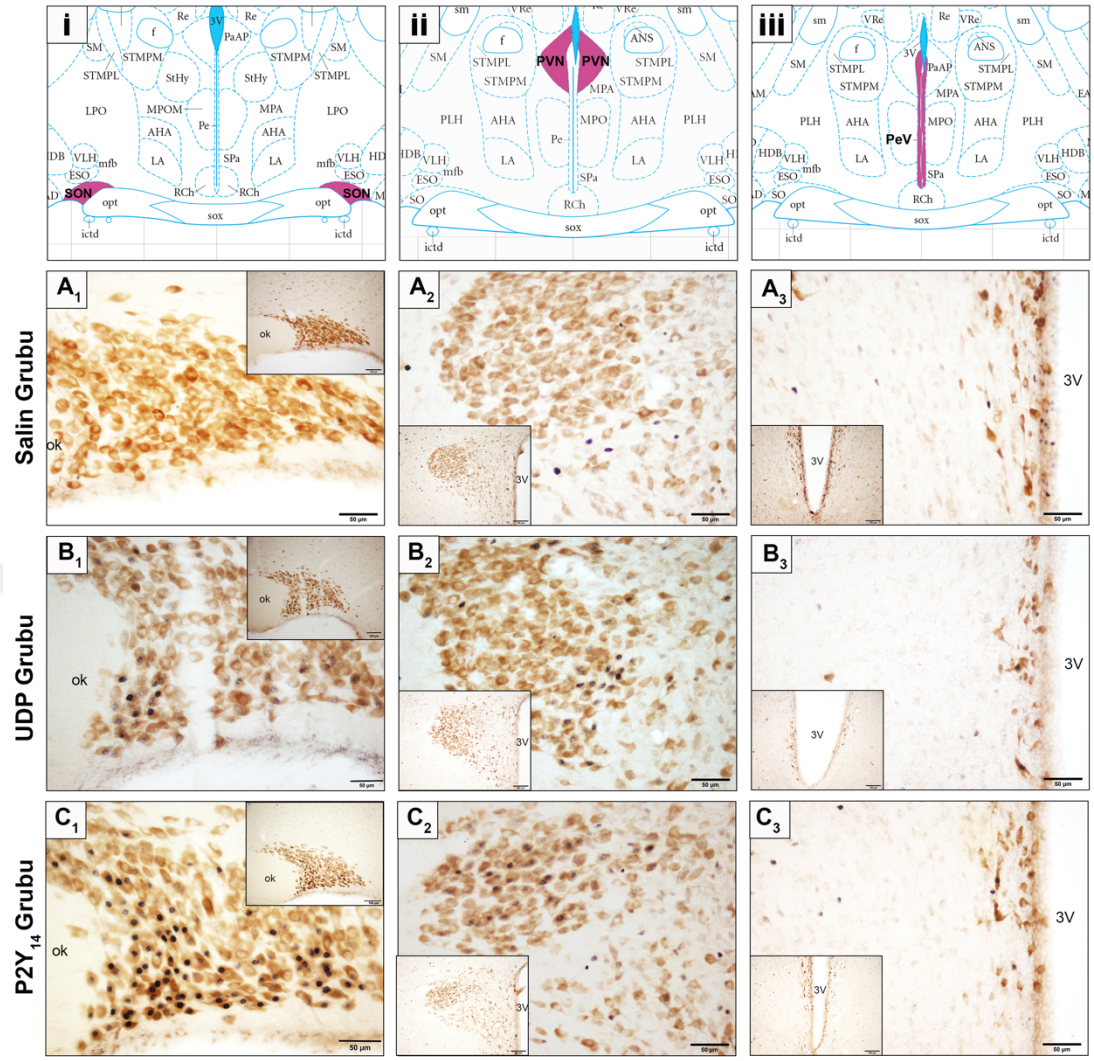


Şekil 28. $P2Y_6$ reseptör antagonisti (MRS2578) ve üridin nükleotidi UDP'nin i.s.v. enjeksiyonu sonrası deney gruplarında SON, PVN ve PeV'de c-Fos-pozitif nesfatin-1 nöron oranlarının karşılaştırılması (**p<0,01; ***p<0,001).

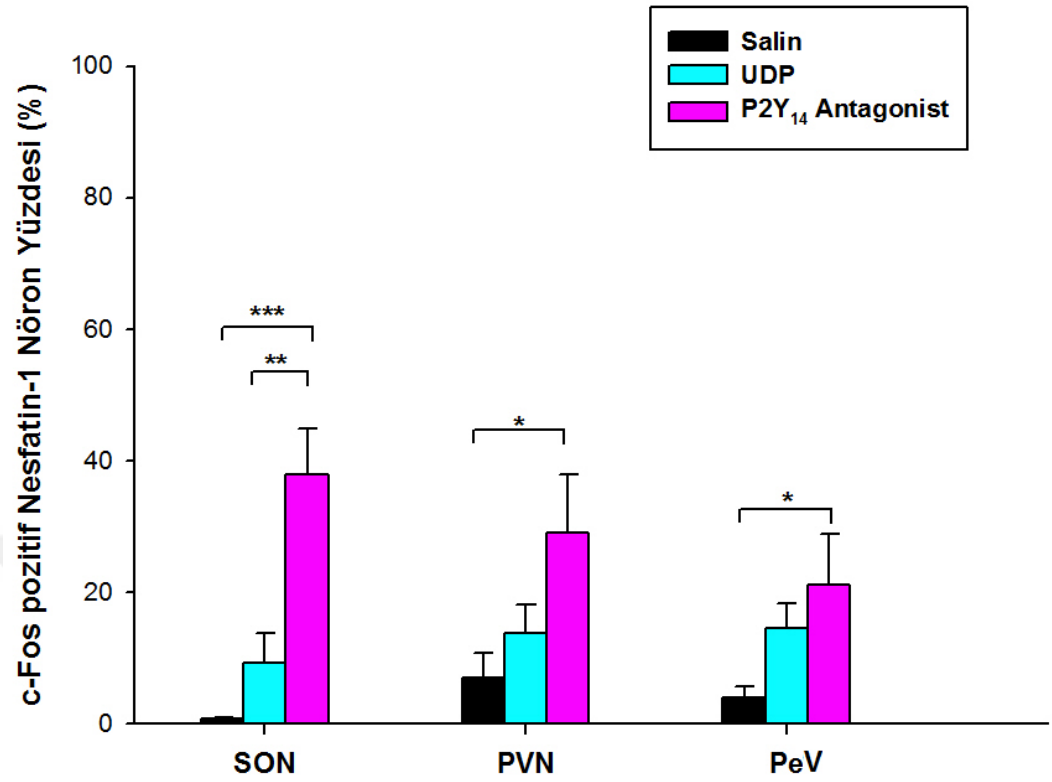
4.3.6. $P2Y_{14}$ Reseptör Antagonisti PPTN hidroklorür Ön-uygulamasının, Üridin Nükleotidi UDP'nin SON, PVN ve PeV'de Yerleşik Nesfatin-1 Nöronlarının Aktivasyonuna Etkisini Baskılamasının Araştırılması

İntraserebroventriküler yolla uygulanan $P2Y_{14}$ reseptör antagonistinin ve UDP'nin SON, PVN ve PeV çekirdekte yerleşik nesfatin-1 nöronları üzerinde etkisini incelemek amacıyla kesitlerde ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi kullanılarak nesfatin-1 ve c-Fos işaretlemeleri yapıldı (Şekil 29).

Supraoptik çekirdekte; yapılan sayımlar sonucunda istatistiksel olarak $P2Y_{14}$ reseptör antagonistinin, salin ve UDP grubuna göre aktive olan nöron sayısında anlamlı artışa neden olduğu bulundu (Salin: 0,69±0,23; UDP: 9,24±4,63; Antagonist: %37,80±7,08 salin-$P2Y_{14}$ antagonisti $p<0,001$; UDP-$P2Y_{14}$ antagonisti $p=0,003$). PVN'de yerleşik nesfatin-1 nöronları açısından UDP enjeksiyonundan önce $P2Y_{14}$ reseptör antagonisti verilmesinin UDP'nin nöronal aktivasyonu uyaran etkisini baskılamak yerine c-Fos-pozitif nesfatin-1 sayısını arttırdığı ancak, bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (Salin: %3,81±0,89; UDP: %13,71±4,41; Antagonist: %29,08±8,84; $p=0,225$). PPTN hidroklorür'ün PeV'de yerleşik nesfatin-1 nöronlarında da benzer etkiye sahip olduğu bulundu (Salin: %4,04±1,64; UDP: %14,48±3,83; Antagonist: %21,19±7,67; $p=0,405$). PVN ve PeV'de UDP enjeksiyonundan önce $P2Y_{14}$ reseptör antagonistinin uygulanmasının, salin grubuna göre nesfatin-1 nöronlarının aktivasyonuna neden olduğu gösterildi (sırasıyla $p=0,037$; $p=0,016$) (Şekil 29, Şekil 30).



Şekil 29. $P2Y_{14}$ reseptör antagonisti (PPTN hidroklorür) ve üridin nükleotidi UDP'nin SON, PVN ve PeV'de nesfatin-1 nöronlarında c-Fos ekspresyonuna etkisi. Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre (**i**) SON, (**ii**) PVN, (**iii**) PeV'nin lokalizasyonu. (**A_1-A_3**) Salin grubu, (**B_1-B_3**) UDP grubu, (**C_1-C_3**) $P2Y_{14}$ antagonist grubu 40X, 20X (küçük resimler). ok: Optik kiyazma, 3V: 3. Ventrikül

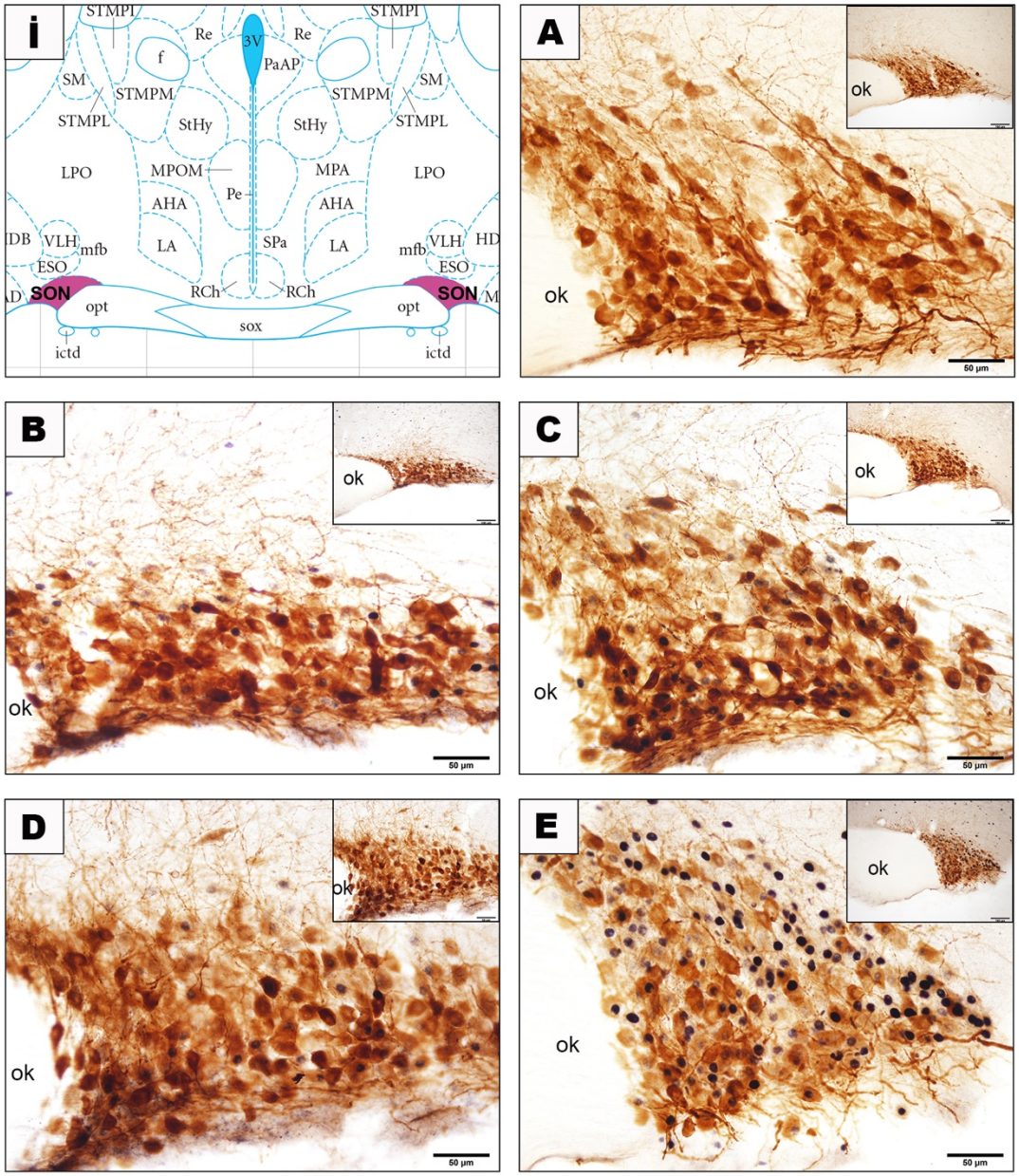


Şekil 30. $P2Y_{14}$ reseptör antagonisti (PPTN hidroklorür) ve üridin nükleotidi UDP'nin i.s.v. enjeksiyonu sonrası deney gruplarında SON, PVN ve PeV'de c-Fos-pozitif nesfatin-1 nöron yüzdelerinin karşılaştırılması (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

4.4. Üridin, Üridin Nükleotidleri ve Reseptör Antagonistlerinin Vazopressin Nöronlarına Etkisinin Araştırılması

4.4.1. Üridin ve Üridin Nükleotidlerinin Supraoptik Çekirdekteki Vazopressin Nöronlarının Aktivasyonuna Etkisinin Araştırılması

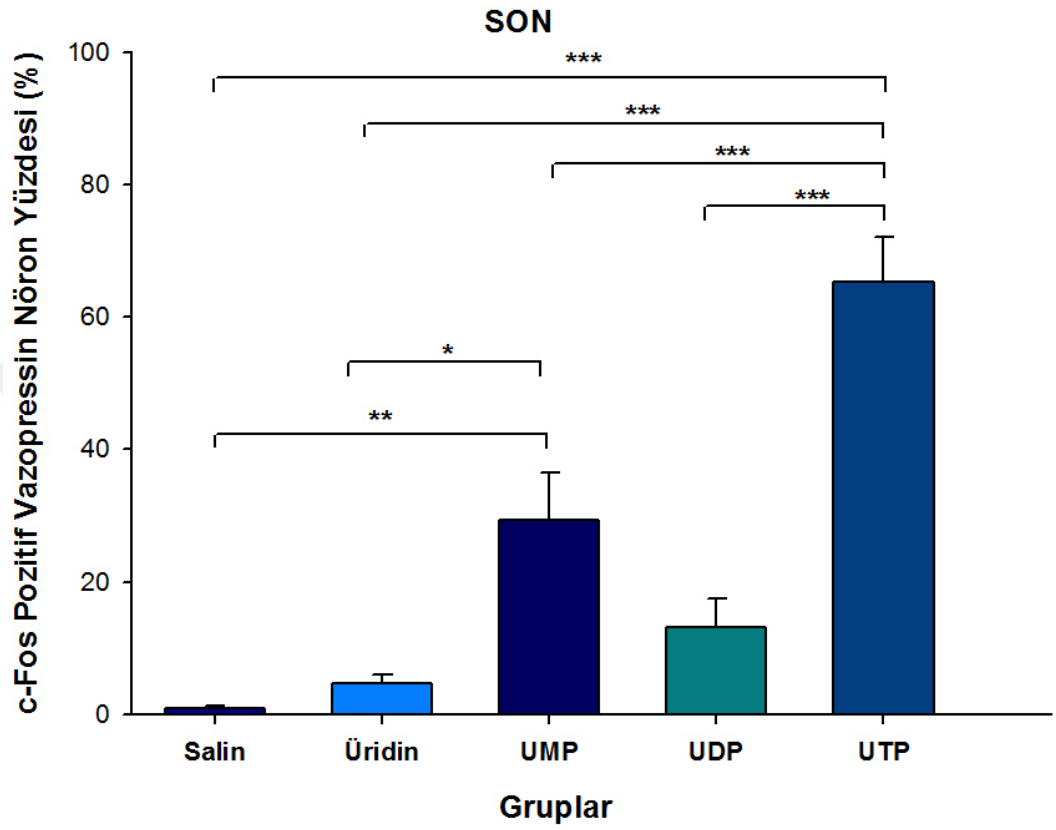
İntraserebroventriküler yolla uygulanan üridin, üridin nükleotidleri; UMP, UDP ve UTP'nin supraoptik çekirdekte yerleşik vazopressin nöronları üzerinde etkisini göstermek amacıyla kesitlerde ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi ile boyanan kesitlerde (Şekil 31), yapılan sayımlar sonucunda SON'de c-Fos-pozitif vazopressin nöronlarının yüzdesi salin grubunda %0,94±0,42; üridin grubunda %4,76±1,22; UMP grubunda %29,46±7,03; UDP grubunda %13,19±4,25 ve UTP grubunda %65,25±6,84 olarak bulundu (Şekil 31, Şekil 32).



Şekil 31. Üridin ve üridin nükleotidleri gruplarında, SON'de yerleşik vazopressin nöronlarında c-Fos ekspresyonunun gösterimi. (**i**) Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre SON'nin lokalizasyonu. **(A)** Salin grubu, (**B**) Üridin grubu, (**C**) UMP grubu, (**D**) UDP grubu, (**E**) UPT grubu 40X, 20X (küçük resimler). ok: Optik kiyazma.

İstatistiksel analizler sonucunda; UTP grubunda c-Fos-pozitif vazopressin nöronlarının yüzdesinin, salin, üridin, UMP ve UDP gruplarından anlamlı olarak fazla olduğu bulundu ($p<0,001$). SON'de UMP uygulamasının c-Fos-pozitif vazopressin nöronlarının yüzdesinin salin ve üridin grubuna göre anlamlı olarak arttırdığı bulundu (sırasıyla $p=0,004$; $p=0,013$) (Şekil 32). Ayrıca. üridin ve UDP uygulamasıyla c-Fos pozitif vazopressin nöronlarının yüzdesinde salin grubuna göre

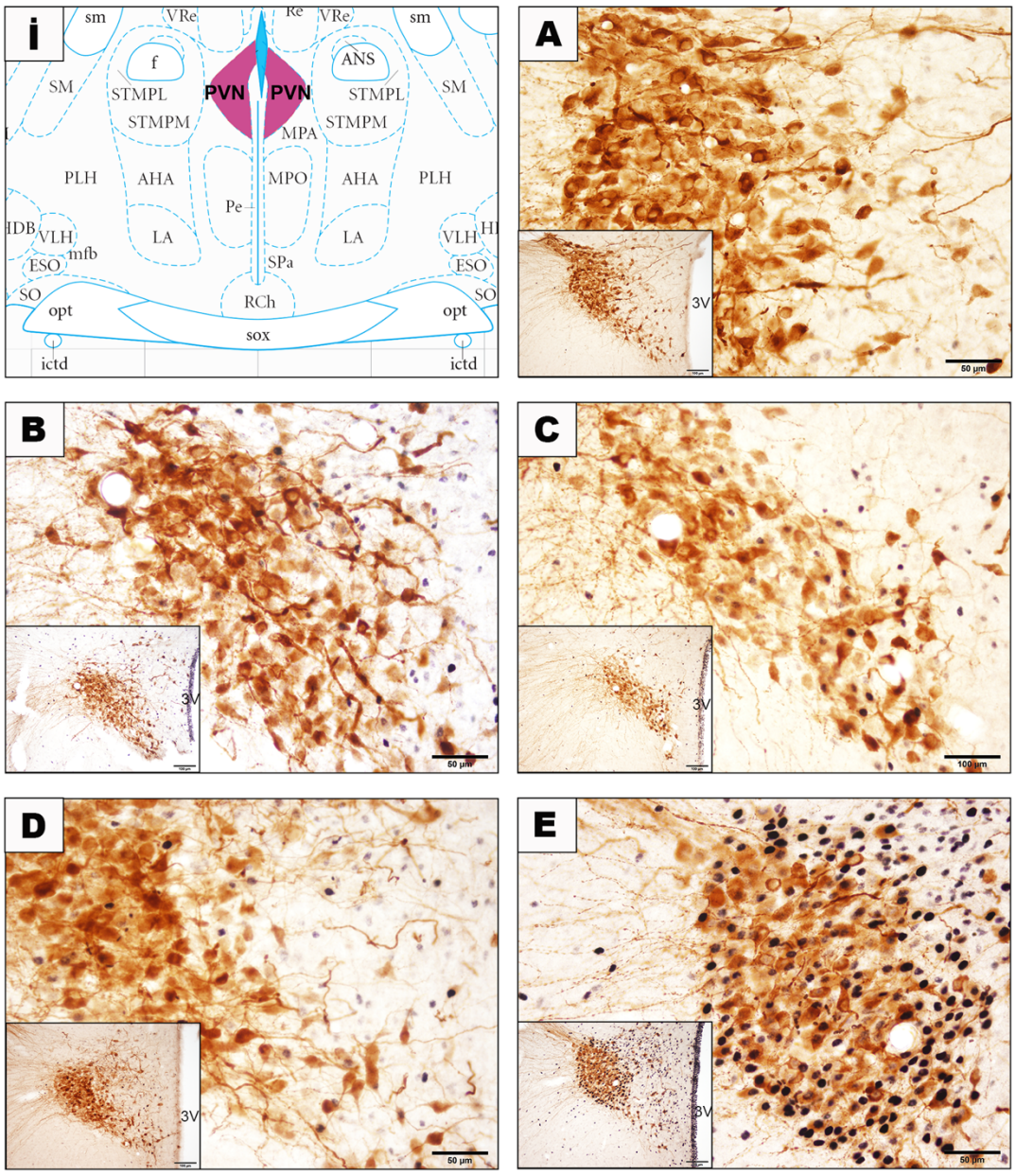
artış gözlendi. Ancak istatistiksel olarak değerlendirildiğinde artışın anlamlı olmadığı bulundu (sırasıyla p=0,979, p=0,403) (Şekil 32).



Şekil 32. Üridin ve üridin nükleotidlerinin i.s.v. enjeksiyonu sonrası SON'de c-Fos-pozitif vazopressin nöron yüzdelerinin karşılaştırılması (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

4.4.2. Üridin ve Üridin Nükleotidlerinin Paraventriküler Çekirdekteki Vazopressin Nöronlarının Aktivasyonuna Etkisinin Araştırılması

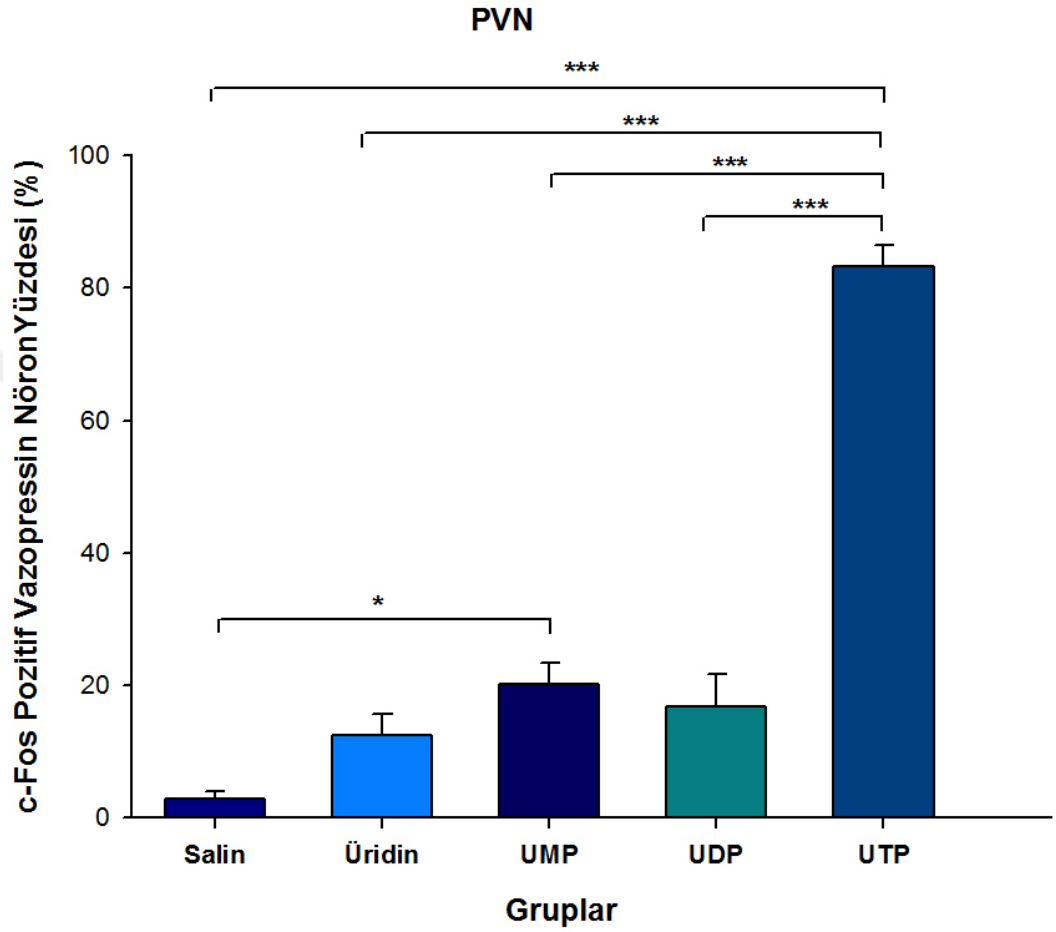
İntraserebroventriküler yolla uygulanan üridin, üridin nükleotidleri; UMP, UDP ve UTP'nin paraventriküler çekirdekte yerleşik vazopressin nöronları üzerinde etkisini incelemek amacıyla kesitlerde ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi kullanılarak vazopressin ve c-Fos işaretlemeleri yapıldı (Şekil 33). Elde edilen sayımlar sonucunda PVN'de c-Fos pozitif vazopressin nöronlarının yüzdesi salin grubunda %3,81±0,81, üridin grubunda %12,50±3,28, UMP grubunda %20,26±3,08, UDP grubunda %16,87±4,88 ve UTP grubunda %82,37±1,51 olarak bulundu (Şekil 33, Şekil 34).



Şekil 33. Üridin ve üridin nükleotidlerinin PVN'de vazopressin nöronlarında c-Fos ekspresyonuna etkisi. (**i**) Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre PVN'nin lokalizasyonu. **(A)** Salin grubu, (**B**) Üridin grubu, (**C**) UMP grubu, (**D**) UDP grubu, (**E**) UTP grubu 40X, 20X (küçük resimler). 3V: 3. ventrikül.

İstatistiksel analizler sonucunda; UTP grubunda c-Fos-pozitif vazopressin nöronlarının yüzdesinin, salin, üridin, UMP ve UDP gruplarından anlamlı olarak fazla olduğu bulundu ($p<0,001$). PVN bölgesinde UMP uygulamasının c-Fos-pozitif vazopressin nöronlarının yüzdesini salin grubuna göre anlamlı olarak arttırdığı bulundu ($p=0,021$) (Şekil 34). Ayrıca, üridin ve UDP uygulamasıyla c-Fos-pozitif

vazopressin nöronlarının yüzdesinde salin grubuna göre artış gözlendi. Ancak istatistiksel olarak değerlendirildiğinde artışın anlamlı olmadığı bulundu (sırasıyla p=0,351, p=0,051) (Şekil 34).



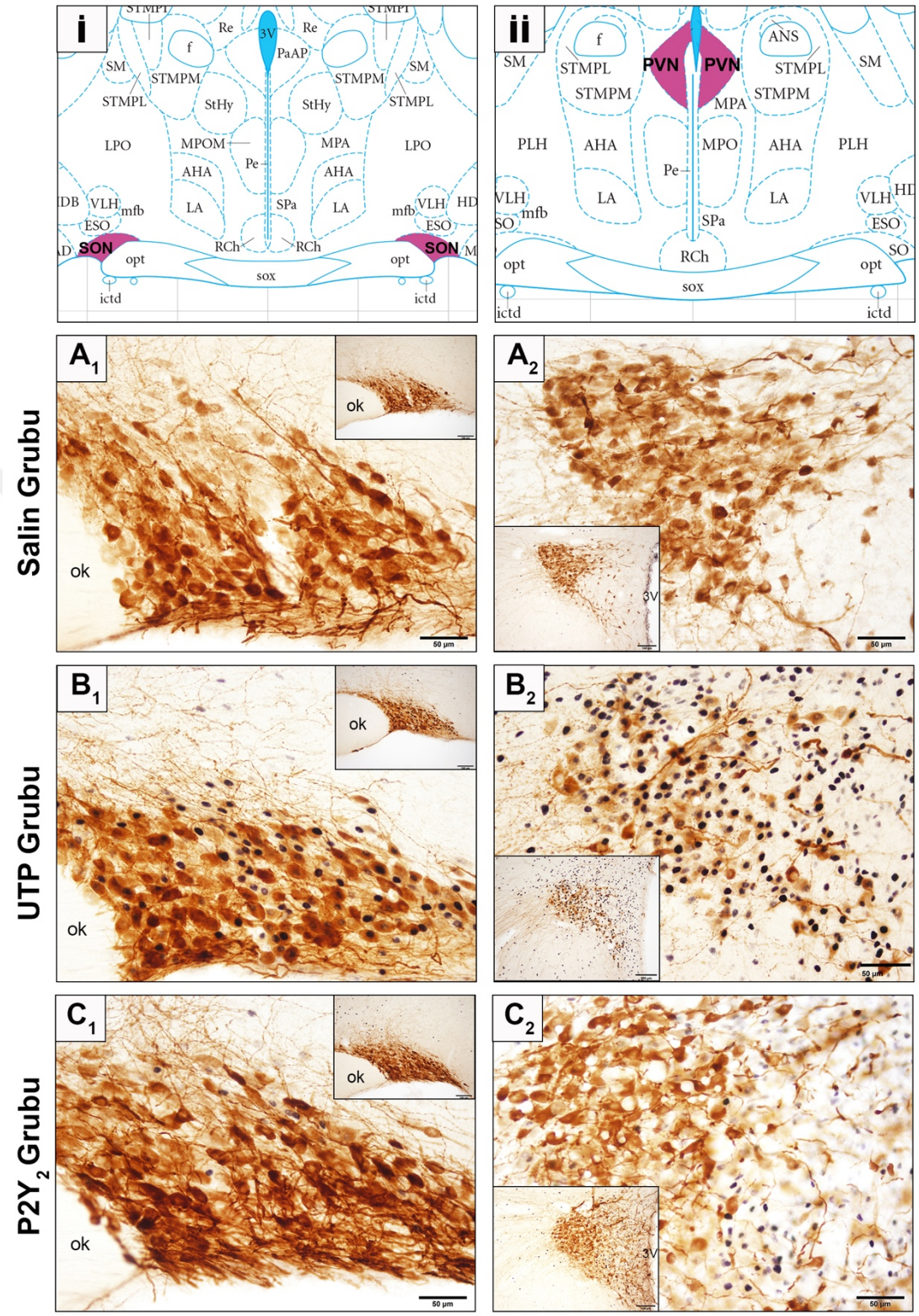
Şekil 34. Üridin, üridin nükleotidlerinin i.s.v. enjeksiyonu sonrası PVN'de e c-Fos-pozitif vazopressin nöron yüzdelerinin karşılaştırılması (*p<0,05; ***p<0,001).

4.4.3. $P2Y_2$ Reseptör Antagonisti AR-C 118925XX Ön-uygulamasının, Üridin Nükleotidi UTP'nin Supraoptik ve Paraventriküler Çekirdeklerde Vazopressin Nöronlarının Aktivasyonuna Etkisini Baskılamasının Araştırılması

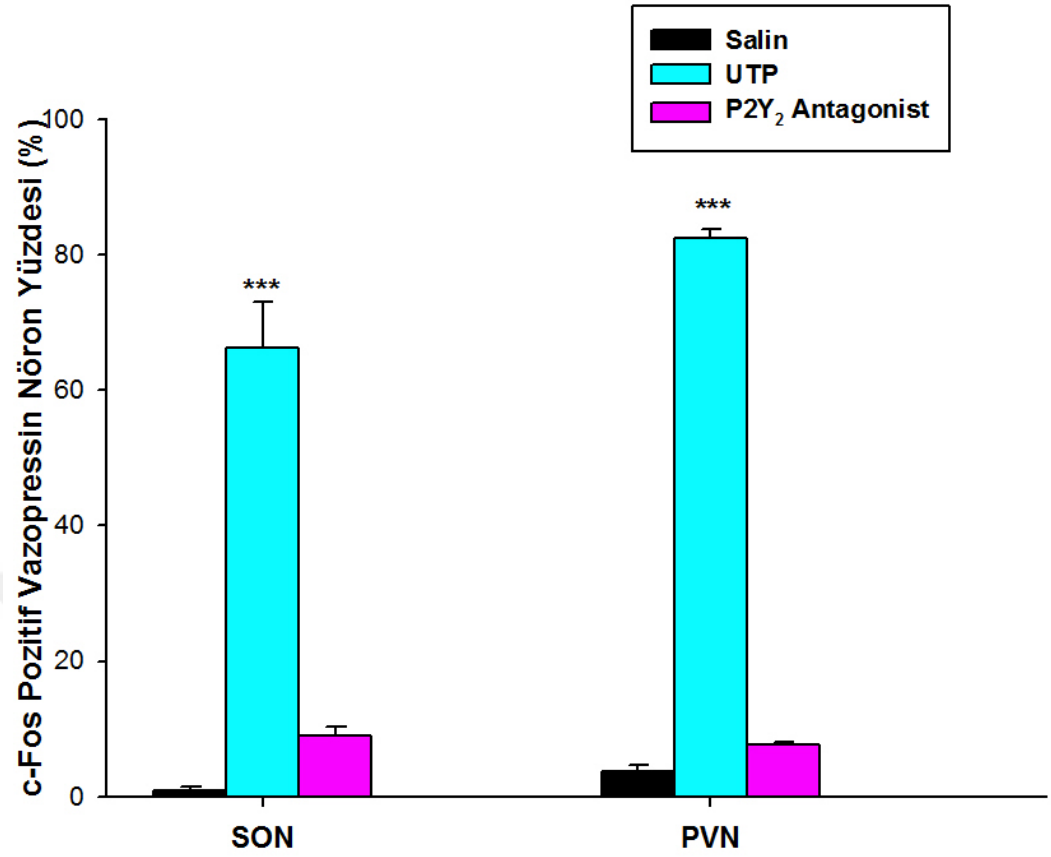
UTP uygulamasından 15 dakika önce lateral ventriküle enjekte edilen $P2Y_2$ reseptör antagonisti AR-C 118925XX'in SON ve PVN'de vazopressin nöronları üzerindeki etkisini incelemek amacıyla c-Fos proteini eksprese eden vazopessin nöronları ikili immünoperoksidaz yöntemi ile işaretlendi (Şekil 35). SON'de; UTP uygulanmasının, c-Fos-pozitif vazopressin nöronlarının yüzdesini (%65,25±6,84)

salin uygulanan grubuna göre (%0,94±0,42) anlamlı olarak arttırdığı bulundu ($p<0,001$). UTP enjeksiyonundan önce $P2Y_2$ reseptör antagonisti verilen grupta nöronal aktivasyonun anlamlı olarak baskılandığı görüldü (%8,98±1,24) ($p<0,001$) (Şekil 35, Şekil 36).

Benzer olarak PVN'de; UTP'nin, salin grubuna göre anlamlı olarak c-Fos pozitif vazopressin nöron sayısının arttırdığı ve bu artışın $P2Y_2$ reseptör antagonisti ile baskılandığı bulundu (Salin: 3,81±0,81, UTP: %82,37±1,51, Antagonist: %7,73±0,33, $p<0,001$). Her iki çekirdekte de, salin ve $P2Y_2$ reseptör antagonist grupları arasında aktive olan nöron yüzdesi açısından anlamlı fark olmadığı istatistiksel olarak gösterildi (SON:$p=0,336$, PVN:$p=0,060$) (Şekil 35, Şekil 36).



Şekil 35. $P2Y_2$ reseptör antagonisti (AR-C 118925XX) ve üridin nükleotidi UTP'nin, SON ve PVN'deki vazopressin nöronlarında c-Fos ekspresyonuna etkisi. Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre (**i**) SON, (**ii**) PVN'nin lokalizasyonu. (**A_1-A_2**) Salin grubu, (**B_1-B_2**) UTP grubu, (**C_1-C_2**) $P2Y_2$ antagonist grubu, 40X, 20X (küçük resimler). ok: Optik kiyazma, 3V: 3. ventrikül.

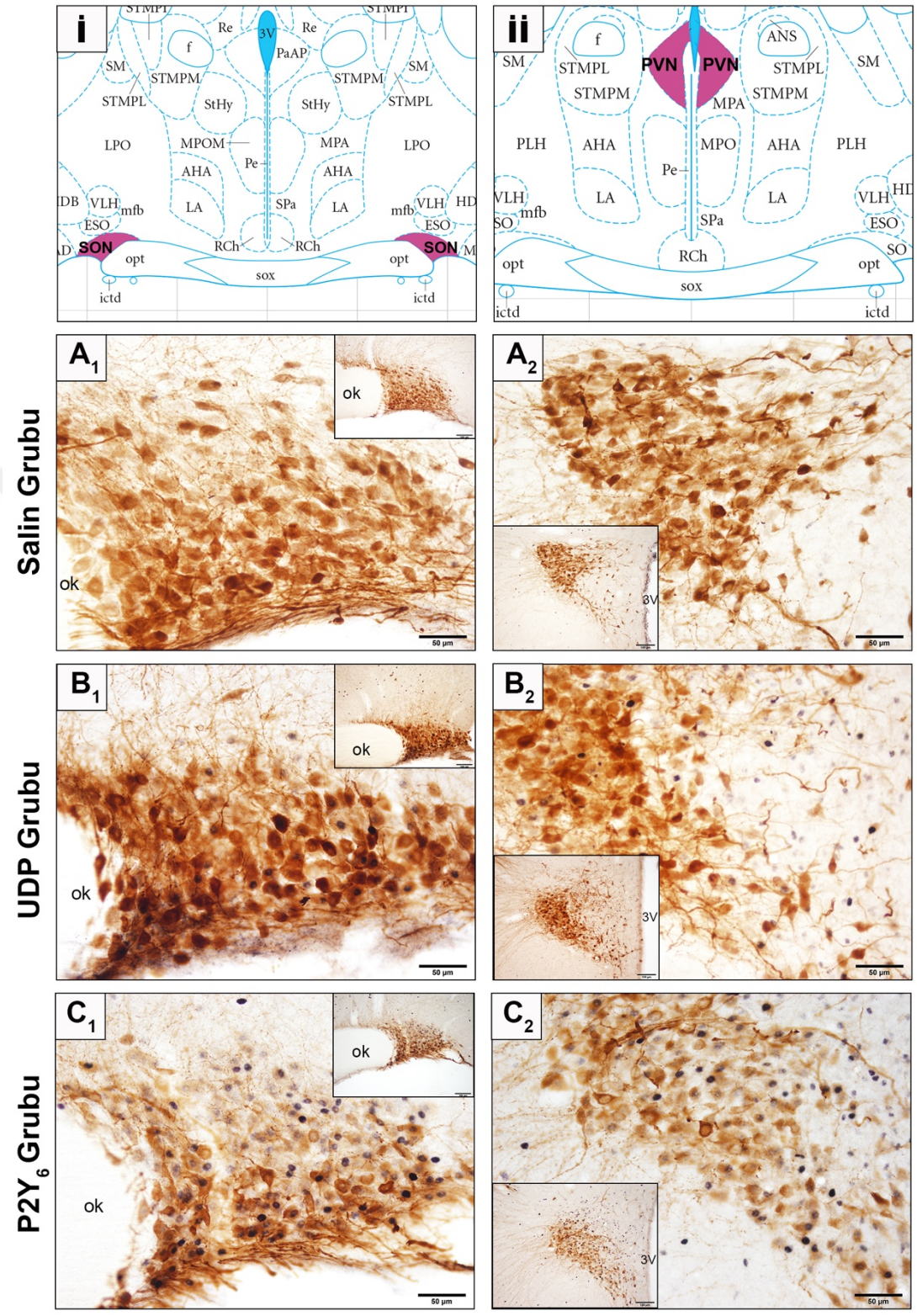


Şekil 36. $P2Y_2$ reseptör antagonisti (AR-C 118925XX) ve üridin nükleotidi UTP'nin i.s.v. enjeksiyonu sonrası SON ve PVN'de c-Fos-pozitif vazopressin nöron yüzdelerinin karşılaştırılması (***p<0,001).

4.4.4. $P2Y_6$ Reseptör Antagonisti MRS2578 Ön-uygulamasının, Üridin Nükleotidi UDP'nin Supraoptik ve Paraventriküler Çekirdeklerde Vazopressin Nöronları Aktivasyonuna Etkisini Baskılamasının Araştırılması

İntraserebroventriküler yolla uygulanan $P2Y_6$ reseptör antagonistinin ve UDP'nin, SON ve PVN'de yerleşik vazopressin nöronları üzerinde etkisini incelemek amacıyla kesitlerde ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi kullanılarak vazopressin ve c-Fos işaretlemeleri yapıldı (Şekil 37).

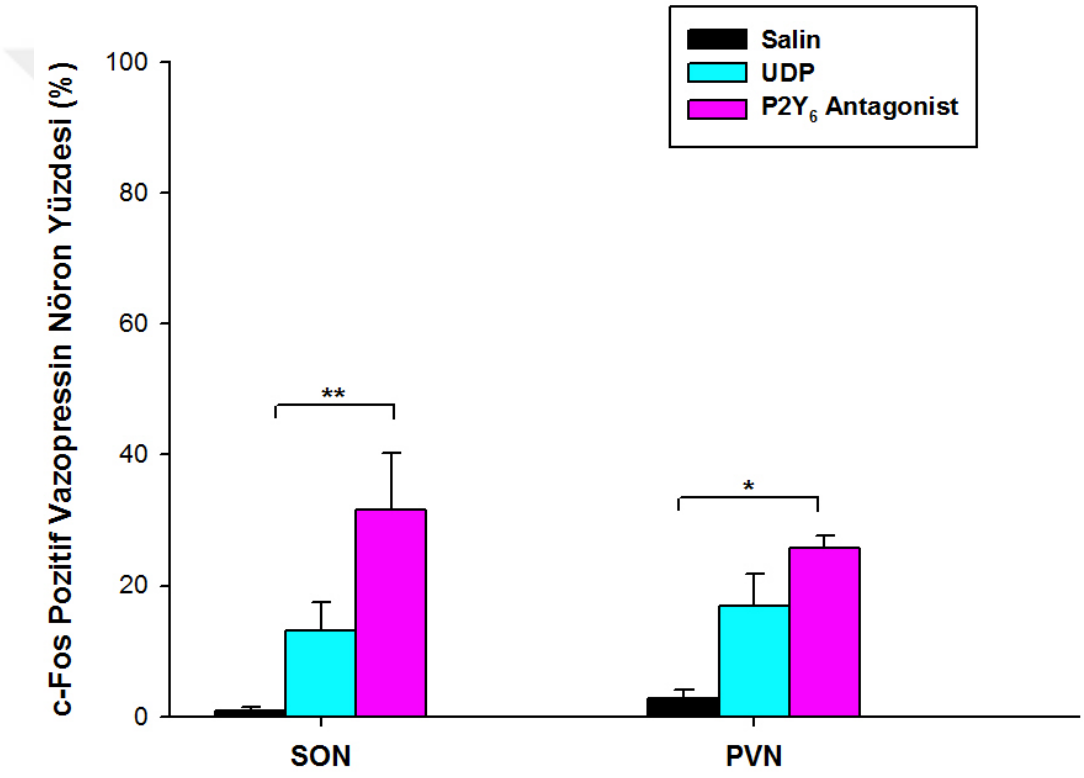
SON'de yerleşik vazopressin nöronları açısından UDP enjeksiyonundan önce $P2Y_6$ reseptör antagonistinin UDP grubuna göre baskılayıcı etkisinin yerine nöronal aktivasyonu arttırıcı etkisinin olduğu ancak; bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu (Salin: %0,94±0,42, UDP: %13,19±4,25, Antagonist: %31,50±8,74, p=0,082) (Şekil 37, Şekil 38).



Şekil 37. P2Y$_6$ reseptör antagonisti (MRS2578) ve üridin nükleotidi UDP'nin SON ve PVN'deki vazopressin nöronlarında c-Fos ekspresyonuna etkisi. Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre (**i**) SON, (**ii**) PVN'nin lokalizasyonu. (**A$_1$-A$_2$**) Salin grubu, (**B$_1$-B$_2$**) UDP grubu, (**C$_1$-C$_2$**) P2Y$_6$ antagonist grubu 40X, 20X (küçük resimler). ok: Optik kiyazma, 3V: 3. ventrikül.

Benzer olarak paraventriküler çekirdekte elde edilen sonuçlarda da UDP enjeksiyonundan önce MRS2578'nin, UDP'nin etkisini baskılamak yerine nöronal aktivasyonu arttırdığı ancak; bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu (Salin: %3,81±0,81, UDP: %16,87±4,88, Antagonist: %25,73±1,98; p=0,516) (Şekil 37, Şekil 38).

SON ve PVN'de UDP enjeksiyonundan önce $P2Y_6$ reseptör antagonistinin uygulanması salin grubuna göre vazopressin nöronlarında nöronal aktivasyona neden olduğu gösterildi (sırasıyla p=0,006; p=0,011) (Şekil 37, Şekil 38).

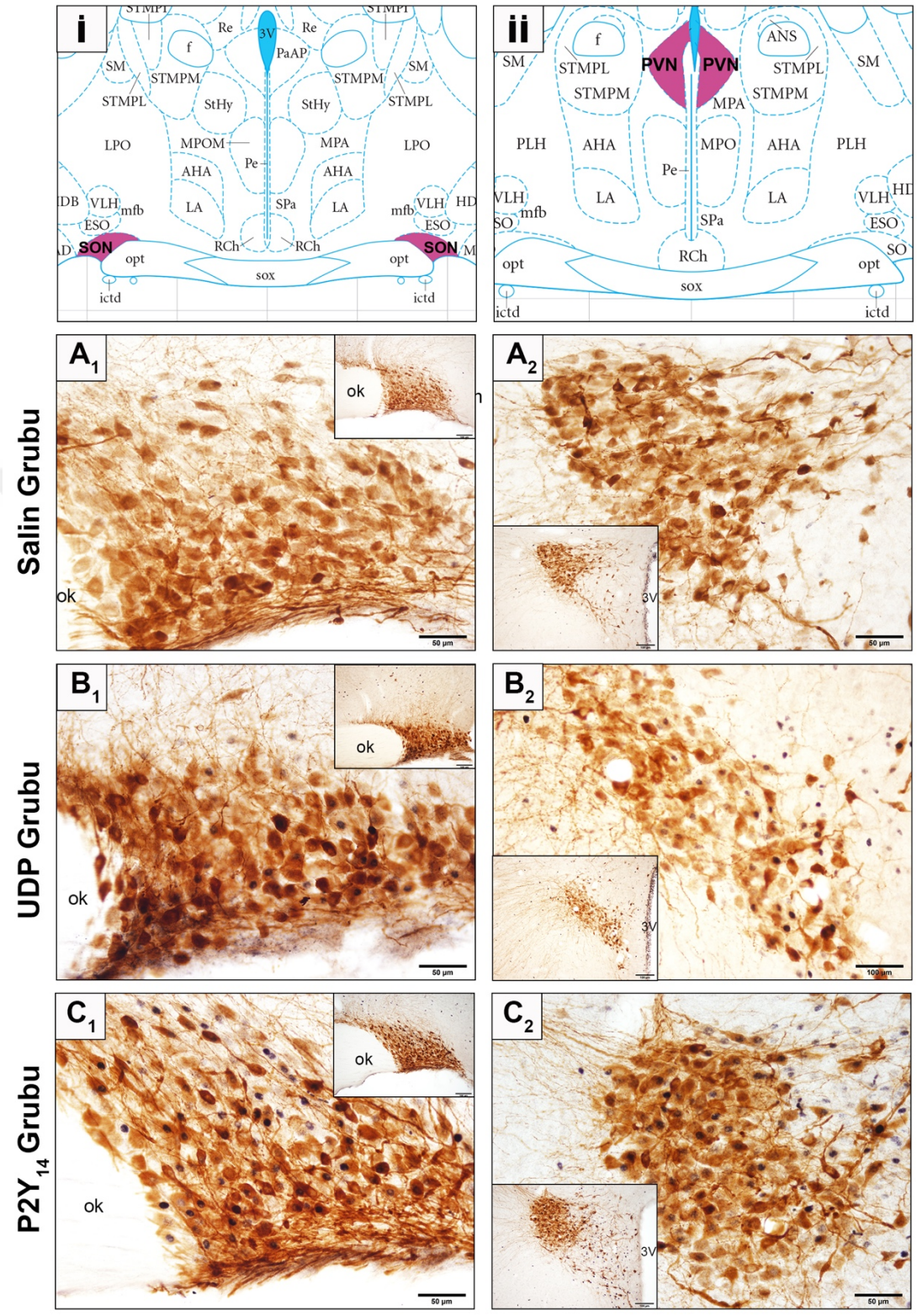


Şekil 38. $P2Y_6$ reseptör antagonisti (MRS2578) ve üridin nükleotidi UDP'nin i.s.v. enjeksiyonu sonrası SON ve PVN'deki c-Fos-pozitif vazopressin nöron yüzdelerinin karşılaştırılması (*p<0,05; **p<0,01).

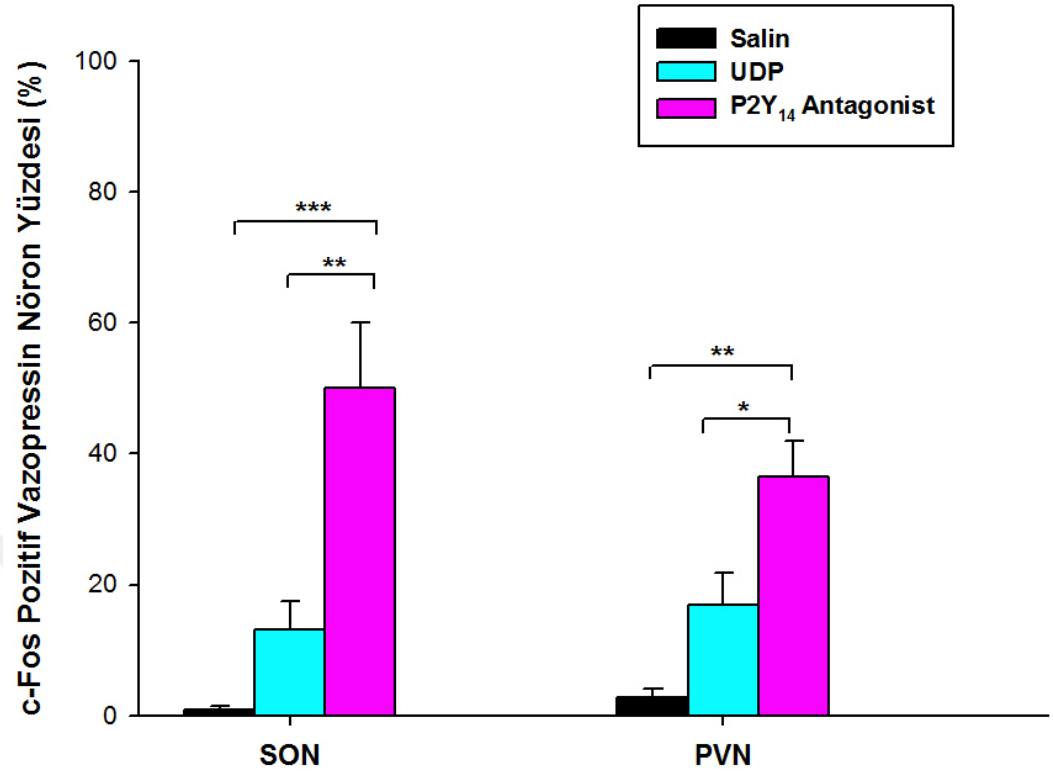
4.4.5. $P2Y_{14}$ Reseptör Antagonisti PPTN hidroklorür Ön-uygulamasının, Üridin Nükleotidi UDP'nin Supraoptik ve Paraventriküler Çekirdeklerde Vazopressin Nöronları Aktivasyonuna Etkisini Baskılamasının Araştırılması

$P2Y_{14}$ reseptör antagonisti PPTN hidroklorürün, SON ve PVN'de yerleşik vazopressin nöronları üzerinde etkisini incelemek amacıyla kesitlerde ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi kullanılarak vazopressin ve c-Fos işaretlemeleri yapıldı (Şekil 39).

Supraoptik çekirdekte yapılan sayımlar istatistiksel olarak UDP enjeksiyonu öncesi $P2Y_{14}$ reseptör antagonisti verilen deneklerde nöronal aktivasyonun, salin ve UDP grubuna göre anlamlı olarak arttırdığı tespit edildi (Antagonist: %49,99±10,11; Salin-$P2Y_{14}$ antagonist $p<0,001$; UDP-$P2Y_6$ antagonist $p=0,009$) (Şekil 39, Şekil 40). PVN'de yerleşik vazopressin nöronları içinde benzer sonuç elde edildi (Antagonist: %36,47±5,45; salin-$P2Y_{14}$ antagonist $p=0,002$; UDP-$P2Y_6$ antagonist $p=0,046$) (Şekil 39, Şekil 40).



Şekil 39. P2Y$_{14}$ reseptör antagonisti PPTN hidrokloürürün SON ve PVN'de lokalize vazopressin nöronlarında c-Fos ekspresyonuna etkisi. Paxinos ve Watson (2007) göre sıçan beyninde (**i**) SON, (**ii**) PVN'in lokalizasyonu (**A$_1$-A$_2$**) Salin grubu, (**B$_1$-B$_2$**) UDP grubu, (**C$_1$-C$_2$**) P2Y$_{14}$ antagonist grubu 40X, 20X (küçük resimler). ok: Optik kiyazma, 3V: 3. ventrikül.

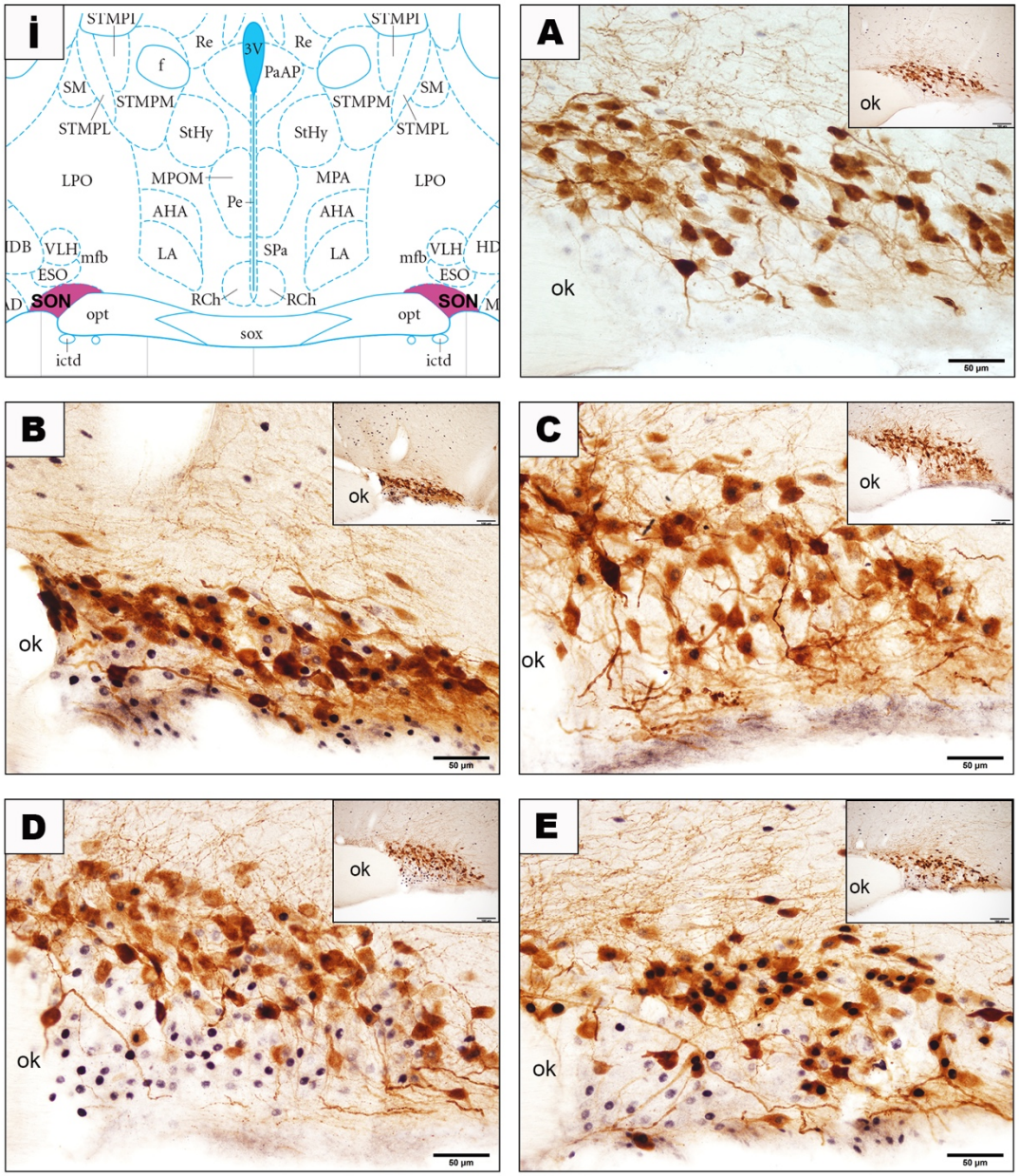


Şekil 40. $P2Y_{14}$ reseptör antagonisti (PPTN hidroklorür) ve üridin nükleotidi UDP'nin i.s.v. enjeksiyonu sonrası SON ve PVN'de c-Fos-pozitif vazopressin nöron yüzdelerinin karşılaştırılması (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

4.5. Üridin, Üridin Nükleotidleri ve Reseptör Antagonistlerinin Oksitosin Nöronlarına Etkisinin Araştırılması

4.5.1. Üridin, Üridin Nükleotidlerinin Supraoptik Çekirdekte Oksitosin Nöronlarının Aktivasyonuna Etkisinin Araştırılması

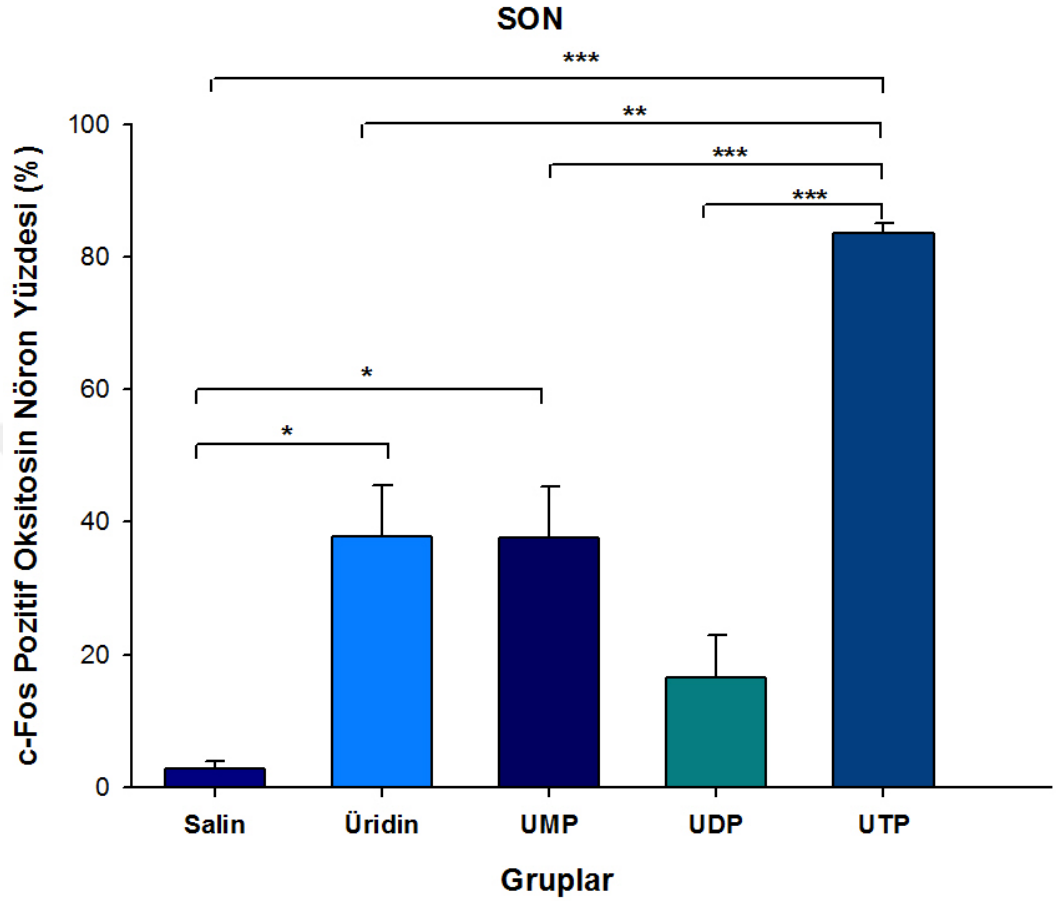
İntraserebroventriküler yolla uygulanan üridin, üridin nükleotidleri; UMP, UDP ve UTP'nin supraoptik çekirdekte yerleşik oksitosin nöronları üzerinde etkisini incelemek amacıyla kesitlerde ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi kullanılarak oksitosin ve c-Fos işaretlemeleri yapıldı (Şekil 41). Elde edilen sayımlar sonucunda SON'de c-Fos-pozitif oksitosin nöronlarının yüzdesi, salin grubunda %2,77±1,24; üridin grubunda %37,84±7,69; UMP grubunda %37,72±7,5; UDP grubunda %16,60±6,38 ve UTP grubunda %83,24±1,24 olarak bulundu (Şekil 41, Şekil 42).



Şekil 41. Üridin ve üridin nükleotidlerinin SON'de lokalize oksitosin nöronlarında c-Fos ekspresyonuna etkisi. (**i**) Paxinos ve Watson (2007) göre sıçan beyninde SON'nin lokalizasyonu. **(A)** Salin grubu, (**B**) Üridin grubu, (**C**) UMP grubu, (**D**) UDP grubu, (**E**)UTP grubu 40X, 20X (küçük resimler). ok: Optik kiyazma.

İstatistiksel analizler sonucunda; UTP grubunda c-Fos-pozitif oksitosin nöronlarının yüzdesinin, hem salin, UMP ve UDP gruplarından ($p<0,001$), hem de üridin grubundan ($p=0,002$) anlamlı olarak fazla olduğu bulundu (Şekil 42). Üridin ve UMP grupları salin grubu ile karşılaştırıldığında, üridin ve UMP'nin c-Fos-pozitif oksitosin nöronlarının yüzdelerini anlamlı olarak arttırdığı bulundu ($p=0,017$) (Şekil 42). Ayrıca; salin grubuna göre UDP uygulamasında görülen oksitosin nöron

aktivasyonundaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (p=0,684) (Şekil 42).

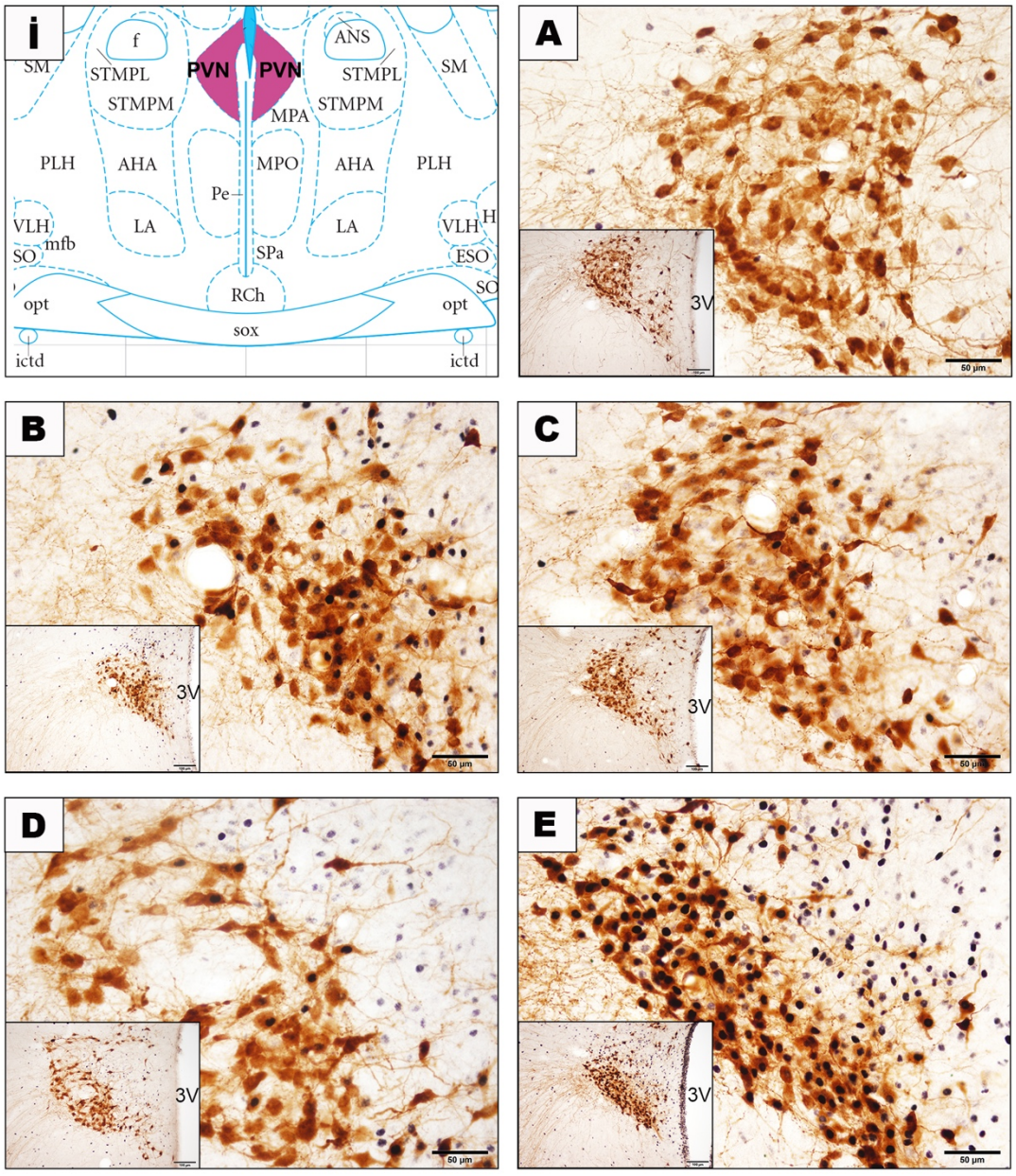


Şekil 42. Üridin ve üridin nükleotidlerinin i.s.v. enjeksiyonu sonrası SON'de yerleşik c-Fos-pozitif oksitosin nöron yüzdelerinin karşılaştırılması (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

4.5.2. Üridin ve Üridin Nükleotidlerinin Paraventriküler Çekirdekteki Oksitosin Nöronlarının Aktivasyonuna Etkisinin Araştırılması

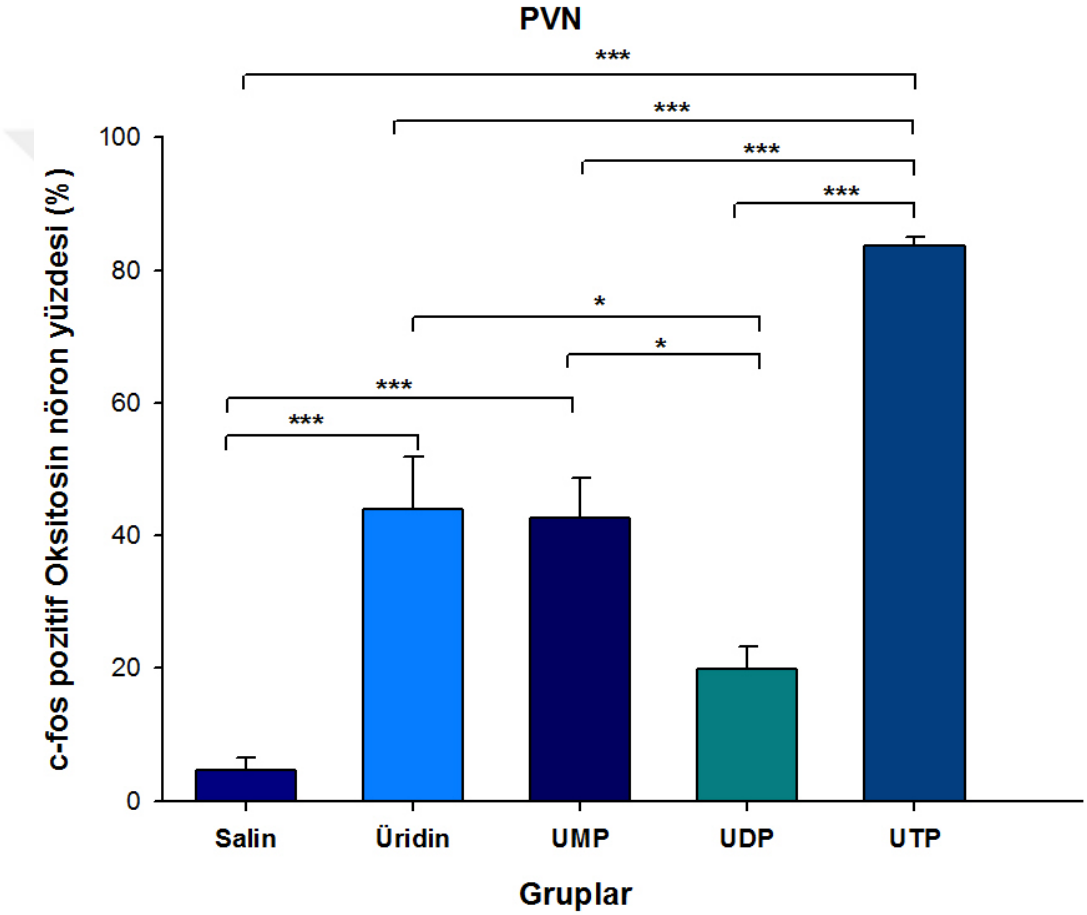
İntraserebroventriküler yolla uygulanan üridin ve üridin nükleotidleri; UMP, UDP ile UTP'nin paraventriküler çekirdekte yerleşik oksitosin nöronları üzerinde etkisini incelemek amacıyla kesitlerde ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi kullanılarak oksitosin ve c-Fos işaretlemeleri yapıldı (Şekil 43). Hücre sayımları sonucunda PVN'de c-Fos-pozitif oksitosin nöronlarının yüzdesi salin grubunda %4,60±1,99; üridin grubunda %43,96±7,90; UMP grubunda %42,62±6,11; UDP grubunda %19,90±3,40 ve UTP grubunda %83,63±1,43 olarak bulundu (Şekil 43, Şekil 44).

İstatistiksel analizler sonucunda; UTP grubunda c-Fos-pozitif oksitosin nöronlarının yüzdesinin, salin, üridin UMP ve UDP gruplarından anlamlı olarak fazla olduğu bulundu ($p<0,001$) (Şekil 44).



Şekil 43. Üridin ve üridin nükleotidleri gruplarında PVN'de lokalize oksitosin nöronlarında c-Fos ekspresyonunun gösterimi. (**i**) Paxinos ve Watson sıçan atlasına göre PVN'nin lokalizasyonu. **(A)** Salin grubu, (**B**) Üridin grubu, (**C**) UMP grubu, (**D**) UDP grubu, (**E**) UPT grubu 40X, 20X (küçük resimler). 3V: 3. Ventrikül

Üridin ve UMP grupları salin grubu ile karşılaştırıldığında, hem üridin ve hemde UMP'nin, c-Fos-pozitif oksitosin nöronlarının yüzdelerini anlamlı olarak arttırdığı bulundu ($p<0,001$) (Şekil 43, Şekil 44). Ayrıca; üridin ve UMP uygulamasıyla ortaya çıkan nöronal aktivasyondaki artışın, UDP grubuna göre de anlamlı olduğu görüldü (sırasıyla $p=0,017$; $p=0,026$). Salin grubuna göre UDP uygulamasında görülen oksitosin nöron aktivasyonundaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu ($p=0,209$) (Şekil 44).

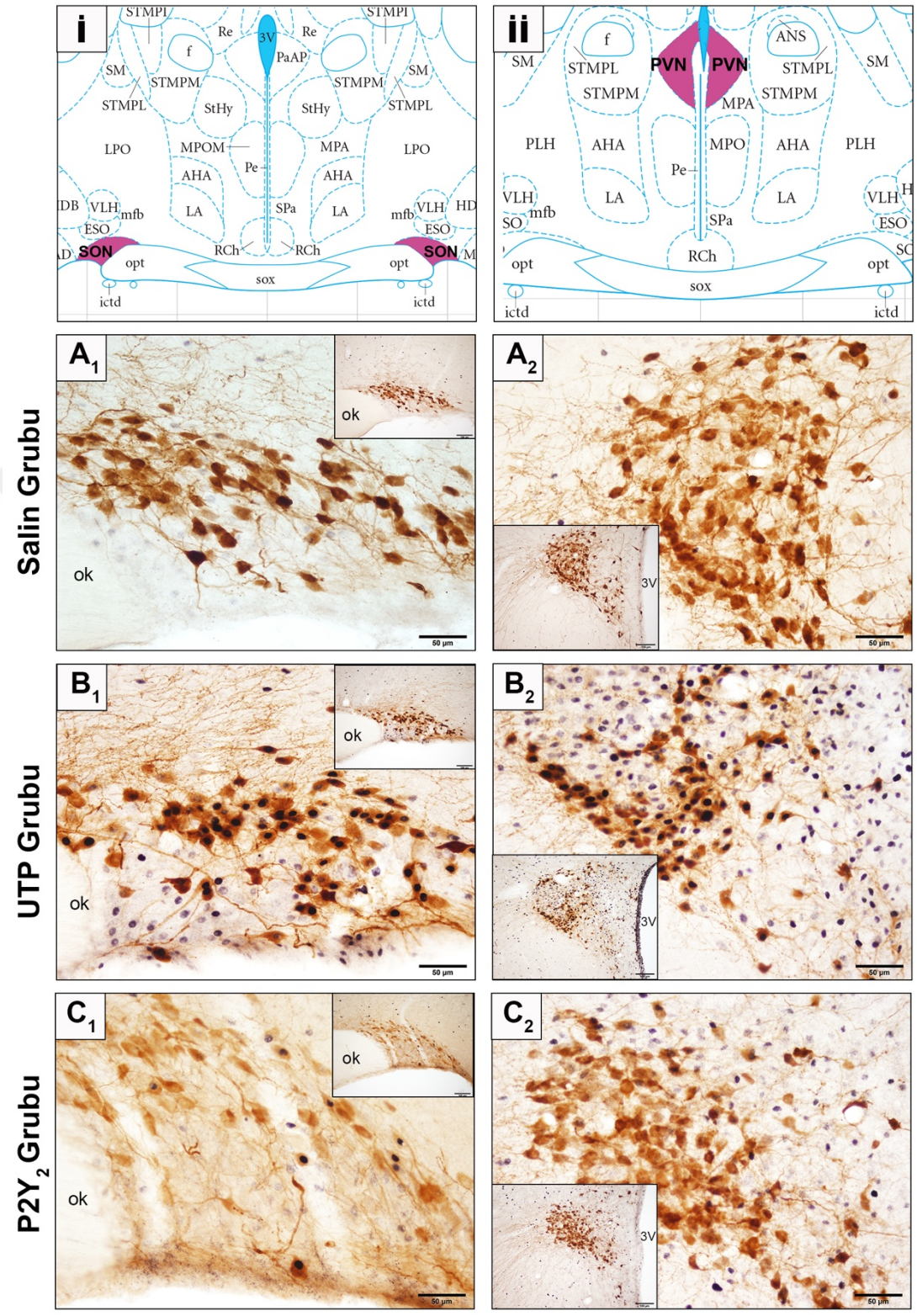


Şekil 44. Üridin ve üridin nükleotidlerinin i.s.v. enjeksiyonu sonrası PVN'de c-Fos-pozitif oksitosin nöron yüzdelerinin karşılaştırılması (*$p<0,05$; ***$p<0,001$).

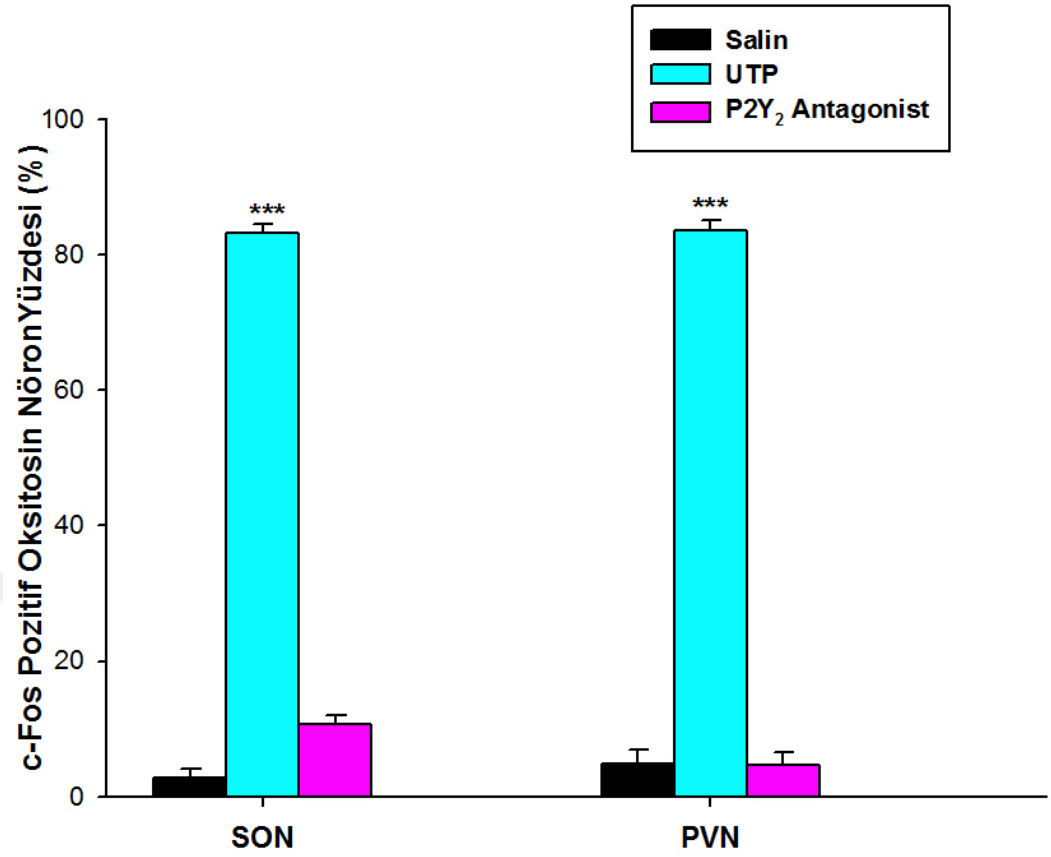
4.5.3. $P2Y_2$ Reseptör Antagonisti AR-C 118925XX Ön-uygulamasının, Üridin Nükleotidi UTP'nin Supraoptik ve Paraventriküler Çekirdeklerde Oksitosin Nöronları Aktivasyonuna Etkisini Baskılamasının Araştırılması

İntraserebroventriküler yolla uygulanan UTP enjeksiyonundan 15 dakika önce verilen $P2Y_2$ reseptör antagonistinin SON ve PVN çekirdekte yerleşik oksitosin

nöronları üzerinde etkisini incelemek amacıyla kesitlerde ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi kullanılarak vazopressin ve c-Fos işaretlemeleri yapıldı (Şekil 45). SON'de; UTP'nin, c-Fos pozitif oksitosin nöronlarının yüzdesini (%83,24±1,24) salin uygulanan grubuna göre (%2,77±1,24) anlamlı olarak arttırdığı ve UTP enjeksiyonundan önce $P2Y_2$ reseptör antagonisti verilen grupta nöronal aktivasyonun anlamlı olarak baskılandığı bulundu (%10,78±1,27) ($p<0,001$) (Şekil 45, Şekil 46). Benzer olarak PVN'de; UTP'nin salin grubuna göre anlamlı olarak c-Fos-pozitif oksitosin nöron sayısını arttırdığı ve bu aktivasyonun $P2Y_2$ reseptör antagonisti ile baskılandığı bulundu (Salin: %4,60±1,99; UTP: %83,63±1,43; Antagonist: %10,88±1,06; $p<0,001$). Her iki çekirdekte de salin ve $P2Y_2$ reseptör antagonist grupları arasında aktive olan nöron yüzdesi açısından anlamlı fark olmadığı istatistiksel olarak gösterildi (SON: $p=0,066$; PVN: $p=0,053$) (Şekil 45, Şekil 46).



Şekil 45. $P2Y_2$ reseptör antagonisti (AR-C 118925XX) ve üridin nükleotidi UTP'nin, SON ve PVN'de oksitosin nöronlarında c-Fos ekspresyonuna etkisi. Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre (**i**) SON, (**ii**) PVN'nin lokalizasyonu. (**A_1-A_2**) Salin grubu, (**B_1-B_2**) UTP grubu, (**C_1-C_2**) $P2Y_2$ antagonist grubu 40X, 20X (küçük resimler). ok: Optik kiyazma, 3V: 3. ventrikül.



Şekil 46. $P2Y_2$ reseptör antagonisti (AR-C 118925XX) ve üridin nükleotidi UTP'nin i.s.v. enjeksiyonu sonrası SON ve PVN'de c-Fos-pozitif oksitosin nöron yüzdelerinin karşılaştırılması (***p<0,001).

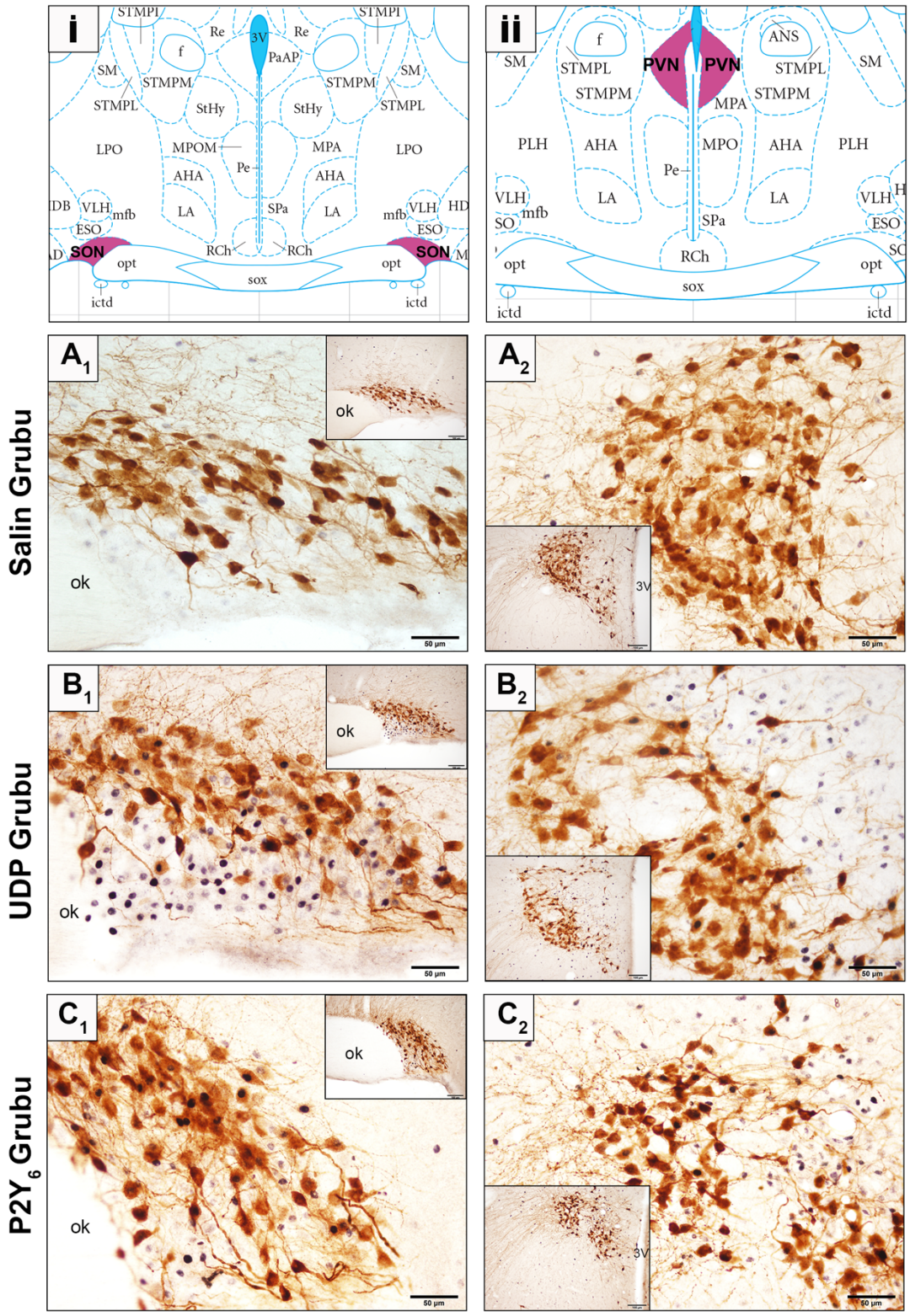
4.5.4. $P2Y_6$ Reseptör Antagositi MRS2578 Ön-uygulamasının, Üridin Nükleotidi UDP'nin Supraoptik ve Paraventriküler Çekirdeklerde Oksitosin Nöronları Aktivasyonuna Etkisini Baskılamasının Araştırılması

İntraserebroventriküler yolla uygulanan $P2Y_6$ reseptör antagonistinin ve UDP'nin SON ve PVN çekirdekte yerleşik oksitosin nöronları üzerinde etkisini incelemek amacıyla ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi kullanılarak kesitlerde oksitosin ve c-Fos işaretlemeleri yapıldı (Şekil 47).

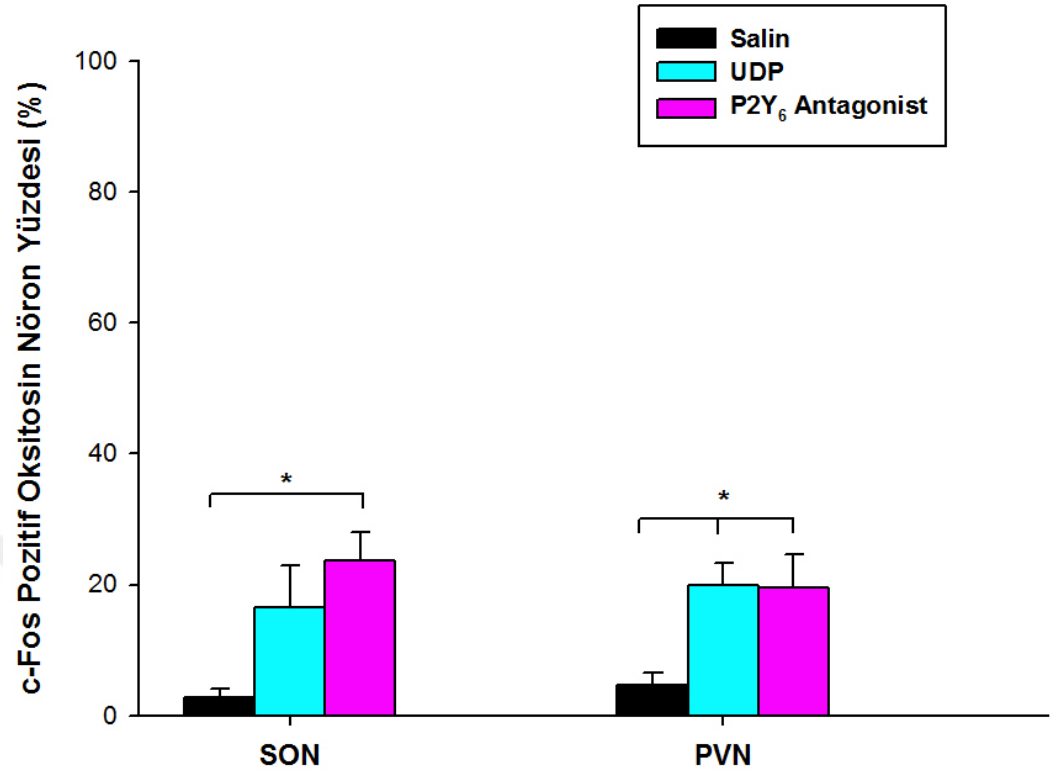
SON'de yerleşik oksitosin nöronları açısından UDP enjeksiyonundan önce $P2Y_6$ reseptör antagonistinin UDP grubuna göre baskılayıcı etkisinin yerine nöronal aktivasyonu arttırıcı etkisinin olduğu ancak; bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu (Salin: %2,77±1,24; UDP: %16,60±6,38; Antagonist: %23,76±4,24; p=0,663). Benzer olarak paraventriküler çekirdekte elde edilen sonuçlarda da UDP enjeksiyonundan önce $P2Y_{14}$ reseptör antagonistinin UDP

grubuna göre baskılayıcı etkisi görülmedi (Salin: %4,60±1,99; UDP: %19,90±3,40; Antagonist: %19,46±5,08; p=0,996) (Şekil 47, Şekil 48).

SON ve PVN'de UDP enjeksiyonundan önce $P2Y_6$ reseptör antagonistinin uygulanması salin grubuna göre oksitosin nöronlarında nöronal aktivasyona neden olduğu gösterildi (sırasıyla p=0,044; p=0,034) (Şekil 47, Şekil 48).



Şekil 47. $P2Y_6$ reseptör antagositi (MRS2578) ve üridin nükleotidi UDP'nin SON ve PVN'de oksitosin nöronlarında c-Fos ekspresyonuna etkisi. Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre (**i**) SON, (**İİ**) PVN'nin lokalizasyonu. (**A_1-A_2**) Salin grubu, (**B_1-B_2**) UDP grubu, (**C_1-C_2**) $P2Y_6$ antagonist grubu 40X, 20X (küçük resimler). ok: Optik kiyazma, 3V: 3. ventrikül.

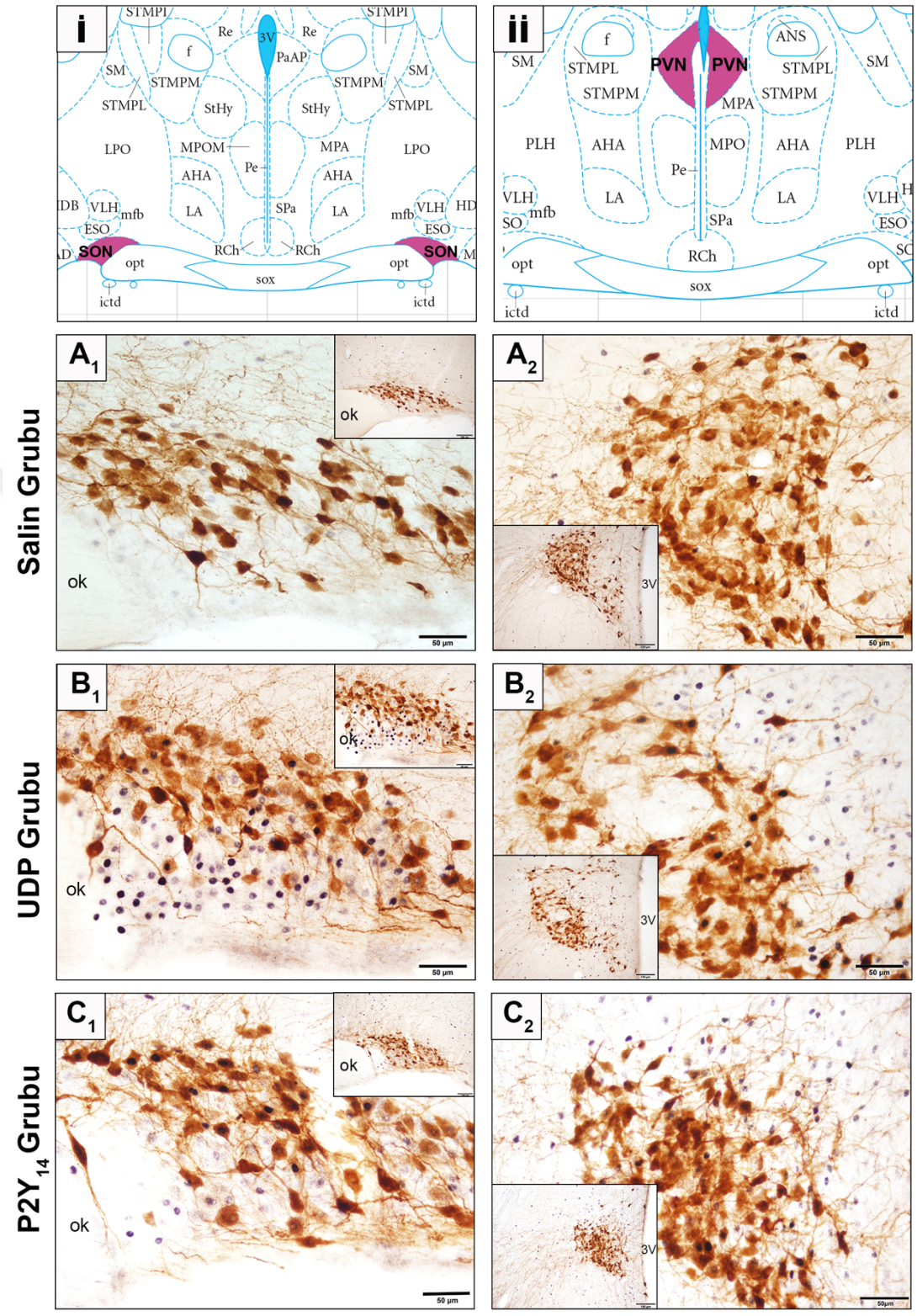


Şekil 48. $P2Y_6$ reseptör antagonisti (MRS2578) ve üridin nükleotidi UDP'nin i.s.v. enjeksiyonu sonrası SON ve PVN'de c-Fos pozitif oksitosin nöron yüzdelerinin karşılaştırılması (*p<0,05).

4.5.5. $P2Y_{14}$ Reseptör Antagonisti PPTN hidroklorür Ön-uygulamasının, Üridin Nükleotidi UDP'nin Supraoptik ve Paraventriküler Çekirdeklerde Oksitosin Nöronları Aktivasyonuna Etkisini Baskılamasının Araştırılması

İntraserebroventriküler yolla uygulanan $P2Y_{14}$ reseptör antagonistinin ve UDP'nin SON ve PVN'de yerleşik oksitosin nöronları üzerinde etkisini incelemek amacıyla kesitlerde ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi kullanılarak oksitosin ve c-Fos işaretlemeleri yapıldı (Şekil 49).

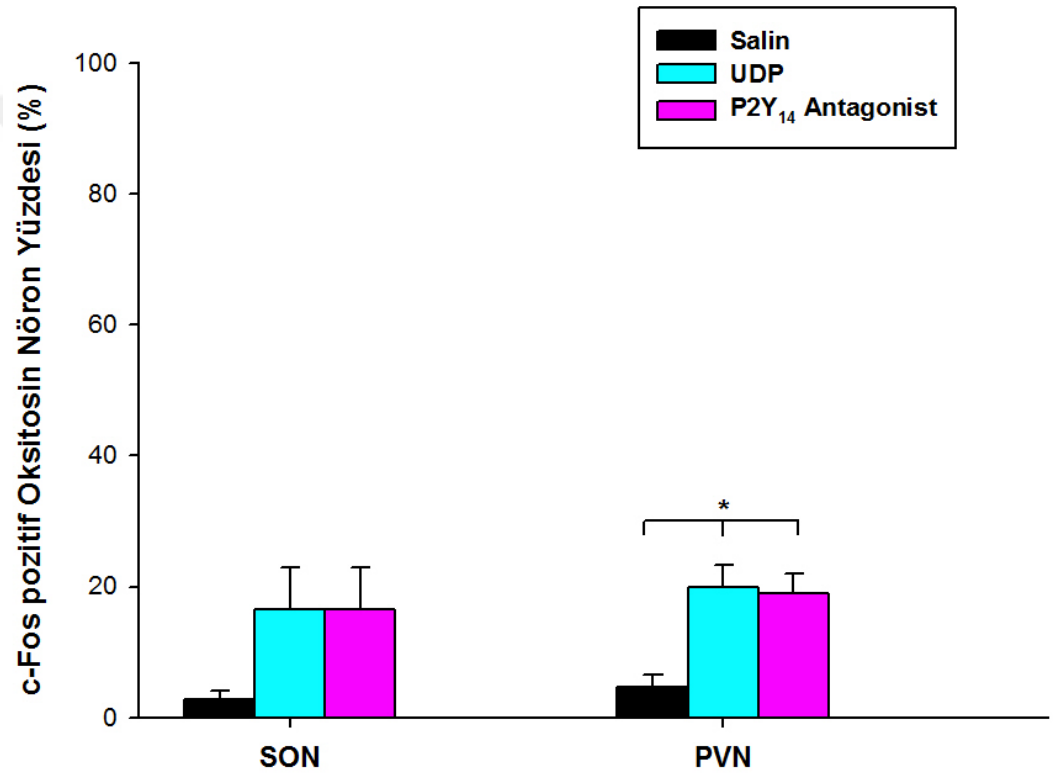
SON'de yerleşik oksitosin nöronları açısından UDP enjeksiyonundan önce $P2Y_{14}$ reseptör antagonistinin uygulunmasının, UDP grubuna göre nöronal aktivasyonu değiştirmediği bulundu (Salin: %2,77±1,24; UDP: %16,60±6,38; Antagonist: %16,05±3,81; p=0,997).



Şekil 49. $P2Y_{14}$ reseptör antagonisti (PPTN hidroklorür) ve üridin nükleotidi UDP'nin SON ve PVN'de oksitosin nöronlarında c-Fos ekspresyonuna etkisi. Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre (**i**) SON, (**İi**) PVN'nin lokalizasyonu (**A_1-A_2**) Salin grubu, (**B_1-B_2**) UDP grubu, (**C_1-C_2**) $P2Y_6$ antagonist grubu 40X, 20X (küçük resimler). ok: Optik kiyazma, 3V: 3. ventrikül.

Benzer olarak paraventriküler çekirdekte de $P2Y_{14}$ reseptör antagonistinin UDP grubuna göre nöronal aktivasyonu değiştirmediği bulundu (UDP: %19,90±3,40; Salin: %4,60±1,99; Antagonist: %19,01±2,99; p=0,978) (Şekil 49, Şekil 50).

PVN'de UDP enjeksiyonundan önce $P2Y_{14}$ reseptör antagonistinin uygulanması salin grubuna göre oksitosin nöronlarında nöronal aktivasyona neden olduğu bulundu (p=0,021) (Şekil 50).



Şekil 50. $P2Y_{14}$ reseptör antagonisti (PPTN hidroklorür) ve üridin nükleotidi UDP'nin i.s.v. enjeksiyonu sonrası SON ve PVN'de c-Fos-pozitif oksitosin nöron yüzdelerinin karşılaştırılması (*p<0,05).

Yukarıda sonuçları verilen deney gruplara ait istatistiksel değerlendirmelerde kullanılan tüm nöron sayımları ve yüzde değerleri aşağıdaki tablolarda verildi.

Tablo 14. Deney gruplarının SON, PVN ve PeV bölgelerinde c-Fos eksprese eden nesfatin-1 nöronlarınının ortalama sayı ve yüzde değerleri (ortalama±standart hata).

Deney Grupları	Hipotalamik Çekirdek	Nesfatin -1 Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos Eksprese Eden Nesfatin-1 Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos Eksprese Eden Nesfatin-1 Nöronlarının Ortalama Yüzdeleri
Salin grubu	**SON**	1271,00±104,65	9,60±3,55	0,69±0,23
	PVN	854,20±54,10	32,00±7,71	3,81±0,89
	PeV	800,80±55,46	31,00±12,21	4,05±1,64
Üridin grubu	**SON**	1255,80±168,49	366,40±104,92	29,43±6,62
	PVN	900,40±88,48	197,80±41,08	24,43±6,34
	PeV	855,40±19,53	221,30±40,60	26,01±5,04
UMP grubu	**SON**	1352,80±93,06	371,20±92,20	27,38±6,65
	PVN	930,00±109,07	290,80±44,91	31,68±3,27
	PeV	612,80±66,92	199,00±39İ41	31,96±3,88
UDP grubu	**SON**	1380,40±150,72	136,20±77,90	9,24±4,63
	PVN	931,40±62,97	128,40±39,93	13,71±4,41
	PeV	812,60±43,61	114,60±28,55	14,48±3,83
UTP grubu	**SON**	1271,00±82,33	667,80±33,72	53,99±4,06
	PVN	840,40±175,81	527,20±133,49	61,40±2,71
	PeV	827,00±43,61	314,00±33,93	37,85±3,07
$P2Y_2$ antagonist grubu	**SON**	1439,20±78,82	64,20±10,69	4,41±0,65
	PVN	1008,00±92,39	87,00±15,94	8,31±1,06
	PeV	847,80±69,20	58,40±8,09	7,22±0,75
$P2Y_6$ antagonist grubu	**SON**	1289,33±67,53	585,00±72,56	46,17±7,66
	PVN	683,33±37,23	329,33±72,30	49,56±8,74
	PeV	869,00±55,77	205,66±17,13	24,10±3,60
$P2Y_{14}$ antagonist grubu	**SON**	1410,66±78,35	542,33±130,13	37,80±7,08
	PVN	956,00±142,43	257,00±88,07	29,08±8,84
	PeV	880,66±85,54	180,66±29,07	21,19±7,67

Tablo 15. Deney gruplarının SON ve PVN bölgelerinde c-Fos-eksprese eden vazopressin nöronlarınının ortalama sayı ve yüzde değerleri (ortalama±standart hata).

Deney Grupları	Hipotalamik Çekirdek	Vazopressin Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos Eksprese Eden Vazopressin Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos Eksprese Eden Vazopressin Nöronlarının Ortalama Yüzdeleri
Salin grubu	**SON**	815,80±65,51	8,80±4,55	0,94±0,42
	PVN	758,80±32,85	28,80±8,87	3,81±0,81
Üridin grubu	**SON**	899,00±143,61	42,40±18,92	4,76±1,22
	PVN	617,80±55,29	73,60±16,59	12,50±3,28
UMP grubu	**SON**	906,00±47,79	283,00±61,89	29,46±7,03
	PVN	715,00±61,76	145,40±24,11	20,26±3,08
UDP grubu	**SON**	915,60±59,46	127,60±24,82	13,19±4,25
	PVN	753,60±28,17	130,20±38,59	16,87±4,88
UTP grubu	**SON**	772,20±108,48	524,20±104,06	65,25±6,84
	PVN	649,20±56,06	546,80±63,05	82,37±1,51
$P2Y_2$ antagonist grubu	**SON**	854,40±62,46	77,20±13,23	8,98±1,24
	PVN	782,80±91,57	60,20±11,44	7,73±0,33
P2Y6 antagonist grubu	**SON**	741,33±110,31	222,66±53,17	31,50±8,74
	PVN	537,00±24,97	138,66±15,19	25,73±1,98
P2Y14 antagonist grubu	**SON**	762,33±80,26	391,00±147,21	49,99±10,11
	PVN	750,33±102,53	280,33±69,95	36,47±5,45

Tablo 16. Deney gruplarının SON ve PVN bölgelerinde c-Fos eksprese eden oksitosin nöronlarınının ortalama sayı ve yüzde değerleri (ortalama±standart hata).

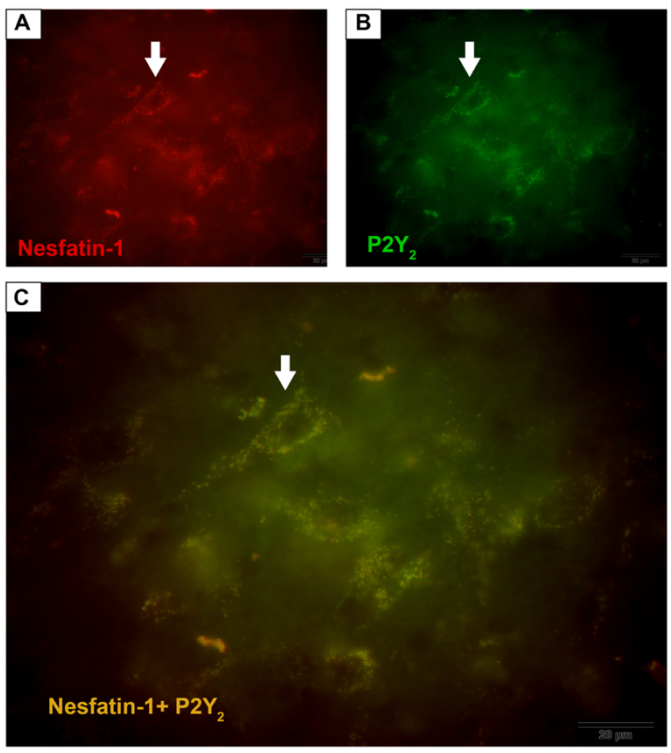
Deney Grupları	Hipotalamik Çekirdek	Oksitosin Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos Eksprese Eden Oksitosin Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos Eksprese Eden Oksitosin Nöronlarının Ortalama Yüzdeleri
Salin grubu	**SON**	601,40±18	16,64±5,51	2,77±1,24
	PVN	668,20±47,66	29,60±12,41	4,60±1,99
Üridin grubu	**SON**	691,60±34,86	258,00±49,88	37,84±7,69
	PVN	669,80±31,07	296,60±54,69	43,96±7,90
UMP grubu	**SON**	652,20±27,35	249,80±74,85	37,72±7,52
	PVN	543,20±20,74	229,80±30,26	42,62±6,11
UDP grubu	**SON**	587,80±46,88	99,60±40,47	16,60±6,38
	PVN	642,40±33,62	130,40±24,65	19,90±3,40
UTP grubu	**SON**	672,80±46,30	557,00±37,03	83,24±1,24
	PVN	612,40±63,15	509,20±46,17	83,63±1,24
$P2Y_2$ antagonist grubu	**SON**	610,80±43,19	66,45±3,93	10,78±1,27
	PVN	580,40±35,74	59,20±5,46	10,88±1,06
P2Y6 antagonist grubu	**SON**	475,33±47,27	110,00±48,74	23,76±4,24
	PVN	515,00±62,44	99,33±36,43	19,46±5,08
P2Y14 antagonist grubu	**SON**	503,66±61,93	76,66±9,38	16,05±3,81
	PVN	530,00±30,36	102,33±21,12	19,01±2,99

Özgün hedef 3 kapsamında planlanan deneylerden elde edilen bulgular, her bir peptiderjik nöron grubu (sırasıyla nesfatin-1 nöronları, vazopressin nöronları ve oksitosin nöronları) için oluşturulan başlıklar altında aşağıda birlikte verilecektir.

4.6. Nesfatin-1, Vazopressin ve Oksitosin Nöronlarında $P2Y_2$ Reseptör Ekspresyonunun Araştırılması

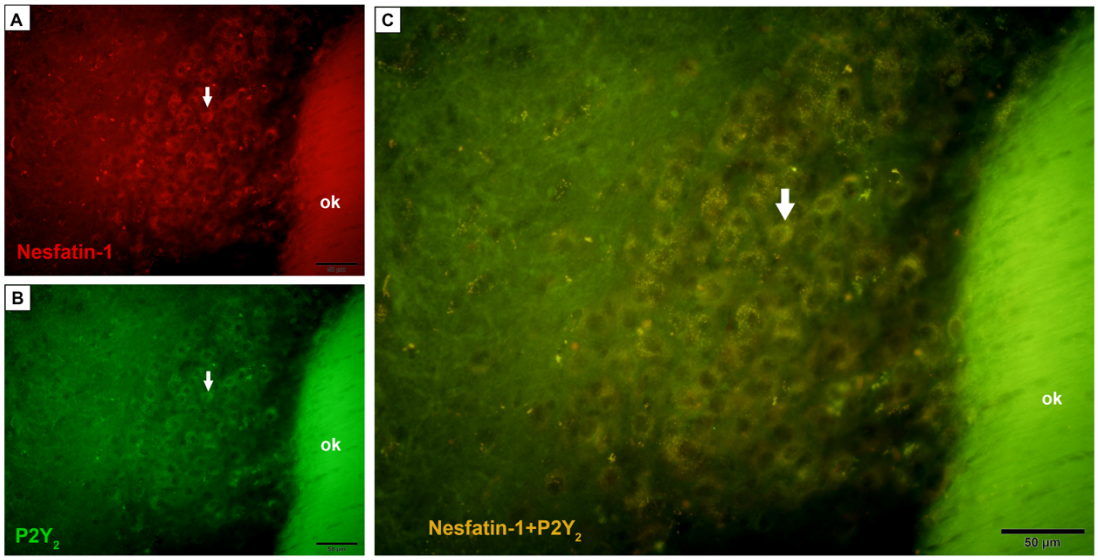
4.6.1. Nesfatin-1 Nöronlarında $P2Y_2$ Reseptör Ekspresyonunun Araştırılması

İkili immünofloresan işaretleme tekniği ile nesfatin-1 nöronlarının UTP'nin reseptörü, $P2Y_2$ reseptör proteinini eksprese ettiği gösterildi (Şekil 51).

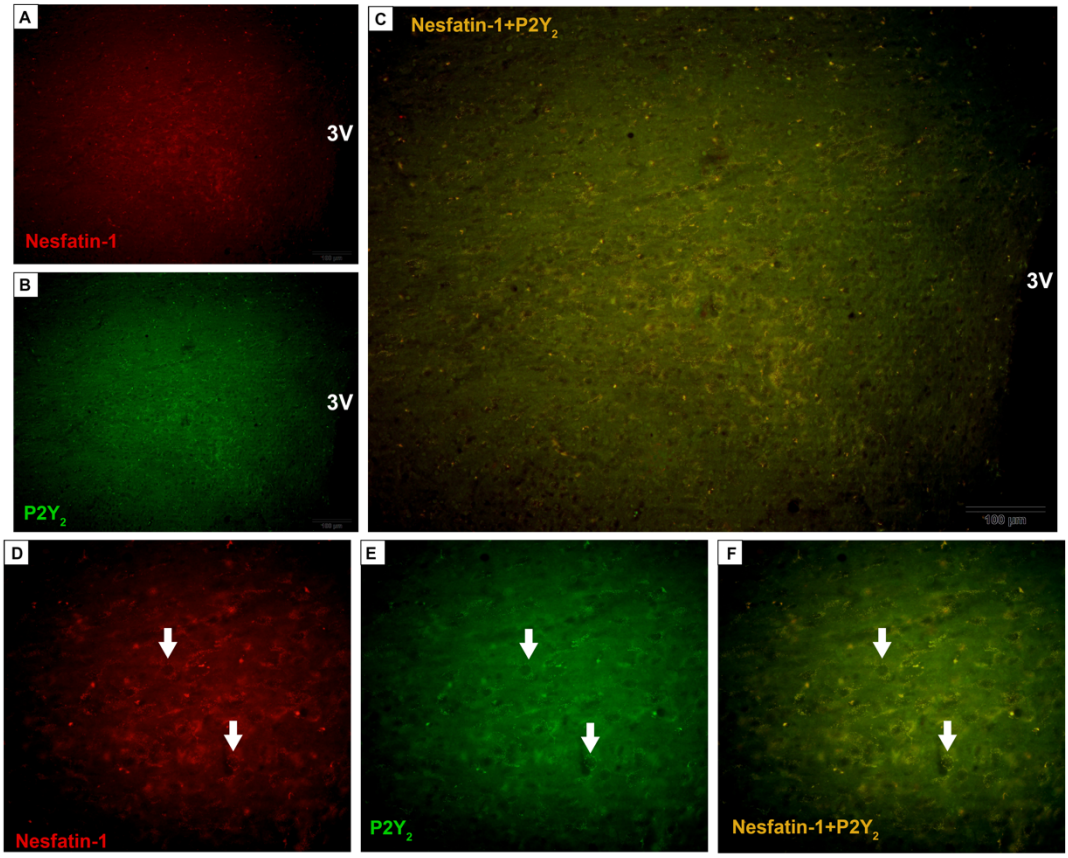


Şekil 51. Nesfatin-1 nöronlarında $P2Y_2$ ekspresyonu 100X. (**A**) Alexa flour 594 ile işaretli nesfatin-1 nöronları kırmızı, (**B**) FITC ile işaretli $P2Y_2$ eksprese eden nöronlar ise yeşil renkte görülmektedir. (**C**) $P2Y_2$ reseptör proteinini eksprese eden nesfatin nöronları sarı renkte izlenmektedir.

Supraoptik çekirdek ve paraventriküler çekirdekte UTP'nin aktive ettiği $P2Y_2$ reseptörü için geliştirilen antikor ile yapılan boyamalar, tüm nesfatin-1 nöronlarında bu proteinin eksprese edildiğini gösterdi (Şekil 52 ve 53).



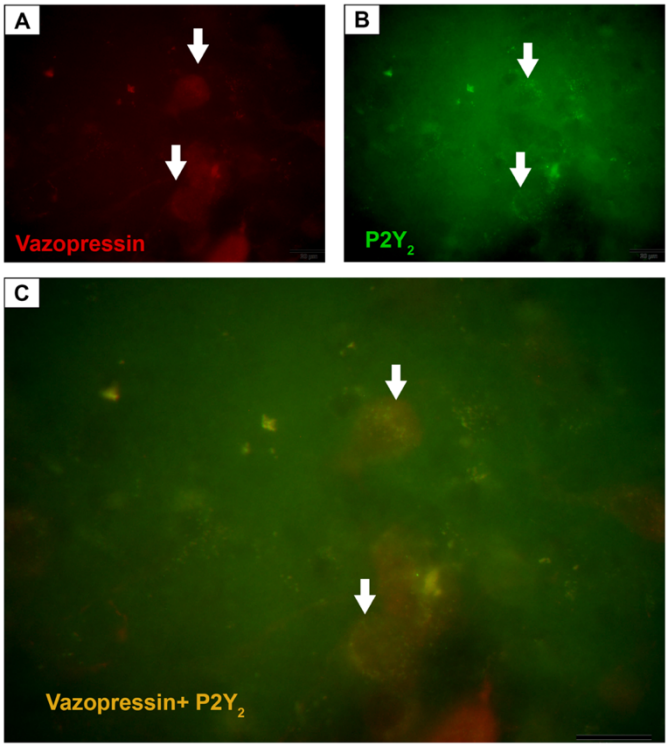
Şekil 52. SON'de yerleşik nesfatin-1 nöronlarında $P2Y_2$ ekspresyonu 40X. (**A**) Alexa flour 594 ile işaretli nesfatin-1 nöronları kırmızı, (**B**) FITC ile işaretli $P2Y_2$ eksprese eden nöronlar ise yeşil renkte görülmektedir. (**C**) $P2Y_2$ reseptör proteinini eksprese eden nesfatin nöronları sarı renkte izlenmektedir. ok:Optik kiyazma



Şekil 53. PVN'de yerleşik nesfatin-1 nöronlarında $P2Y_2$ ekspresyonu. Alexa flour 594 ile işaretli nesfatin-1 nöronları kırmızı renkte (**A**-20X, **D**-40X), FITC ile işaretli $P2Y_2$ eksprese eden nöronlar ise yeşil renkte (**B**-20X, **E**-40X), $P2Y_2$ reseptör proteinini eksprese eden nesfatin nöronları sarı renkte izlenmektedir (**C**-20X, **F**-40X). 3V: 3. ventrikül

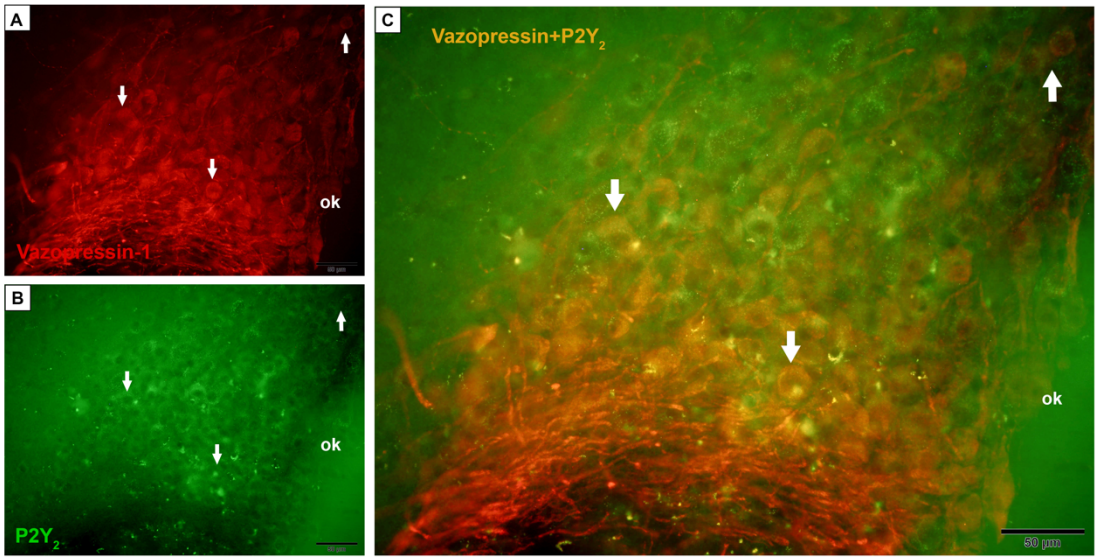
4.6.2. Vazopressin Nöronlarında $P2Y_2$ Reseptör Ekspresyonunun Araştırılması

İkili immünofloresan boyama ile vazopressin nöronlarının UTP'nin reseptörü, $P2Y_2$ proteini için geliştirilen antikor ile işaretlendiği görüldü (Şekil 54).

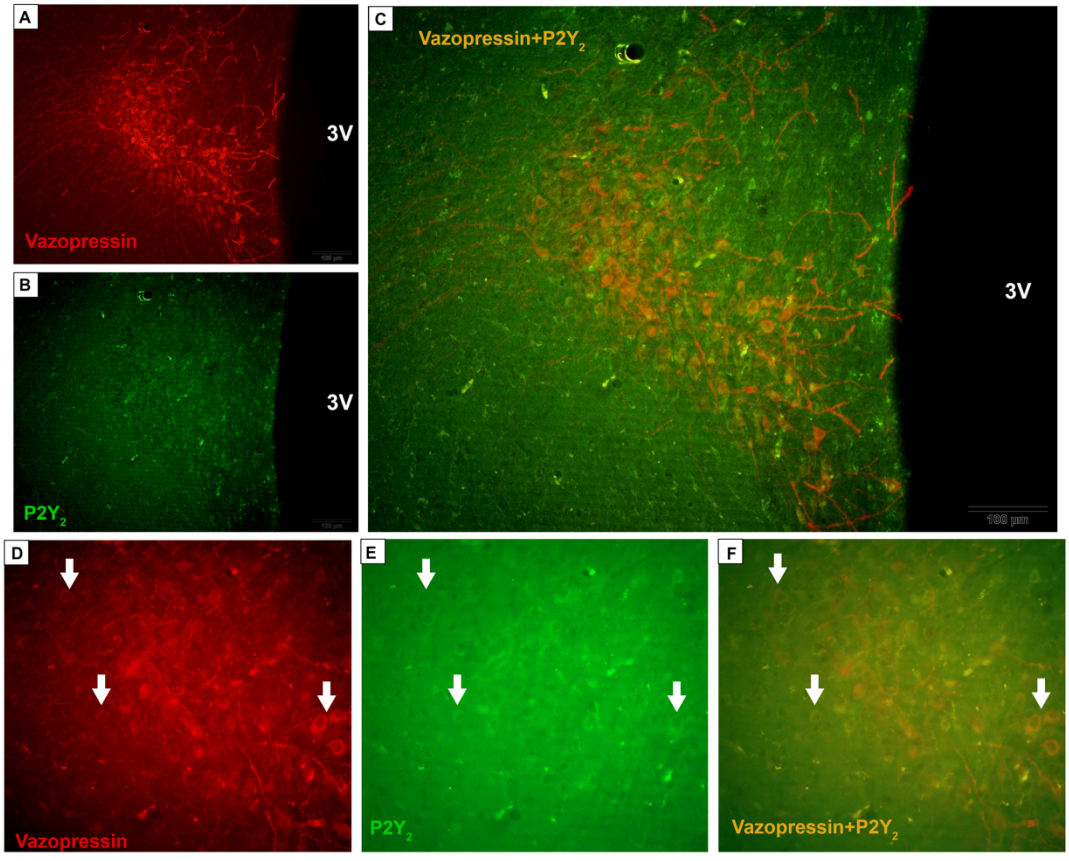


Şekil 54. Vazopressin nöronlarında $P2Y_2$ ekspresyonu 100X. (**A**) Texas red ile işaretlenen vazopressin nöronları kırmızı, (**B**) FITC ile işaretli $P2Y_2$ eksprese eden nöronlar ise yeşil renkte görülmektedir. (**C**) $P2Y_2$ reseptör proteinini eksprese eden vazopressin nöronları sarı renkte izlenmektedir.

Supraoptik çekirdek ve paraventriküler çekirdekte UTP'nin aktive ettiği $P2Y_2$ reseptörünü tanıyan antikor ile yapılan boyamalarda, tüm vazopressin nöronlarında bu proteinin eksprese edildiği belirlendi (Şekil 55 ve 56).



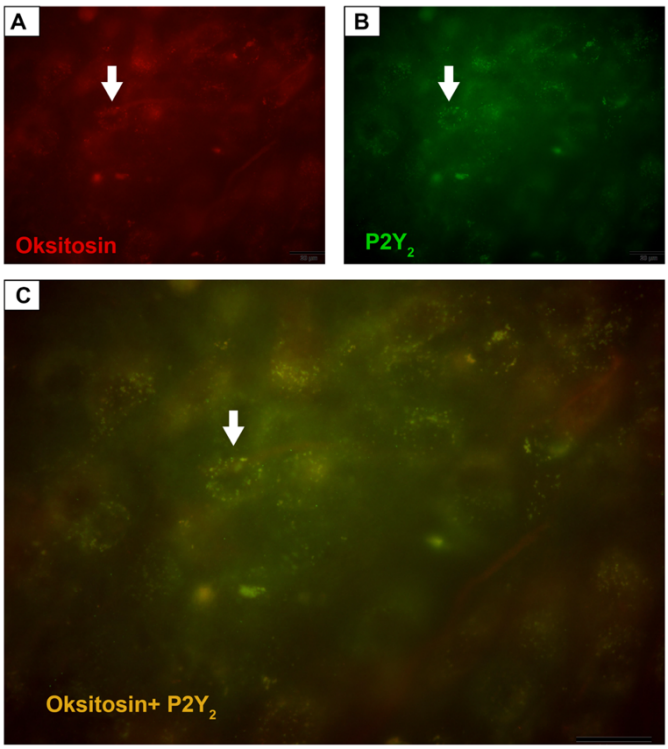
Şekil 55. SON'de yerleşik vazopressin nöronlarında $P2Y_2$ ekspresyonu 40X. (**A**) Texas red ile işaretli vazopressin nöronları kırmızı, (**B**) FITC ile işaretli $P2Y_2$ eksprese eden nöronlar ise yeşil renkte görülmektedir. (**C**) $P2Y_2$ reseptör proteinini eksprese eden vazopressin nöronları sarı renkte izlenmektedir. ok: Optik kiyazma



Şekil 56. PVN'de yerleşik vazopressin nöronlarında $P2Y_2$ ekspresyonu. Texas red ile işaretli vazopressin nöronları kırmızı (**A**-20X, **D**-40X), FITC ile işaretli $P2Y_2$ eksprese eden nöronlar ise yeşil renkte (**B**-20X, **E**-40X) $P2Y_2$ reseptör proteinini eksprese eden vazopressin nöronları sarı renkte izlenmektedir (**C**-20X, **F**-40X). 3V: 3. ventrikül.

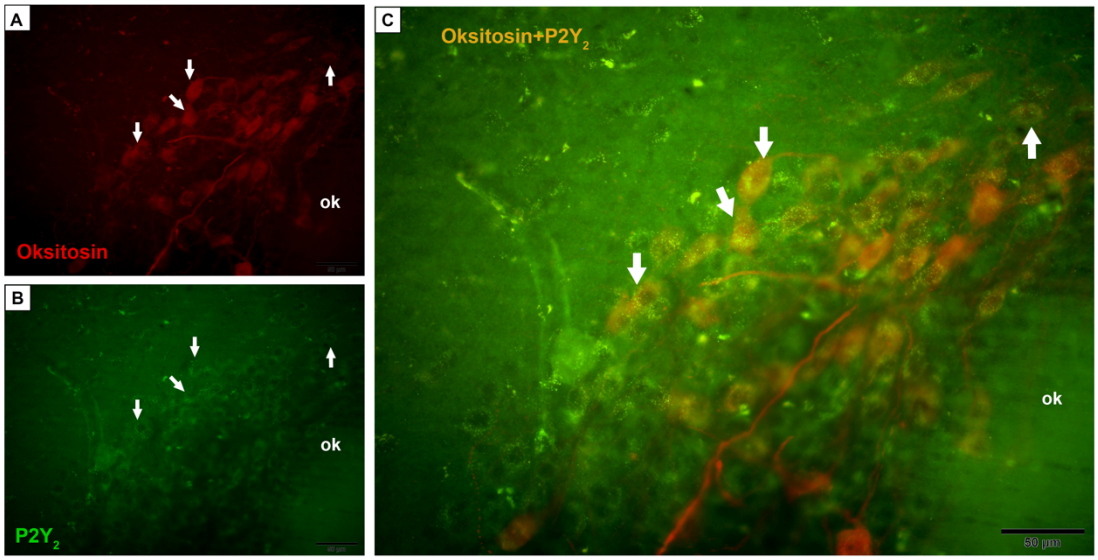
4.6.3. Oksitosin Nöronlarında $P2Y_2$ Reseptör Ekspresyonunun Araştırılması

İkili immünofloresan yöntemi ile oksitosin-pozitif nöronların UTP'nin reseptörü, $P2Y_2$ reseptör proteini için de pozitif olduğu gösterildi (Şekil 57).

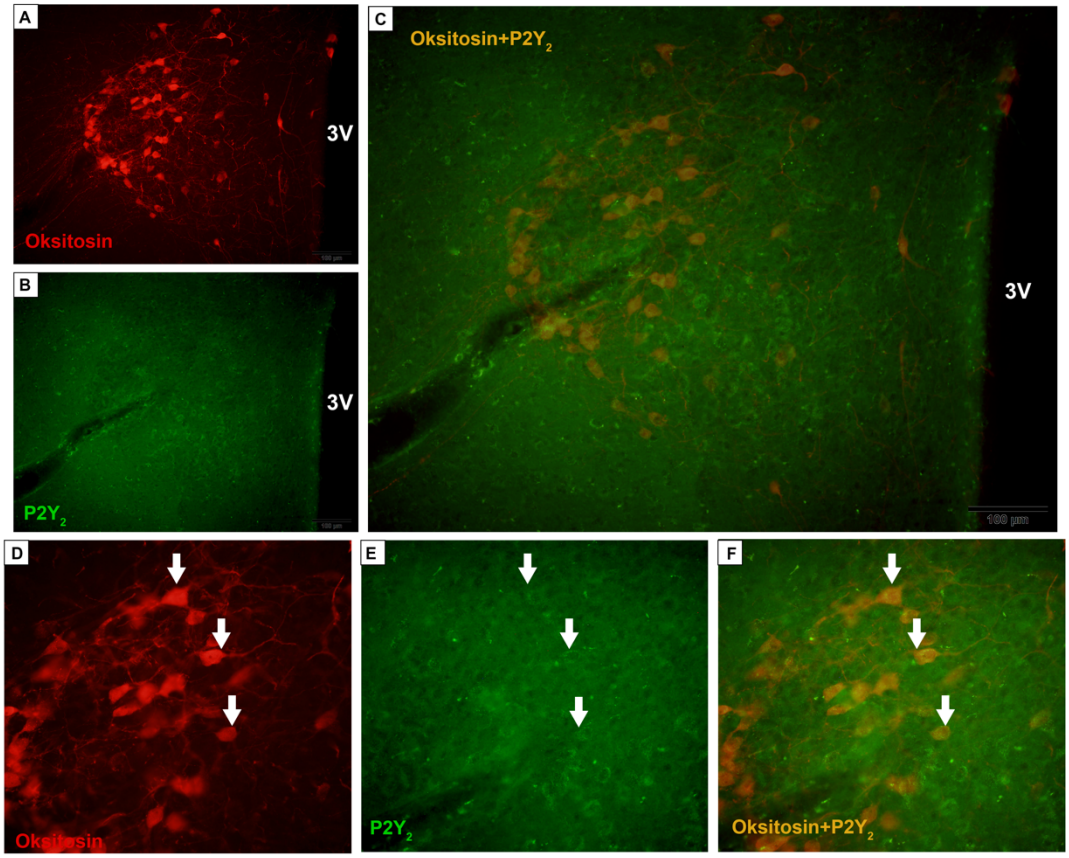


Şekil 57. Oksitosin nöronlarında $P2Y_2$ ekspresyonu. (**A**) Texas red ile işaretli oksitosin nöronları kırmızı, (**B**) FITC ile işaretli $P2Y_2$ eksprese eden nöronlar ise yeşil renkte görülmektedir. (**C**) $P2Y_2$ reseptör proteinini eksprese eden oksitosin nöronları sarı renkte izlenmektedir.

Supraoptik çekirdek ve paraventriküler çekirdekte UTP'nin bağlandığı $P2Y_2$ reseptör antikor ile yapılan boyamalar ile tüm oksitosin nöronlarında bu proteinin eksprese edildiği belirlendi (Şekil 58 ve 59).



Şekil 58. SON'de yerleşik oksitosin nöronlarında $P2Y_2$ ekspresyonu 40X. (**A**) Texas red ile işaretli oksitosin nöronları kırmızı, (**B**) FITC ile işaretli $P2Y_2$ eksprese eden nöronlar ise yeşil renkte görülmektedir. (**C**) $P2Y_2$ reseptör proteinini eksprese eden oksitosin nöronları sarı renkte izlenmektedir. ok: Optik kiyazma



Şekil 59. PVN'de yerleşik oksitosin nöronlarında $P2Y_2$ ekspresyonu. Texas red ile işaretli oksitosin nöronları kırmızı (**A**-20X, **D**-40X), FITC ile işaretli $P2Y_2$ eksprese eden nöronlar ise yeşil renkte (**B**-20X, **E**-40X), $P2Y_2$ reseptör proteinini eksprese eden oksitosin nöronları sarı renkte izlenmektedir (**C**-20X, **F**-40X). 3V: 3. ventrikül.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Doktora tez çalışması kapsamında "Üridin ve üridin nükleotidlerinin (UMP, UDP, UTP) merkezi yolla uygulanmasını takiben hipotalamik çekirdeklerde yerleşik nöronları aktive edebilir ve aktivasyondaki etkisini P2Y reseptörlerine bağlanarak gösterir" şeklinde kurgulanan hipotez test edilerek doğrulanmıştır.

Organizmanın birincil biyolojik zorunluluğu, hayatta kalmak, ikincisi ise türünün çoğalmasını sağlamaktır. Bu zorunlulukları yerine getirmek için canlının karmaşık fizyolojik süreçleri farklı çevresel koşullarla koordine etmesi ve spesifik duyusal ipuçlarına uygun adaptif tepkiler geliştirmesi gerekir. Dolayısıyla homeostazın sürdürülmesi biyolojik adaptasyonun önemli bir bileşenini temsil eder. Bu durum endokrin, visseral ve somatomotor kontrol mekanizmalarının başarılı entegrasyonuna bağlıdır. Bugüne kadar ortaya koyulan bulgular, hipotalamusun bu entegrasyona aracılık etmede önemli bir rol oynadığını desteklemektedir.

Hipotalamus genellikle endokrin, otonomik ve somatomotor sistemler arasında temel bir arayüz olarak görülmektedir. Memelilerde hipotalamusun, kardiyovasküler sistemi, ısı düzenleyici tepkileri, ayrıca savunma-agresif davranışları su–besin alımı, biyolojik sirkadiyen ritmi ve sindirim davranışlarını düzenlediği gösterilmiştir. Ayrıca hipotalamus, cinsel ve annelik davranışlarının ifadesini kontrol ederek türün hayatta kalmasının sağlanmasında önemli bir rol oynar. Hipotalamusun işlevi açısından temel öneme sahip olan, hipofiz beziyle olan yakın ilişkisi, endokrin salgılama modellerinin sinirsel kontrolünü açıkça ortaya koymaktadır (Harris, 1951; Swanson, 1986).

Oksitosin ve vazopressin, hipotalamusta supraoptik ve paraventriküler çekirdeklerdeki nöronlar tarafından sentezlenen hormonlardır. Bu hormonların memelilerde birçok periferik ve merkezi fonksiyonda rolü tanımlanmıştır (Makarenko ve ark., 2000). Oksitosin ve vazopressin nöronlarının çeşitli eksojen ve endojen uyaranlar ile aktive oldukları bildirilmiştir. Hipotalamik nöronların aktivasyonu, nöronal aktivasyonun bir belirteci olarak c-Fos proteininin geçici ekspresyonu kullanılarak immünohistokimya ile tespit edilebilir (Hoffman, Smith, & Verbalis, 1993). Endojen ve eksojen uyarıyı takiben, Immediate-Early'' gen (IEG) olan *c-fos* geni, sitoplazmada c-Fos protein ekspresyonuna neden olur. Ardından c-

Fos proteini sitoplazmadan çekirdeğe geçerek genlerdeki spesifik bölgelere bağlanarak, genlerin ekspresyonunu tetiklemektedir.

Yapılan çalışmalar, vazopressin ve oksitosin nöronlarının strese (Laguna-Abreu ve ark., 2007; Miyata ve ark., 1995; Zhang, Zhu, Cao, Cui, & Ai, 2009), hipovolemiye (Fitch, Patel, & Weiss, 2000; Xie, Li, & Kawada, 2000), hiperozmolaliteye (Giovannelli, Shiromani, Jirikowski, & Bloom, 1990; Sharp, Sagar, Hicks, Lowenstein, & Hisanaga, 1991), kanamaya (Thrivikraman, Ying, & Plotsky, 1997) ve farklı nörotransmitter agonistlere (Minbay, Eyigor, & Çavusoğlu, 2006; Sen, & Sun, 1995) yanıt olarak c-Fos proteini eksprese ettiğini ortaya koymuştur.

Vazopressin, insan vücudunda sıvı homeostazisinin sürdürülmesi için gereklidir. Vazopressin, hiperozmolalite, hipotansiyon ve hipovolemiye yanıt olarak arka hipofizden salınmaktadır (Den Ouden, & Meinder, 2005). Hipotalamo-nörohipofiz sistemindeki magnoselüler nöronların, *c-fos* gen ekspresyonundaki güçlü değişikliklerle spesifik fizyolojik uyaranlara yanıt verdiği uzun zamandır bilinmektedir (Burbach ve ark., 2001). Hiperosmotik uyaranların hipotalamo-nörohipofiz sistemindeki *VP* geninin transkripsiyonunu hızlı ve geçici olarak IEG'lerinkine benzer olarak arttırdığı gösterilmiştir (Herman, Schafer, Watson, Sherman, 1991; Kawasaki ve ark., 2005). Bu osmotik dengenin sağlanmasında, ön beyindeki spesifik ozmosensitif nöronlar görev almaktadır. Yapılan çalışmalarda bu nöronların plazmadaki ozmotik değişiklikleri tespit edebildiği ve aksonal projeksiyonları aracılığıyla, SON ve PVN'deki magnoselüler nöronları uyararak VP salgısının uygun şekilde olmasını sağladığı ortaya koyulmuştur (Bisset, & Chowdry, 1988; Bourque ve Oliet, 1997; Bourque, 2008; Leng ve ark., 2001). Kanama ve dehidrasyon sırasında meydana gelen hipovolemi, atriyal basınçta bir azalmaya neden olur. Damar duvarında ve kalpteki baroreseptörler, atriyum basıncında bir düşüş olduğunu algılar. Bu reseptörlerden gelen afferent sinir lifleri, soliter traktus çekirdeğindeki nöronlar ile sinaps yapar ve hipofiz tarafından VP salınımını kontrol eden hipotalamusa bilgi gönderilir. Bunun sonucu olarak VP salınımı artar (Boone, & Deen, 2008).

Yapılan çalışmalarda, intraperitoneal hipertonik salin uygulanması ya da ciddi dehidratasyon durumu oluşturulduğunda magnoselüler VP nöronlarında c-Fos

protein ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Dine ve ark, 2004). Diğer bir çalışmada hipovolomik şok durumunda SON ve PVN'de c-Fos eksprese eden vazopressin nöron sayısınının arttığı, hatta hipovolomik düzeye göre artan aktivasyonla paralel olarak serum vazopressin düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (Roberts ve ark., 1995).

Paraventriküler çekirdekte vazopressinerjik parvoselüler nöronlarında CRF ekspresyonu daha önceki çalışmalarda ortaya koyulmuş ve (Itoi ve ark, 2014; Mouri ve ark., 1993) CRF ve VP'nin aynı vezikül içinde taşındığı immünohistokimyasal olarak gösterilmiştir (Whitnall ve ark., 1985). Yapılan başka bir çalışmada, prostaglandin E2'nin (PGE2) merkezi uygulanmasını takiben PVN'de vazopressin ve CRF nöronlarında c-fos mRNA ekspresyonunun varlığı gösterilmiştir (Lacroix, Vallieres, & Rivest, 1996).

PVN'de vazopressin eksprese eden ayrı bir parvoselüler nöron grubunun fizyolojiyi düzenlemek için birçok beyin bölgelerine projeksiyon yaptığı bildirilmiştir (Rigney ve ark., 2023). Güncel yapılan bir çalışmada, PVN'de lokalize VP nöronlarının optogenetik aktivasyonu ile deney hayvanlarının öz bakım davranışlarına ilgisinin arttığı bulunmuştur (Islam, Maejima, Matsui, Mieda, 2022).

Glutamatın hipotalamustaki başlıca uyarıcı amino asit nörotransmitteri olduğu bilinmektedir (Van den Pol, & Trombley, 1990). Glutamat reseptörlerinden AMPA ve NMDA varlığı SON ve PVN'deki magnoselüler nöronlarda gösterilmiştir (Herman, Eyigor, Ziegler, & Jennes, 2000; Pak, & Currás-Collazo, 2002). Vasopressin nöronlarının glutamaterjik sistem aracılı aktivasyonu ile ilgili veriler literatürde yer almaktadır. Örneğin; suprakiyazmatik nukleusta yerleşik vazopressin nöronlarının NMDA reseptörü üzerinden aktivasyon sağladığı gösterilmiştir (Rusnak, Toth, House, & Gainer, 2007). Bununla birlikte, başka bir çalışmada, glutamaterjik ajanların SON'da VP mRNA transkripsiyonunda bir değişikliğe neden olmamasına karşın, aynı koşullarda *c-fos* gen ekspresyonunda bir artışa neden olduğunu göstermiştir (Kawasaki, Ponzio, Yue, Fields, & Gainer, 2009).

Magnoselüler oksitosin sistemi sıçanlarda doğum sırasında aktive edilmektedir. Bu aktivasyon oksitosin salgısının artması (Higuchi, Tadokoro, Honda, & Negoro, 1986), oksitosin nöronları ateşlenme hızlarının artması (Summerlee, 1981), Fos ekspresyonu (Antonijevic ve ark., 1995; Luckman ve ark., 1993) ve

oksitosin hnRNA (Douglas ve ark., 1998) ve dendritik oksitosin salınımının (Neumann, Douglas, Pittman, Russel, & Landgraf, 1996) artması şeklinde tanımlanır. Oksitosin nöronlarının doğum sırasında kasılan rahimden gelen sinirsel sinyallerle aktive olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda doğum sırasında magnoselüler nöronlarda artan c-Fos aktivasyonuna paralel olarak serum oksitosin seviyesinin de arttığı bildirilmiştir (Douglas, Leng, & Russell, 2002).

Ayrıca erkek çiftleşme davranışının beynin çeşitli bölgelerinde Fos immünoreaktivitesini artırdığı bildirilmiştir (Newman, Parfitt, & Kollack-Walker, 1997; Robertson ve ark., 1991). Çiftleşme davranışıyla birlikte PVN'de c-Fos eksprese eden oksitosin nöron sayısının arttığı ve bu nöron grubunun penis reflekslerini düzenlemek için beyin sapı ve omuriliğe projekte olan nöronlardan oluştuğu gösterilmiştir (Witt, & Insel, 1994).

Hipotalamik nöronların su yoksunluğu ve hipertonik stres durumunda c-Fos eksprese ettiği gösterilmiştir. Paraventriküler çekirdekteki magnoselüler nöronların ozmotik uyarımdan sonra c-Fos eksprese eden oksitosin nöronu olduğu gösterilmiştir (Giovannelli ve ark., 1990).

Emzirmenin SON ve PVN'deki OT nöronlarının aktivasyonunu tetiklemekte ve arka hipofizden OT'nin pulsatil bir şekilde salınmasına ve süt çıkışına neden olduğu bilinmektedir (Wakerley, 2006). Emziren hayvanlarda, emmenin 18-72 saat süreyle kesilmesinden sonra bile yalnızca paraventriküler ve supraoptik çekirdeklerin oksitosin ve vazopressin nöronlarında c-Fos immünoreaktivitesinin görüldüğü bulunmuştur. Buna ek olarak 24 saat su yoksunluğu veya kanamaya maruz kalan emziren sıçanların çekirdeklerinde daha da fazla c-Fos-pozitif nöron tespit edilmiştir. Bu nöronların yaklaşık %75'inin vazopressin nöronları ve %25'inin oksitosin nöronlarını olduğu gösterilmiştir (Fenelon, Poulain, & Theodosis, 1993).

Hipovolomik şok durumunda SON ve PVN'de c-Fos eksprese eden oksitosin nöron sayısınının arttığı, hatta hipovolomik düzeye göre artan aktivasyonla paralel serum oksitosin düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. Ancak OT nöronlarında görülen aktivasyon için VP'den daha fazla kan kaybının gerektiği sonucuna varılmıştır (Roberts ve ark., 1993).

Paraventriküler çekirdekte keşfedilen magnoselüler nöronlardan daha küçük parvoselüler oksitosin nöronlarının farklı beyin sapı çekirdeklerine ve omuriliğin

farklı bölgelerine projekte olduğu (Swanson ve Sawchenko, 1980; Sawchenko ve Swanson, 1982), bu aksonal terminallerinden gelen OT'nin kardiyovasküler fonksiyonların, solunumun, beslenme davranışının ve nosisepsiyonun modülasyonuna katkıda bulunduğu öne sürülmüştür (Atasoy ve diğerleri, 2012; Condes-Lara ve diğerleri, 2003; Mack ve diğerleri, 2002; Petersson, 2002). Hatta yapılan çalışmada parvoselüler OT nöronlardaki, OT'nin aktivitesine bağlı olarak sistemik dolaşıma salınmasını kontrol etmek için, SON'da bulunan magnoselüler OT nöronlarıyla sinaps yaptığı belirlenmiştir (Eliava ve ark., 2016).

Oksitosinin gıda alımını da modüle ettiği artık iyi bilinmektedir. Örneğin, oksitosinin beyine farmakolojik enjeksiyonu gıda alımını azaltırken, oksitosin reseptör antagonisti uygulanmasının kemirgenlerde ters etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Arletti, Benelli, & Bertolini, 1989; Arletti, Benelli, & Bertolini, 1990) Doğrudan oksitosinerjik innervasyon alan kaudal beyin sapının, oksitosinin anoreksijenik etkileri açısından kritik bir bölge olduğu gösterilmiştir (Grill, & Hayes, 2012). Periferal oksitosin uygulanmasının beyin sapında NTS'de c-Fos ekspresyon artışına neden olurken, besin alınımını azalttığı bildirilmiştir (Iwasaki ve ark., 2015).

ARC'den eksprese olan nöronal peptitler oksitosin nöronlarında c-Fos'u aktive edebilir ve/veya oksitosin sekresyonunu artırabilir. Arkuat çekirdekte eksprese olan α-MSH'nin i.s.v. yolla veya direkt PVN'ye verilmesinin gıda alımını güçlü bir şekilde inhibe ettiği ve oksitosin nöronlarında c-Fos ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir (Olszewski ve ark., 2001; Wirth, Olszewski, Yu, Levine, Giraudo, 2001). Ayrıca ARC'ye oksitosin enjeksiyonun da gıda alımını azalttığı gösterilmiştir (Maejima ve ark., 2014). Merkezi a-MSH uygulamasının neden olduğu anoreksijenik etkilerin bir oksitosin reseptör antagonisti tarafından zayıflatılması, ARC'den üretilen a-MSH ile merkezi oksitosin sinyali arasında kritik bir etkileşim olduğunu desteklemektedir (Yosten, Samson, 2010). Öte yandan ARC'deki NPY/AgRP nöronlarının oksitosin nöronlarını inhibe ederek gıda alımının artmasına katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Atasoy, Nicholas Betley, Su, Sternson, 2012).

Daha önce ortaya koyulan çalışmalarda nesfatin-1'in i.s.v. uygulanmasının PVN'de oksitosin nöronlarında c-Fos aktivasyon artışına neden olduğunu göstermiştir (Maejima ve ark., 2009).

Uyarıcı amino asit yapılı nörotransmitter glutamatın, OT aktivitesini hipotalamustan oksitosin salgısını düzenleyerek kontrol ettiği gösterilmiştir. Örneğin; AMPA ya da kainik asit enjeksiyonunu takiben plazmada OT konsantrasyonunun arttığı, glutamat antagonistlerinin bu artışın engellediği bulunmuştur (Parker, & Crowley, 1993). Diğer bir çalışmada da AMPA ve NMDA agonistlerinin SON ve PVN'deki nöronları uyararak, plazma OT'nin artışına neden olduğu ve AMPA veya NMDA antagonistleri tarafından bu durumun bloke edildiği gösterilmiştir (Parker, & Crowley, 1995) Laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmada SON ve PVN'de oksitosin nöronlarında kainat reseptör alt birimlerinin varlığı gösterilmiştir (Minbay, & Eyigor, 2020). Ayrıca i.p. kainik asit uygulamasının SON ve PVN'deki c-Fos eksprese eden oksitosin sayısını arttırdığı ve CNQX uygulamasıyla bu aktivasyonun azaldığı gösterilmiştir (Minbay ve ark., 2006).

Üridin ve sitidin dolaşımdaki başlıca pirimidinlerdir. *De nova* sentez yolağında glutamin UMP'ye dönüştürülür. Daha sonra UMP, üridin'e defosforile edilir. Ek olarak üridinin sitidin deaminaz tarafından sitidin'den de oluştuğu bildirilmiştir (Greenhill, 2017; Le ve ark., 2013; Yamamoto ve ark., 2011). Ayrıca, üridin, pirimidin kurtarma yoluyla UTP ve CTP'den elde edilebildiği gösterilmiştir (Vincenzetti ve ark., 2016).

Daha önce yapılan çalışmalarda i.p. üridin uygulaması ve üridin kaynağı UMP'nin oral olarak verilmesiyle beyinde ve plazma üridin seviyelerinde artış olduğu gösterilmiştir. Üridinde gerçekleşen artışa ek olarak beyinde UTP, CTP ve CDP-kolin artışının da gerçekleştiği bildirilmiştir (Cansev ark., 2005; Peters ve ark., 1987). UTP'nin hücre içi seviyelerinin serbest üridin seviyelerine bağlı olduğu bildirilmiştir (Wurtman, Regan, Ulus, & Yu, 2000). Yapılan diğer bir çalışmada, farklılaşmamış sıçan feokromositoma (PC12) hücrelerine üridin uygulanmasının hücre içi CTP, UTP ve CDP-kolin seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir (Richardson, Watkins, Pierre, Ulus, & Wurtman, 2003).

Daha önce laboratuvarımızda yapılan çalışmada CDP-kolin'nin intravenöz uygulanmasını takiben SON ve PVN'de c-Fos eksprese eden vazopressin ve oksitosin nöron yüzdesinin salin grubuna göre anlamlı olarak arttığı bulunmuştur. Ek olarak bu çalışmada CDP-kolin dozuyla doğru orantılı c-Fos eksprese eden

vazopressin ve oksitosin nöron yüzdesinin de arttığı ortaya koyulmuştur (Eyigor, Coskun, Cavun, & Savci, 2012).

Üridin nükleotidlerinden UTP'nin hipotalamustan izole edilen magnoselüler oksitosin ve vazopressin nöronları üzerindeki etkisi elektrofizyolojik bulgularla daha önce ortaya koyulmuştur (Hiruma, & Bourge, 1995).

Sunulan tez çalışmasında intraserebroventriküler yolla uygulanan üridin ve üridin nükleotidleri UMP, UDP ve UTP'nin SON ve PVN'de yerleşik vazopressin ve oksitosin nöronlarında aktive edici etkileri immünühistokimyasal yöntemle ilk kez araştırıldı. Elde ettiğimiz bulgularda i.s.v. olarak uygulanan UMP ve UTP'nin c-Fos eksprese eden vazopressin nöronlarını SON ve PVN bölgesinde salin grubuna göre anlamlı olarak arttırdığı bulundu. Ayrıca i.s.v. uygulanan üridin ve UDP'nin salin grubuna göre vazopressin nöronlarında aktivasyon artışı sağladığı görülmekle birlikte, bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. İntraserebroventriküler uygulanan üridin, UMP ve UTP'nin c-Fos eksprese eden oksitosin nöronlarını SON ve PVN bölgesinde salin grubuna göre anlamlı olarak arttırdığı ortaya koyuldu. Benzer olarak UDP'nin c-Fos eksprese eden oksitosin nöron yüzdesini salin grubuna göre arttırdığı ancak, bu aktivasyonun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gösterildi. Üridin uygulamasıyla vazopressin ve oksitosin nöronlarında görülen aktivasyon farkının literatürde gösterilen ko-lokalize nöron sayısının SON'de az (~%3), PVN'de ko-lokalize nöron sayısının olmamasına ve dolayısıyla etkinin nörona spesifik olabileceğini düşündürmektedir.

İntravenöz olarak 250 mg/kg dozunda enjekte edilen CDP-kolinin plazma vazopressin artışlarına neden olabileceği de gösterilmiştir (Savcı ve ark., 2003). Diğer bir çalışmada plazma vazopressin ve oksitosin seviyeleri üzerindeki intravenöz CDP-kolinin etkilerinin doz ve zaman profiline bağlı olduğu gösterilmiştir (Eyigor ve ark., 2012). Tez çalışmasının bir parçası olduğu proje kapsamında yapılan hormon ölçümleri, UDP ve UTP'nin, serum vazopressin ve oksitosin düzeylerini zaman bazında anlamlı olarak arttırdığını gösterdi (Salman, 2022). Yine de bu bulguları, oksitosin ve vazopressin nöronlarındaki transkripsiyonel artıştan ve sentezden kaynaklandığı, ayrıca bunun da plazma hormon seviyelerinin artmasına neden olduğu şeklinde yorumlamak doğru değildir. Çünkü tez çalışması kapsamında mRNA seviyelerindeki değişiklikleri analiz etmek için bir teknik kullanılmadı. Bu

olasılığı doğrulamak için in situ hibridizasyon histokimyası ve/veya polimeraz zincir reaksiyonu (intron ve ekzona özgü problar veya primerler ile) gibi ileri çalışmalara gereksinim vardır. Elde ettiğimiz sonuçlar, merkezi yolla verilen üridin nükleotidlerinin hipofizdeki sinir terminallerine doğrudan etki ederek plazma hormon düzeylerini artırabileceğini de düşündürmüştür. Nörohipofiz veya izole sinir terminallerinin kullanıldığı ileri çalışmalarla bu sonuçlar test edilebilir.

Nesfatin-1, gıda ve su alımı, enerji tüketimi, kardiyovasküler ve gastrointestinal fonksiyonlar, anksiyete ve depresyon ve üreme fonksiyonları üzerinde düzenleyici etkileri olan yeni tanımlanmış bir peptitdir (Schalla, Stengel, 2018). Yakın zamanda keşfedilen bu tokluk molekülü olan nesfatin-1'in, hipotalamik paraventriküler çekirdek, supraoptik çekirdek, lateral hipotalamik alan ve traktus solitarius çekirdeği dahil olmak üzere, beslenme ve metabolik düzenlemede rol oynayan çeşitli beyin alanlarında eksprese edildiği bilinmektedir (Shimizu ve ark., 2009b; Stengel, ve ark., 2010). Nesfatin-1 ve nesfatin-1 öncüsü olan NEFA/nükleobindin-2'nin (NUCB2) i.s.v. uygulanması gıda alımını baskıladığı, anti-nesfatin-1 antikorunun i.s.v. uygulamasının ise gıda alımını arttırdığı bildirilmiştir (Oh-I ve ark., 2006). Yapılan çalışmalarda SON ve PVN'de açlık sonrası yeniden beslemede c-Fos eksprese eden nöronlarda artış olduğu gösterilmiştir (Kocoglu, Oy, Halk, Cakır, Minbay, & Eyigor, 2022; Kohno ve ark., 2008)

Gıda alımının engellenmesinde nesfatin-1 ile oksitosin arasında güçlü bir etkileşime işaret edilmektedir. Oksitosinin i.p. uygulanmasının özellikle PVN'de c-Fos eksprese eden nesfatin-1 nöronları arttırdığını ortaya koymuştur (Saito ve ark., 2017).

Oksitosin ve vazopressin nöronlarına benzer olarak nesfatin-1 nöronlarının glutamaterjik sistem üzerinden aktive olduğu laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışma ile gösterilmiştir. Bu çalışmada, glutamat agonist ve antogonistlerinin nesfatin-1 nöronlarınca eksprese edilen reseptörlerine bağlanarak c-Fos-pozitif nesfatin-1 nöron sayısında artışa neden olduğu gösterilmiştir (Gok-Yurtseven ve ark., 2020).

Yakın zamanda laboratuvarımızda gerçekleştirilen bir diğer çalışmada, i.s.v. CDP-kolin uygulanmasıyla SON'daki nesfatin-1 nöronlarının çoğunun aktive olduğu gösterilmiş ve c-Fos-pozitif nesfatin-1 nöron sayısının asetilkolin reseptör antagonisti

olan atropin sülfat uygulaması ile anlamlı düzeyde azaldığı bulunmuştur (Topal ve ark., 2021).

Bu çalışmada intraserebroventriküler yolla uygulanan üridin ve üridin nükleotidleri UMP, UDP ve UTP'nin SON, PVN ve PeV'de yerleşik nesfatin-1 nöronlarında aktive edici etkileri immünohistokimyasal yöntemle ilk kez gösterildi. Elde ettiğimiz bulgularda i.s.v. olarak uygulanan üridin, UMP ve UTP'nin c-Fos eksprese eden nesfatin-1 nöronları SON, PVN ve PeV'de salin grubuna göre anlamlı olarak arttırdığı bulundu. Ayrıca bu bölgelerde i.s.v. uygulanan UDP'nin salin grubuna göre aktive olan nesfatin-1 nöronlarının oranını arttırmakla birlikte, bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. Üridin ve üridin nükleotidlerinin nesfatin-1 nöronlarını üzerine aktive edici etkisi SON ve PVN'de yerleşik oksitosin nöronlarınkine benzer olarak tespit edildi. Bu durum literatürde ortaya koyulan SON ve PVN'de nesfatin-1 nöronlarıyla ko-lokalize oksitosin nöron yüzdesinin (sırasıyla %35, %24) vazopressin nöron yüzdesinden (sırasıyla %28, %18) fazla olması ve dolayısıyla etkinin nörona spesifik olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca nesfatin-1 ve oksitosin nöronları arasındaki iletişim, anoreksijenik etki bazında besin alımıyla üridin ve üridinin nükleotidlerinin arasındaki ilişkinin varlığını gösterecek gelecekteki çalışmalarla değerlendirilebilir.

Yapılan çalışmalarda açlık sonrası yeniden beslemeyle SON ve PVN'de c-Fos eksprese eden nesfatin-1 nöron sayısının artışına ek olarak, sıçanların süreli aç bırakılmasının, dolaşımdaki nesfatin-1 düzeylerinde azalmaya yol açabileceği, yeniden besleme sonrası kontrol düzeylerine döndüğü bildirilmiştir (Goebel, Stengel, Tache, Sach, & Lambrecht, 2009a). Ayrıca sağlıklı bireylerde gerçekleştiren değerlendirmeler sonucunda serum nesfatin-1 düzeylerinin obez insanlarda az, düşük ağırlıklı bireylerde fazla olduğu gösterilmiştir (Samani, Ghasemi, Bookani, & Shokouhi, 2019). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, üridinin i.p. uygulanmasının serum nesfatin-1 seviyesini salin grubuna göre anlamlı olarak düşürdüğünü göstermiştir (Çakır, & Kahveci, 2023). Tez çalışması kapsamında, üridin ve üridin nükleotidlerinin merkezi uygulamasının serum nesfatin-1 seviyelerine etkisi değerlendirilmemiş olup ileriki çalışmalarda üridin ve üridin nükleotidlerinin merkezi uygulamasını takiben gerçekleşen nöronal aktivasyonun, nesfatin-1 serum

düzeylerindeki değişime etkisinin göz önünde bulundurulması, beslenme ve vücut ağırlığının kontrolünde üridinin ve üridin nükleotidlerinin önemini ortaya koyabilir.

Üridin nükleotidleri metabotropik P2Y reseptörleri için ligandlardır. UTP, UDP ve UDP şekerleri $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$ ve $P2Y_{14}$ reseptör tiplerinden bir veya daha fazlasını aktive edebilmektedir. UTP, $P2Y_2$ (ATP tarafından eşit potansiyelde etkinleştirilen) (Lustig ve ark., 1993) ve $P2Y_4$ (Communi ve ark., 1995) reseptörlerini aktive ederken, $P2Y_6$ reseptörlerinin fizyolojik agonisti UDP'dir (Communi ve ark., 1996). $P2Y_2$, $P2Y_4$ ve $P2Y_6$ reseptörlerinin üridin nükleotidleri ile uyarılması, fosfolipaz C (PCL) aktivasyonunu takiben hücre içi Ca^{2+} salınımını indükleyen ve protein kinaz C'yi (PKC) aktive eden ikincil haberciler, inositol 1,4,5-trisfosfat (IP3) ve diaçilgliserol (DAG) oluşturmaktadırlar. $P2Y_{14}$ reseptörü, UDP ve UDP-glikoz olmak üzere UDP şekerleri tarafından uyarılmaktadır. Ayrıca Gi proteinlerine bağlanma yoluyla adenilat siklaz aktivitesini inhibe ettiği bilinmektedir (Abbracchio ve ark.,2006; Erb ve ark., 2006). Üridin ve UMP'nin henüz tanımlanmış reseptörleri bulunmamaktadır (Cansev, 2007).

Literatür bilgisi doğrultusunda c-Fos'un aktivitesinin, transkripsiyonel düzenleyicilerle etkileşimler yoluyla modüle edildiği ve yukarı yöndeki kinazlar tarafından kontrol edildiği bilinmektedir. Bazı gruplar c-Fos ekspresyonunun ve aktivasyonunun çeşitli hücre tiplerinde MAPK yolakları tarafından düzenlendiğini bildirmiştir (Pardo, Boland, & Boland, 2006; Smith, Smedberg, Rula, Hamilton, & Xu, 2001). Ayrıca protein kinaz C (PKC) tarafından *c-fos* geninin ekspresyonunun da uyarıldığı bildirilmiştir (Stachowiak ve ark., 1990). Bunun yanında Ca^{2+} ve diaçilgliserol (DAG) dahil ikincil habercilerin c-Fos ifadesini uyardığı gösterilmiştir (Herschmann, 1991). Hücre kültürü çalışmalarında, $P2Y_2$ reseptör aktivasyonunun c-Fos ekspresyonu üzerindeki etkileri ve HeLa hücrelerinde hücre dışı UTP tarafından uyarılan sinyal yolları araştırılmış ve sonuç olarak $P2Y_2$ aktivasyonunun c-Fos proteinini indüklediği ve ERK1/2 ve PI3K/PKC sinyalleri ile uyumlu olduğu gösterilmiştir (Elia ve ark., 2005; Muscella, Elia, Greco, Storelli, Marsigliante, 2003).

2015 yılında ilk defa pirimidinerjik nörotransmisyon kavramının açıklandığı çalışmada, i.p. olarak üridin uygulanması sonucunda ekstrasellüler beyin sıvısında UTP, UDP artışı olduğu ve bu artışa IP3 ve DAG'ın eşlik ettiği gösterilmiştir. $P2Y_2$

reseptör antagonisti suramin ile IP3 ve DAG'ta görülen artışın baskılandığı bulunmuştur (Cansev ve ark., 2015).

Tez çalışmasında üridin nükleotidi UTP'nin nesfatin-1, vazopressin ve oksitosin nöronlarında, c-Fos eksprese eden nöron yüzdesini anlamlı olarak arttırdığı ve reseptör antagonistinin bu aktivasyonu spesifik olarak baskıladığı belirlendi. Ayrıca literatürde ilk defa SON ve PVN bölgelerinde bu nöronların $P2Y_2$ reseptörünü sentezledikleri gösterildi. Elde edilen bu bulgular, UTP'nin, nesfatin-1, vazopressin ve oksitosin nöronlarını aktive edici etkisini bu nöronlar üzerindeki fonksiyonel $P2Y_2$ reseptörleri aracılığı ile gerçekleştiriyor olabileceğini düşündürdü. Ancak ileri çalışmalarda bu nöronlar üzerinde UTP ile $P2Y_2$ reseptörleri aracılığıyla görülen c-Fos ekspresyonun hücre içi yolaklarının araştırılması literatüre önemli katkılar sağlayabileceğini düşündürmektedir.

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, AgRP nöronlarının, UDP tarafından aktive edilen $P2Y_6$ reseptörü eksprese ettiğini göstermiştir. UDP'nin in vivo olarak AgRP nöronlarında ERK fosforilasyonu ve c-Fos ekspresyonu artışına paralel olarak besin alımını teşvik ettiği ve bu etkinin farmakolojik ($P2Y_6$ reseptör antagonisti) veya genetik inhibisyon ($P2Y_6$ eksikliği olan fareler) ile ortadan kalktığı gösterilmiştir. Ayrıca UDP'nin anoreksijenik POMC nöronlarında pERK immünoreaktivitesini önemli ölçüde artırmada başarısız olduğu gösterilmiştir (Steculorum ve ark., 2015).

Tez çalışmasında üridin nükleotidi UDP'nin neden olduğu c-Fos-pozitif nesfatin-1, vazopressin ve oksitosin nöron yüzdesindeki artışın anlamlı olmadığı bulundu. Hatta reseptör antagonistlerinin bu aktivasyonu nesfatin-1 nöronlarında anlamlı olarak arttırdığı görüldü. Sonuç olarak bu bulgular, UDP'nin özellikle oreksijenik nöronlarda ERK fosforilasyon yoluyla c-Fos ekspresyonunu uyardığını, anoreksijenik nöronlarda bu etkinin gözlenmemesi sonucuyla yorumlanabilir. Oksitosin ve vazopressin nöronları açısından değerlendirildiğinde ise benzer olarak UDP'nin nörona özgü etkisi şeklinde hatta oksitosin nöronlarının anoreksijenik özellikte olması şeklinde değerlendirilebilir. Bu nöronlarda $P2Y_6$ reseptör antagonistiyle anlamlı olarak artan aktivasyonun, farklı nöron popülasyonlarında görülen UDP'nin farklı etkisinin bu nöronları direk ya da indirek mekanizmalarla etkileyebileceği şeklinde yorumlandı.

$P2RY_{14}$, hücre dışı UDP ve UDP şekerleri tarafından aktive edilir ve Gi yoluyla sinyal vererek adenilat siklazı (AC) inhibe ederek cAMP'yi azalttığı gösterilmiştir (Abbracchio & Ceruti, 2006; Conroy, Kindo, Kellam, & Stocks, 2016). Literatürde bugüne kadar $P2Y_6$ reseptörüne benzer hipotalamik nöronlarda $P2Y_{14}$ reseptör ekspresyonu gösterilmemiştir. $P2Y_{14}$ ekspresyon varlığı glial hücrelerde tanımlanmıştır (Cram ve ark., 2022).

Bizim yaptığımız çalışmada i.s.v UDP uygulaması öncesi $P2Y_{14}$ reseptör antagonistinin verilmesi $P2Y_6$ reseptör antagonist uygulamasıyla gerçekleşen aktivasyona benzerdir. Çalışmamızda her iki antagonistin beraber kullanılmamış olması bir dezavantajdır ve bir reseptörün baskılanıp diğerinin baskılanmamış olması gördüğümüz beklenmeyen artışın nedeni olabilir. İleri çalışmalarda UDP'nin hipotalamusta yerleşik oreksijenik ve anoreksijenik özellikli nöronlar üzerindeki etkisinin $P2Y_{14}$ reseptörü üzerinden de gerçekleştirip gerçekleştirmediğinin araştırılması literatüre önemli katkılar sağlayacağını düşündürmektedir.

Tüm bu bilgilerle, doktora tez çalışması kapsamında literatürde ilk defa ortaya koyulan sonuçlar;

1. Periferik olarak uygulanan üridinin ve buna bağlı beyinde artışı görülen UDP ve UTP'nin beyinde farklı nöron gruplarını pirimidinerjik reseptörler aracığıyla etkilediği bilinmektedir. Bu çalışma ile ilk defa merkezi olarak uygulanan üridin ve üridin nükleotidlerinin nesfatin-1, vazopressin ve oksitosin nöronlarını aktive ettiği c-Fos proteini ekspresyonu ile gösterildi.

2. Üridin nükleotidi UTP'nin $P2Y_2$ üzerinden aktivasyon sağladığı bilinmektedir. Bu çalışma ile UTP'nin nesfatin-1, vazopressin ve oksitosin nöronlarında aktive edici etkisini $P2Y_2$ reseptörü aracılığı ile gerçekleştirdiği gösterildi. Bu durum $P2Y_2$ reseptör antagonist uygulaması ile nesfatin-1, vazopressin ve oksitosin nöronlarında azalan c-Fos aktivasyonu ile doğrulandı.

3. Nesfatin-1, vazopressin ve oksitosin nöronlarının $P2Y_2$ reseptör proteini sentezledikleri ilk defa gösterildi.

Özetle bu çalışma UTP/$P2Y_2$ ilişkisini periferik ve merkezi birçok etkiye sahip nesfatin-1, vazopressin ve oksitosin nöronlarının düzenleyicisi olarak tanımladı. İlişkili hastalıkların tedavisinde hedef olarak bu GPCR'ye yönelik agonistlerin ve antagonistlerin takip edilmesi gerekliliğini ortaya koydu.

6. KAYNAKLAR

Abbracchio, M. P., & Burnstock, G. (1994). Purinoceptors: Are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacology and Therapeutics* 64(3)i445-75 https://doi.org/10.1016/0163-7258(94)00048-4

Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Boeynaems, J. M., Barnard, E. A., Boyer, J. L., Kennedy, C., … Weisman, G. A. (2006). International Union of Pharamacology LVIII: Update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: From molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacological Reviews*, 58(3), 281-341. https://doi.org/10.1124/pr.58.3.3

Abbracchio, M. P., & Ceruti, S. (2006). Roles of P2 receptors in glial cells: Focus on astrocytes. *Purinergic Signalling*, 2(4), 595-604. https://doi.org/10.1007/s11302-006-9016-0

Althammer, F., & Grinevich, V. (2018). Diversity of oxytocin neurones: Beyond magno- and parvocellular cell types? *Journal of Neuroendocrinology* Vol. 30(8), 1-10. https://doi.org/10.1111/jne.12549

Anderson, C. M., Baldwin, S. A., Young, J. D., Cass, C. E., & Parkinson, F. E. (1999a). Distribution of mRNA encoding a nitrobenzylthioinosine-insensitive nucleoside transporter (ENT2) in rat brain. *Molecular Brain Research*, 70(2), 293-7. https://doi.org/10.1016/S0169-328X(99)00164-3

Anderson, C. M., Xiong, W., Geiger, J. D., Young, J. D., Cass, C. E., Baldwin, S. A., & Parkinson, F. E. (1999b). Distribution of equilibrative, nitrobenzylthioinosine-sensitive nucleoside transporters (ENT1) in brain. *Journal of Neurochemistry*, 73(2), 867-73. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0730867.x

Antonijevic, I. A., Leng, G., Luckman, S. M., Douglas, A. J., Bicknell, R. J., & Russell, J. A. (1995). Induction of uterine activity with oxytocin in late pregnant rats replicates the expression of c-fos in neuroendocrine and brain stem neurons as seen during parturition. *Endocrinology*, 136(1), 154-63. https://doi.org/10.1210/endo.136.1.7828526

Arletti, R., Benelli, A., & Bertolini, A. (1989). Influence of oxytocin on feeding behavior in the rat. *Peptides*, 10(1), 89-93. https://doi.org/10.1016/0196-9781(89)90082-X

Arletti, R., Benelli, A., & Bertolini, A. (1990). Oxytocin inhibits food and fluid intake in rats. *Physiology and Behavior*, 48(6), 825-30. https://doi.org/10.1016/0031-9384(90)90234-U

Armstrong, W. E., Warach, S., Hatton, G. I., & Mcneill, T. H. (1980). Subnuclei in the rat hypothalamic paraventricular nucleus: A cytoarchitectural, horseradish peroxidase and immunocytochemical analysis. Neuroscience, 5(11), 1931-58. https://doi.org/10.1016/0306-4522(80)90040-8

Atasoy, D., Nicholas Betley, J., Su, H. H., & Sternson, S. M. (2012). Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature*, 488(7410), 172-7. https://doi.org/10.1038/nature11270

Aydin, S., Dag, E., Ozkan, Y., Arslan, O., Koc, G., Bek, S., … Catak, Z. (2011). Time-dependent changes in the serum levels of prolactin, nesfatin-1 and ghrelin as a marker of epileptic attacks young male patients. *Peptides*, 32(6), 1276-80. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.04.021

Ayyanathan, K., Webbs, T. E., Sandhu, A. K., Athwal, R. S., Barnard, E. A., & Kunapuli, S. P. (1996). Cloning and chromosomal localization of the human P2Y1 purinoceptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 218(3), 783-788. https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0139

Azroyan, A., Cortez-Retamozo, V., Bouley, R., Liberman, R., Ruan, Y. C., Kiselev, E., … Breton, S. (2015). Renal intercalated cells sense and mediate inflammation via the P2Y14 receptor. *PLoS ONE*, 10(3), 0(3):e0121419 https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121419

Bankir, L., Bichet, D. G., & Bouby, N. (2010). Vasopressin V2 receptors, ENaC, and sodium reabsorption: A risk factor for hypertension? *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 299(5):F917-28. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00413.2010

Bankir, L., Bichet, D. G., & Morgenthaler, N. G. (2017). Vasopressin: physiology, assessment and osmosensation. *Journal of Internal Medicine*, 282(4), 284-97. https://doi.org/10.1111/joim.12645

Bankir, L., Fernandes, S., Bardoux, P., Bouby, N., & Bichet, D. G. (2005). Vasopressin-V2 receptor stimulation reduces sodium excretion in healthy humans. *Journal of the American Society of Nephrology*, 16(7), 1920-8. https://doi.org/10.1681/ASN.2004121079

Barnikol-Watanabe, S., GroB, N. A., Götz, H., Karabinos, A., Kratzin, H., Barnikol, H. U., Hilschmann, N., & Henkel, T. (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. *Biological Chemistry*, 375(8), 497-512. https://doi.org/10.1515/bchm3.1994.375.8.497

Barrett, M. O., Sesma, J. I., Ball, C. B., Jayasekara, P. S., Jacobson, K. A., Lazarowski, E. R., & Harden, T. K. (2013). A selective high-Affinity antagonist of the P2Y14 receptor inhibits udp-glucose-stimulated chemotaxis of human neutrophilss. *Molecular Pharmacology*, 84(1), 41-9. https://doi.org/10.1124/mol.113.085654

Bealer, S. L., Lipschitz, D. L., Ramoz, G., & Crowley, W. R. (2006). Oxytocin receptor binding in the hypothalamus during gestation in rats. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 291(1), R53-8. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00766.2005

Belt, J. A. (1983). Heterogeneity of nucleoside transport in mammalian cells. Two types of transport activity in L1210 and other cultured neoplastic cells. *Molecular Pharmacology*, 24(3), 479-84.

Ben-Barak, Y., Russell, J. T., Whitnall, M. H., Ozato, K., & Gainer, H. (1985). Neurophysin in the hypothalamo-neurohypophysial system. I. Production and characterization of monoclonal antibodies. *Journal of Neuroscience*, 5(1), 91-97. https://doi.org/10.1523/jneurosci.05-01-00081.1985

Bennett, G. C., Ford, A. P. D. W., Smith, J. A. M., Emmett, C. J., Webb, T. E., & Boarder, M. R. (2003). P2Y receptor regulation of cultured rat cerebral cortical cells: Calcium responses and mRNA expression in neurons and glia. *British Journal of Pharmacology*, 139(2), 279-288. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705242

Berkley, H. J. (1894). The finer anatomy of the infundibular region of the cerebrum including the pituitary gland. *Brain*, 17(4), 515-47. https://doi.org/10.1093/brain/17.4.515

Besada, P., Shin, D. H., Costanzi, S., Ko, H., Mathé, C., Gagneron, J., Gosselin, G., … Jacobson, K. A. (2006). Structure-activity relationships of uridine 5′-diphosphate analogues at the human P2Y6 receptor. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(18), 5532–5543 https://doi.org/10.1021/jm060485n

Biag, J., Huang, Y., Gou, L., Hintiryan, H., Askarinam, A., Hahn, J. D., Toga, A. W., & Dong, H. W. (2012). Cyto- and chemoarchitecture of the hypothalamic paraventricular nucleus in the C57BL/6J male mouse: A study of immunostaining and multiple fluorescent tract tracing. *Journal of Comparative Neurology*, 520(1),6-33. https://doi.org/10.1002/cne.22698

Bisset, G. W., & Chowdrey, H. S. (1988). Control of release of vasopressın by neuroendocrıne reflexes. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*, 73(6), 811-72. https://doi.org/10.1113/expphysiol.1988.sp003223

Björkstrand, E., Eriksson, M., & Uvnäs-Moberg, K. (1996). Evidence of a peripheral and a central effect of oxytocin on pancreatic hormone release in rats. *Neuroendocrinology*, 63(4), 377-80. https://doi.org/10.1159/000126978

Blevins, J. E., Schwartz, M. W., & Baskin, D. G. (2004). Evidence that paraventricular nucleus oxytocin neurons link hypothalamic leptin action to caudal brain stem nuclei controlling meal size. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 287(1), R87-96. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00604.2003

Bogdanov, Y. D., Wildman, S. S., Clements, M. P., King, B. F., & Burnstock, G. (1998). Molecular cloning and characterization of rat P2Y4 nucleotide receptor. *British Journal of Pharmacology*, 124(3), 428-30. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701880

Boone, M., & Deen, P. M. T. (2008). Physiology and pathophysiology of the vasopressin-regulated renal water reabsorption. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 456(6):1005-24. https://doi.org/10.1007/s00424-008-0498-1

Bourget, P. A., & Tremblay, G. C. (1972). Pyrimidine biosynthesis in rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 19(7), 1617-24. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1972.tb06207.x

Bourque, C. W. (2008). Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. *Nature Reviews Neuroscience* 9(7), 519-24. https://doi.org/10.1038/nrn2400

Bourque, C. W., & Oliet, S. H. R. (1997). Osmoreceptors in the central nervous system. Annual Review of Physiology 59, 601-19. https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.59.1.601

Bowater, R. P., & Gates, A. J. (2015). Nucleotides: Structure and Properties. *eLS*. 1-9. https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001333.pub3

Brailoiu, G. C., Dun, S. L., Brailoiu, E., Inan, S., Yang, J., Jaw, K. C., & Dun, N. J. (2007). Nesfatin-1: Distribution and interaction with a G protein-coupled receptor in the rat brain. *Endocrinology*, 148(10), 5088-94. https://doi.org/10.1210/en.2007-0701

Brake, A. J., Wagenbach, M. J., & Julius, D. (1994). New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature*, 371(6497), 519-23. https://doi.org/10.1038/371519a0

Broberger, C. (1999). Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) neurons: Histochemical relationship to thyrotropin-releasing hormone, melanin-concentrating hormone, orexin/hypocretin and neuropeptide Y. *Brain Research*, 848(1–2), 101-13. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01977-0

Brunschweiger, A., & Muller, C. (2006). P2 Receptors Activated by Uracil Nucleotides - An Update. *Current Medicinal Chemistry*, 13(3):289-312. https://doi.org/10.2174/092986706775476052

Buijs, R. M., & Swaab, D. F. (1979). Immuno-electron microscopical demonstration of vasopressin and oxytocin synapses in the limbic system of the rat. *Cell and Tissue Research*, 204(3), 355-365. https://doi.org/10.1007/BF00233648

Burbach, J. P. H., Luckman, S. M., Murphy, D., & Gainer, H. (2001). Gene regulation in the magnocellular hypothalamo-neurohypophysial system. *Physiological Reviews*, 81(3), 1197-267. https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.3.1197

Burnstock, G. (1976). Purinergic receptors. *Journal of Theoretical Biology*, 62(2), 491-503. https://doi.org/10.1016/0022-5193(76)90133-8

Burnstock, G. (2007). Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiological Reviews*, 87(2):659-797 https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2006

Burnstock, G. (2018). Purine and purinergic receptors. *Brain and Neuroscience Advances*, 6(2), . https://doi.org/10.1177/2398212818817494

Burnstock, G., & Kennedy, C. (1985). Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *General Pharmacology* 6(5):433-40. https://doi.org/10.1016/0306-3623(85)90001-1

Calker, D. van, Müller, M., & Hamprecht, B. (1979). Adenosıne regulates via two different types of receptors, the accumulatıon of cyclic AMP in cultured brain cells. *Journal of Neurochemistry*, 33(5) 999-1005. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1979.tb05236.x

Calvert, J. A., Atterbury-Thomas, A. E., Leon, C., Forsythe, I. D., Gachet, C., & Evans, R. J. (2004). Evidence for P2Y 1, P2Y 2, P2Y 6 and atypical UTP-sensitive receptors coupled to rises in intracellular calcium in mouse cultured superior cervical ganglion neurons and glia. *British Journal of Pharmacology*, 143(5), 525-32. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705959

Cansev, M. (2006). Uridine and cytidine in the brain: Their transport and utilization. *Brain Research Reviews*, 52(2):389-97. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2006.05.001

Cansev, M. (2008). Involvement of Uridine-Nucleotide-Stimulated P2Y Receptors in Neuronal Growth and Function. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*, 7(4), 223-229 https://doi.org/10.2174/187152407783220814

Cansev, M., & Wurtman, R. J. (2007). Chronic administration of docosahexaenoic acid or eicosapentaenoic acid, but not arachidonic acid, alone or in combination with uridine, increases brain phosphatide and synaptic protein

levels in gerbils. *Neuroscience*, 148(2), 421-31. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.06.016

Cansev, M., Orhan, F., Yaylagul, E. O., Isik, E., Turkyilmaz, M., Aydin, S., Gumus, A., Sevinc, C., Coskun, N., Ulus, I. H., & Wurtman, R. J. (2015). Evidence for the existence of pyrimidinergic transmission in rat brain. *Neuropharmacology*, 91, 77-86. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.12.019

Cansev, M., Watkins, C. J., Van Der Beek, E. M., & Wurtman, R. J. (2005). Oral uridine-5′-monophosphate (UMP) increases brain CDP-choline levels in gerbils. *Brain Research*, 1058(1–2), 101-8. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.07.054

Cao, D., & Pizzorno, G. (2004). Uridine phosphorylase: An important enzyme in pyrimidine metabolism and fluoropyrimidine activation. *Drugs of Today*, 40(5):431-43. https://doi.org/10.1358/dot.2004.40.5.850491

Cao, D., Leffert, J. J., McCabe, J., Kim, B., & Pizzorno, G. (2005). Abnormalities in uridine homeostatic regulation and pyrimidine nucleotide metabolism as a consequence of the deletion of the uridine phosphorylase gene. J*ournal of Biological Chemistry*, 280(22), 21169-75. https://doi.org/10.1074/jbc.M412343200

Cao, D., Ziemba, A., McCabe, J., Yan, R., Wan, L., Kim, B., Gach, M., Flynn, S., & Pizzorno, G. (2011). Differential expression of uridine phosphorylase in tumors contributes to an improved fluoropyrimidine therapeutic activity. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(12), 2330-9. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0202

Carter, R. L., Fricks, I. P., Barrett, M. O., Burianek, L. E., Zhou, Y., Ko, H., … Harden, T. K. (2009). Quantification of Gi-mediated inhibition of adenylyl cyclase activity reveals that UDP is a potent agonist of the human P2Y14 receptor. *Molecular Pharmacology*, 76(6), 1341-8. https://doi.org/10.1124/mol.109.058578

Castel, M., & Morris, J. F. (1988). The neurophysin-containing innervation of the forebrain of the mouse. *Neuroscience*, 24(3), 937-66. https://doi.org/10.1016/0306-4522(88)90078-4

Cera, N., Vargas-Cáceres, S., Oliveira, C., Monteiro, J., Branco, D., Pignatelli, D., & Rebelo, S. (2021). How Relevant is the Systemic Oxytocin Concentration for Human Sexual Behavior? *A Systematic Review. In Sexual Medicine* 9(4), 100370. https://doi.org/10.1016/j.esxm.2021.100370

Chambers, J. K., Macdonald, L. E., Sarau, H. M., Ames, R. S., Freeman, K., Foley, J. … Livi, G. P. (2000). A G protein-coupled receptor for UDP-glucose. *Journal of Biological Chemistry*, 275(15), 10767-71. https://doi.org/10.1074/jbc.275.15.10767

Chen, L., Rose, J. P., Breslow, E., Yang, D., Chang, W. R., Furey, W. F., Sax, M., & Wang, B. C. (1991). Crystal structure of a bovine neurophysin II dipeptide complex at 2.8 Å determined from the single-wavelength anomalous scattering signal of an incorporated iodine atom. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(10)4240-4. https://doi.org/10.1073/pnas.88.10.4240

Chhatriwala, M., Ravi, R. G., Patel, R. I., Boyer, J. L., Jacobson, K. A., & Harden, T. K. (2004). Induction of novel agonist selectivity for the ADP-activated P2Y

1 receptor versus the ADP-activated P2Y12 and P2Y 13 receptors by conformational constraint of an ADP analog. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 311(3), 10038-43. https://doi.org/10.1124/jpet.104.068650

Claybaugh, J. R., Sato, A. K., Crosswhite, L. K., & Hassell, L. H. (2000). Effects of time of day, gender, and menstrual cycle phase on the human response to a water load. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 279(3), R966-73 https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.279.3.r966

Communi, D., Gonzalez, N. S., Detheux, M., Brézillon, S., Lannoy, V., Parmentier, M., & Boeynaems, J. M. (2001). Identification of a Novel Human ADP Receptor Coupled to Gi. *Journal of Biological Chemistry*, 276(44), 41479-85https://doi.org/10.1074/jbc.M105912200

Communi, D., Govaerts, C., Parmentier, M., & Boeynaems, J. M. (1997). Cloning of a human purinergic P2Y receptor coupled to phospholipase C and adenylyl cyclase. *Journal of Biological Chemistry*, 272(51), 31969-73. https://doi.org/10.1074/jbc.272.51.31969

Communi, D., Motte, S., Boeynaems, J. M., & Pirotton, S. (1996). Pharmacological characterization of the human P(2Y4) receptor. *European Journal of Pharmacology*, 317(2–3), 383-9. https://doi.org/10.1016/S0014-2999(96)00740-6

Communi, D., Parmentier, M., & Boeynaems, J. M. (1996). Cloning, functional expression and tissue distribution of the human P2Y6 receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 222(2), 303-308. https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0739

Communi, D., Pirotton, S., Parmentier, M., & Boeynaems, J. M. (1995). Cloning and functional expression of a human uridine nucleotide receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 270(52), 30849-52. https://doi.org/10.1074/jbc.270.52.30849

Connolly, G. P., & Duley, J. A. (1999). Uridine and its nucleotides: Biological actions, therapeutic potentials. *Trends in Pharmacological Sciences*, 20(5):218-25. https://doi.org/10.1016/S0165-6147(99)01298-5

Conroy, S., Kindon, N., Kellam, B., & Stocks, M. J. (2016). Drug-like Antagonists of P2Y Receptors - From Lead Identification to Drug Development. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(22), 9981-10005 https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01972

Cornford, E. M., & Oldendorf, W. H. (1975). Independent blood-brain barrier transport systems for nucleic acid precursors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA),* 394(2), 211-19. https://doi.org/10.1016/0005-2736(75)90259-X

Costanzi, S., Santhosh Kumar, T., Balasubramanian, R., Kendall Harden, T., & Jacobson, K. A. (2012). Virtual screening leads to the discovery of novel non-nucleotide P2Y 1 receptor antagonists. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 20(17), 4254-61. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.06.044

Cram, J. P., Wu, J., Coover, R. A., Rizvi, T. A., Chaney, K. E., Ravindran, R., Cancelas, J. A., Spinner, R. J., & Ratner, N. (2022). P2RY14 cAMP signaling regulates Schwann cell precursor self-renewal, proliferation, and nerve tumor initiation in a mouse model of neurofibromatosis. *ELife*, 11, e73511. https://doi.org/10.7554/eLife.73511

Cruz-Mendoza, F., Jauregui-Huerta, F., Luquin, S., Aguilar-Delgadillo, A., & García-Estrada, J. (2022). Immediate Early Gene c-fos in the Brain: Focus on Glial Cells. *Brain Sciences*, 12(6):687 https://doi.org/10.3390/brainsci12060687

Curran, T., Miller, A. D., Zokas, L., & Verma, I. M. (1984). Viral and cellular fos proteins: A comparative analysis. *Cell*, 36(2), 259-68 https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90219-8

Çakır, A., & Kahveci, N. (2023). Üridinin nesfatin-1, oreksin-A ve leptin seviyeleri üzerine etkileri. *Health Care Academician Journal*, 10(3), 479-84. https://doi.org/10.52880/sagakaderg.1330855

Das, A., Ko, H., Burianek, L. E., Barrett, M. O., Harden, T. K., & Jacobson, K. A. (2010). Human P2Y14 receptor agonists: Truncation of the hexose moiety of uridine-5′-diphosphoglucose and its replacement with alkyl and aryl groups. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(1), 471-80. https://doi.org/10.1021/jm901432g

de Jong, T. R., & Neumann, I. D. (2018). Oxytocin and aggression. Current Topics in Behavioral *Neurosciences*, 35, 175-192. https://doi.org/10.1007/7854_2017_13

De Vries, G. J., Buijs, R. M., & Van Leeuwen, F. W. (1984). Sex Differences in Vasopressin and Other Neurotransmitter Systems in the Brain. *Progress in Brain Research*, 61, 185-203. https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)64435-0

Deng, Y., Wang, Z. V., Gordillo, R., An, Y., Zhang, C., Liang, Q., … Scherer, P. E. (2017). An adipo-biliary-uridine axis that regulates energy homeostasis. *Science*, 355(6330):eaaf5375. https://doi.org/10.1126/science.aaf5375

Dine, J., Ducourneau, V. R. R., Fénelon, V. S., Fossat, P., Amadio, A., Eder, M., Israel, J. M., Oliet, S. H. R., & Voisin, D. L. (2014). Extracellular signal-regulated kinase phosphorylation in forebrain neurones contributes to osmoregulatory mechanisms. *Journal of Physiology*, 592(7), 1637-54. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.261008

Den, Ouden., D.T., Meinders, A.E. (2005). Vasopressin: Physiology and clinical use in patients with vasodilatory shock: A review. In Netherlands Journal of Medicine, 63(1):4-13.

Dobolyi, A., Juhasz, G., Kovacs, Z., & Kardos, J. (2011). Uridine Function in the Central Nervous System. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11(8), 1058-67. https://doi.org/10.2174/156802611795347618

Dobolyi, A., Reichart, A., Szikra, T., Szilágyi, N., Kékesi, A.K., Karancsi, T., … Juhász G. (1998). Analysis of purine and pyrimidine bases, nucleosides and deoxynucleosides in brain microsamples (microdialysates and micropunches) and cerebrospinal fluid. *Neurochemistry International*, 32(3), 247-56. https://doi.org/10.1016/s0197-0186(97)00090-9

Dore, R., Levata, L., Lehnert, H., & Schulz, C. (2017). Nesfatin-1: Functions and physiology of a novel regulatory peptide. *Journal of Endocrinology*, 232(1):R45-R65. https://doi.org/10.1530/JOE-16-0361

dos Santos, K. M., Moraes, D. J. de A., da Silva, M. P., & Antunes, V. R. (2021). Exercise training rescues the electrical activity of liver-projecting DMNV neurones in response to oxytocin in spontaneously hypertensive rats.

Journal of Neuroendocrinology, 33(5), e12977 https://doi.org/10.1111/jne.12977

Douglas, A. J., Leng, G., & Russell, J. A. (2002). The importance of oxytocin mechanisms in the control of mouse parturition. *Reproduction*, 123(4), 543-52. https://doi.org/10.1530/rep.0.1230543

Douglas, A. J., Meeren, H. K. m., Johnstone, L. E., Pfaff, D. W., Russell, J. A., & Brooks, P. J. (1998). Stimulation of expression of the oxytocin gene in rat supraoptic neurons at parturition. *Brain Research*, 782(1–2), 167-74. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)01275-4

Ecke, D., Tulapurkar, M. E., Nahum, V., Fischer, B., & Reiser, G. (2006). Opposite diastereoselective activation of P2Y 1 and P2Y 11 nucleotide receptors by adenosine 5′-O-(α-boranotriphosphate) analogues. *British Journal of Pharmacology*, 149(4):416-23. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706887

Ekizceli, G., Halk, K.Z., Minbay, Z., & Eyigor, O. (2021). Nesfatin-1 and neuronostatin neurons are co-expressed with glucocorticoid receptors in the hypothalamus. *Biotechnic & Histochemistry*, 96(7), 555-561. https://doi.org/10.1080/10520295.2020.1832703

Elia, M. G., Muscella, A., Romano, S., Greco, S., Di Jeso, B., Verri, T., Storelli, C., & Marsigliante, S. (2005). Effects of extracellular nucleotides in the thyroid: P2Y2 receptor-mediated ERK1/2 activation and c-Fos induction in PC Cl3 cells. *Cellular Signalling*, 17(6), 739-49. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2004.10.013

Eliava, M., Melchior, M., Knobloch-Bollmann, H. S., Wahis, J., da Silva Gouveia, M., Tang, Y., … Grinevich, V. (2016). A New Population of Parvocellular Oxytocin Neurons Controlling Magnocellular Neuron Activity and Inflammatory Pain Processing. *Neuron*, 89(6), 1291-1304. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01.041

Ellis, B. J., Horn, A. J., Carter, C. S., van IJzendoorn, M. H., & Bakermans-Kranenburg, M. J. (2021). Developmental programming of oxytocin through variation in early-life stress: Four meta-analyses and a theoretical reinterpretation. *Clinical Psychology Review*, 86,101985 https://doi.org/10.1016/j.cpr.2021.101985

El-Tayeb, A., Qi, A., & Müller, C. E. (2006). Synthesis and structure-activity relationships of uracil nucleotide derivatives and analogues as agonists at human P2Y2, P2Y4, and P2Y6 receptors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(24), 7076-78. https://doi.org/10.1021/jm060848j

El-Tayeb, A., Qi, A., Nicholas, R. A., & Müller, C. E. (2011). Structural modifications of UMP, UDP, and UTP leading to subtype-selective agonists for P2Y2, P2Y4, and P2Y6 receptors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(8), 2878-90 https://doi.org/10.1021/jm1016297

Erb, L., Liao, Z., Seye, C. I., & Weisman, G. A. (2006). P2 receptors: Intracellular signaling. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* 452(5), 552-562. https://doi.org/10.1007/s00424-006-0069-2

Erlenbach, I., & Wess, J. (1998). Molecular basis of V2 vasopressin receptor/G(s) coupling selectivity. *Journal of Biological Chemistry*, 273(41), 26549-58. https://doi.org/10.1074/jbc.273.41.26549

Evans, J. J., Reid, R. A., Wakeman, S. A., Croft, L. B., & Benny, P. S. (2003). Evidence that oxytocin is a physiological component of LH regulation in

non-pregnant women. *Human Reproduction*, 18(7), 1428–1431. https://doi.org/10.1093/humrep/deg291

Eyigor, O., Coskun, C., Cavun, S., & Savci, V. (2012). Intravenous CDP-choline activates neurons in supraoptic and paraventricular nuclei and induces hormone secretion. Brain *Research Bulletin*, 87(2–3), 286-94. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.11.013

Fellmann, D., Bugnon, C., Bresson, J. L., Gouget, A., Cardot, J., Clavequin, M. C., & Hadjiyiassemis, M. (1984). The CRF neuron: Immunocytochemical study. *Peptides*, 5(suppl.1) 19-33. https://doi.org/10.1016/0196-9781(84)90261-4

Fenelon, V. S., Poulain, D. A., & Theodosis, D. T. (1993). Oxytocin neuron activation and fos expression: A quantitative immunocytochemical analysis of the effect of lactation, parturition, osmotic and cardiovascular stimulation. *Neuroscience*, 53(1), 77-89. https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90286-O

Filippov, A. K., Simon, J., Barnard, E. A., & Brown, D. A. (2003). Coupling of the nucleotide P2Y 4 receptor to neuronal ion channels. *British Journal of Pharmacology*, 138(2), 400-6. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705043

Fischman, A. J., & Moldow, R. L. (1984). In vivo potentiation of corticotropin releasing factor activity by vasopressin analogues. *Life Sciences*, 35(12), 1311-9. https://doi.org/10.1016/0024-3205(84)90103-6

Fitch, G. K., Patel, K. P., & Weiss, M. L. (2000). Activation of renal afferent pathways following furosemide treatment. I. Effects of survival time and renal denervation. *Brain Research*, 861(2), 363-76. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02048-5

Foo, K. S., 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. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.07.054

Fort, P., Salvert, D., Hanriot, L., Jego, S., Shimizu, H., Hashimoto, K., Mori, M., & Luppi, P. H. (2008). The satiety molecule nesfatin-1 is co-expressed with melanin concentrating hormone in tuberal hypothalamic neurons of the rat. *Neuroscience*, 155(1), 174-81. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.05.035

Fredholm, B. B., Ijzerman, A. P., Jacobson, K. A., Klotz, K. N., & Linden, J. (2001). International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacological Reviews*, 53(4):527-52.

Freeman, K., Tsui, P., Moore, D., Emson, P. C., Vawter, L., Naheed, S., … Chambers, J. K. (2001). Cloning, pharmacology, and tissue distribution of G-protein-coupled receptor GPR105 (KIAA0001) rodent orthologs. *Genomics*, 78(3), 124-28. https://doi.org/10.1006/geno.2001.6662

Fumagalli, M., Brambilla, R., D'Ambrosi, N., Volonté, C., Matteoli, M., Verderio, C., & Abbracchio, M. P. (2003). Nucleotide-mediated calcium signaling in rat cortical astrocytes: Role of P2X and P2Y receptors. *GLIA*, 43(3), 218-303. https://doi.org/10.1002/glia.10248

Fumagalli, M., Trincavelli, L., Lecca, D., Martini, C., Ciana, P., & Abbracchio, M. P. (2004). Cloning, pharmacological characterisation and distribution of the rat

G-protein-coupled P2Y13 receptor. *Biochemical Pharmacology*, 68(1), 113-124. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.02.038

Gainer, H. (2012). Cell-Type Specific Expression of Oxytocin and Vasopressin Genes: An Experimental Odyssey. *Journal of Neuroendocrinology* 24(4):528-38. https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02236.x

Galbally, M., Lewis, A. J., Ijzendoorn, M. Van, & Permezel, M. (2011). The role of oxytocin in mother-infant relations: A systematic review of human studies. Harvard *Review of Psychiatry,* 19(1), 1-14. https://doi.org/10.3109/10673229.2011.549771

Gallai, V., Mazzotta, G., Montesi, S., Sarchielli, P., & Del Gatto, F. (1992). Effects of uridine in the treatment of diabetic neuropathy: an electrophysiological study. *Acta Neurologica Scandinavica*, 86(1), 3-7. https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1992.tb08045.x

Gao, Z. G., Wei, Q., Jayasekara, M. P. S., & Jacobson, K. A. (2013). The role of P2Y14 and other P2Y receptors in degranulation of human LAD2 mast cells. *Purinergic Signalling*, 9(1), 31-40. https://doi.org/10.1007/s11302-012-9325-4

García-Galiano, D., Navarro, V. M., Gaytan, F., & Tena-Sempere, M. (2010). Expanding roles of NUCB2/nesfatin-1 in neuroendocrine regulation. *Journal of Molecular Endocrinology* 45(5), 281-90. https://doi.org/10.1677/JME-10-0059

García-Galiano, D., Navarro, V. M., Roa, J., Ruiz-Pino, F., Sánchez-Garrido, M. A., Pineda, R., … Tena-Sempere, M. (2010b). The anorexigenic neuropeptide, nesfatin-1, is indispensable for normal puberty onset in the female rat. Journal of *Neuroscience*, 30(23), 7783-92. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5828-09.2010

Geiger, A., & Yamasaki, S. (1956). Cytidine and uridine requirement of the brain. *Journal of Neurochemistry*, 1(2), 93-100. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1956.tb12059.x

Gillies, G. E., Linton, E. A., & Lowry, P. J. (1982). Corticotropin releasing activity of the new CRF is potentiated several times by vasopressin. *Nature*, 299(5881), 355-7. https://doi.org/10.1038/299355a0

Gimpl, G., & Fahrenholz, F. (2001). The oxytocin receptor system: Structure, function, and regulation. *Physiological Reviews*, 81(2), 629-8. https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.629

Ginsburg-Shmuel, T., Haas, M., Grbic, D., Arguin, G., Nadel, Y., … Fischer, B. (2012). UDP made a highly promising stable, potent, and selective P2Y6-receptor agonist upon introduction of a boranophosphate moiety. *Bioorganic and Medicinal Chemistry,* 20(18), 5483-95. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.07.042

Giovannelli, L., Shiromani, P. J., Jirikowski, G. F., & Bloom, F. E. (1990). Oxytocin neurons in the rat hypothalamus exhibit c-fos immunoreactivity upon osmotic stress. *Brain Research*, 531(1–2), 299-303. https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90789-E

Gizowski, C., Zaelzer, C., & Bourque, C. W. (2016). Clock-driven vasopressin neurotransmission mediates anticipatory thirst prior to sleep. *Nature*, 537(7622), 685-8. https://doi.org/10.1038/nature19756

Goebel, M., Stengel, A., Tache, Y., Sachs, G., & Lambrecht, N. W. (2009a). T1806 Fasting Decreases Nesfatin-1/NUCB2 Serum Levels in Rats. *Gastroenterology*, 136(5). https://doi.org/10.1016/s0016-5085(09)62687-1

Goebel, M., Stengel, A., Wang, L., Lambrecht, N. W. G., & Taché, Y. (2009b). Nesfatin-1 immunoreactivity in rat brain and spinal cord autonomic nuclei. *Neuroscience Letters*, 452(3), 241-6. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.01.064

Goebel-Stengel, M., & Wang, L. (2013). Central and Peripheral Expression and Distribution of NUCB2/nesfatin-1. *Current Pharmaceutical Design*, 9(39), 6935-40. https://doi.org/10.2174/13816128193931127124814

Goebel-Stengel, M., Wang, L., Stengel, A., & Taché, Y. (2011). Localization of nesfatin-1 neurons in the mouse brain and functional implication. *Brain Research*, 1396, 20-34. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.04.031

Golombek, D. A., & Rosenstein, R. E. (2010). Physiology of circadian entrainment. *Physiological Reviews*, 90(3), 1063-102. https://doi.org/10.1152/physrev.00009.2009

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). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015201

Gonzalez, R., Tiwari, A., & Unniappan, S. (2009). Pancreatic beta cells colocalize insulin and pronesfatin immunoreactivity in rodents. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 381(4), 643-648. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.02.104

Gorczyca, W., & Hardy, J. (1987). Arterial supply of the human anterior pituitary gland. *Neurosurgery*, 20(3), 369-78. https://doi.org/10.1227/00006123-198703000-00003

Gotoh, K., Masaki, T., Chiba, S., Ando, H., Shimasaki, T., Mitsutomi, K., … & Yoshimatsu, H. (2013). Nesfatin-1, corticotropin-releasing hormone, thyrotropin-releasing hormone, and neuronal histamine interact in the hypothalamus to regulate feeding behavior. *Journal of Neurochemistry*, 124(1), 90-9. https://doi.org/10.1111/jnc.12066

Gray, J. H., Owen, R. P., & Giacomini, K. M. (2004). The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* 447(5):728-34. https://doi.org/10.1007/s00424-003-1107-y

Greenhill, C. (2017). Metabolism: Liver and adipose tissue control uridine biosynthesis. *Nature Reviews Endocrinology* 13(5), 249 https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.38

Grill, H. J., & Hayes, M. R. (2012). Hindbrain neurons as an essential hub in the neuroanatomically distributed control of energy balance. *Cell Metabolism* 6(3):296-309. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.06.015

Grimble, G. K. (1994). Dietary nucleotides and gut mucosal defence. *Gut,* 35(1 Suppl), S46-51. https://doi.org/10.1136/gut.35.1_Suppl.S46

Grinevich, V., Knobloch-Bollmann, H. S., Eliava, M., Busnelli, M., & Chini, B. (2016). Assembling the Puzzle: Pathways of Oxytocin Signaling in the Brain. *Biological Psychiatry*, 79(3), 155-64 https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.04.013

Guillén-Gómez, E., Calbet, M., Casado, J., De Lecea, L., Soriano, E., Pastor-Anglada, M., & Burgaya, F. (2004). Distribution of CNT2 and ENT1

transcripts in rat brain: Selective decrease of CNT2 mRNA in the cerebral cortex of sleep-deprived rats. *Journal of Neurochemistry*, 90(4), 883-93. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02545.x

Guo, D., Von Kügelgen, I., Moro, S., Kim, Y. C., & Jacobson, K. A. (2002). Evidence for the recognition of non-nucleotide antagonists within the transmembrane domains of the human P2Y1 receptor. *Drug Development* Research, 57(4), 173-81. https://doi.org/10.1002/ddr.10145

Gündüz, D., Tanislav, C., Sedding, D., Parahuleva, M., Santoso, S., Troidl, C., Hamm, C. W., & Aslam, M. (2017). Uridine triphosphate thio analogues inhibit platelet P2Y12 receptor and aggregation. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 269. https://doi.org/10.3390/ijms18020269

Hajdarovic, K. H., Yu, D., & Webb, A. E. (2022). Understanding the aging hypothalamus, one cell at a time. *Trends in Neurosciences*, 45(12), 942-954. https://doi.org/10.1016/j.tins.2022.10.004

Hannibal, J., Mikkelseni, J. D., Fahrenkrug, J., & Larsen, P. J. (1995). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide gene expression in corticotropin-releasing factor-containing parvicellular neurons of the rat hypothalamic paraventricular nucleus is induced by colchicine, but not by adrenalectomy, acute osmotic, ether, or restraint stress. *Endocrinology*, 136(9), 4116-24136. https://doi.org/10.1210/endo.136.9.7649120

Harden, T. K., Sesma, J. I., Fricks, I. P., & Lazarowski, E. R. (2010). Signalling and pharmacological properties of the P2Y14 receptor. *Acta Physiologica* 199(2):149-60. https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2010.02116.x

Harris, G. W. (1951). Neural control of the pituitary gland i. the neurohypophysis. *British Medical Journal*, 2(4731), 559-564. https://doi.org/10.1136/bmj.2.4731.559

Hasan, M. T., Althammer, F., Silva da Gouveia, M., Goyon, S., Eliava, M., … Grinevich, V. (2019). A Fear Memory Engram and Its Plasticity in the Hypothalamic Oxytocin System. *Neuron*, 103(1), 133-46. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.04.029

Hashimoto, K., Murakami, K., Hattori, T., & Ota, Z. (1984). Synergistic interaction of corticotropin releasing factor and arginine vasopressin on adrenocorticotropin and cortisol secretion in Macaca fuscata. *Acta Medica Okayama*, 38(3), 261-7. https://doi.org/10.18926/AMO/30349.

Hatton, G. I. (2009). Magnocellular neurosecretory system: Organization, plasticity, model peptidergic neurons: *Encyclopedia of Neuroscience*. https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.01181-5

Hatton, G. I., Hutton, U. E., Hoblitzell, E. R., & Armstrong, W. E. (1976). Morphological evidence for two populations of magnocellular elements in the rat paraventriculat nucleus. *Brain Research*, 108(1), 187-93. https://doi.org/10.1016/0006-8993(76)90176-1

Hatton, G. I., Perlmutter, L. S., Salm, A. K., & Tweedle, C. D. (1984). Dynamic neuronal-glial interactions in hypothalamus and pituitary: Implications for control of hormone synthesis and release. *Peptides*, 5(1),121-38. https://doi.org/10.1016/0196-9781(84)90271-7

Hechler, B., Vigne, P., Léon, C., Breittmayer, J. P., Gachet, C., & Frelin, C. (1998). ATP derivatives are antagonists of the P2Y1 receptor: Similarities to the

platelet ADP receptor. *Molecular Pharmacology*, 53(4), 727-33. https://doi.org/10.1124/mol.53.4.727

Henricks, L. M., Jacobs, B. A. W., Meulendijks, D., Pluim, D., van den Broek, D., de Vries, N., … Schellens, J. H. M. (2018). Food-effect study on uracil and dihydrouracil plasma levels as marker for dihydropyrimidine dehydrogenase activity in human volunteers. British Journal of Clinical Pharmacology, 84(12), 2761-69. https://doi.org/10.1111/bcp.13719

Herman, J. P., Eyigor, O., Ziegler, D. R., & Jennes, L. (2000). Expression of ionotropic glutamate receptor subunit mRNAs in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 422(3), 352-62. https://doi.org/10.1002/1096-9861(20000703)422:3<352::AID-CNE3>3.0.CO;2-F

Herman, J. P., Schäfer, M. K. H., Watson, S. J., & Sherman, T. G. (1991). In situ hybridization analysis of arginine vasopressin gene transcription using intron-specific probes. *Molecular Endocrinology*, 5(10), 1447-56. https://doi.org/10.1210/mend-5-10-1447

Hernández-Díaz, Y., González-Castro, T. B., Tovilla-Zárate, C. A., López-Narváez, M. L., Genis-Mendoza, A. D., Castillo-Avila, R. G., … & Juárez-Rojop, I. E. (2021). Oxytocin levels in individuals with schizophrenia are high in cerebrospinal fluid but low in serum: A systematic review and meta-analysis: Oxytocin and Schizophrenia. *Metabolic Brain Disease*, 36(8), 2415-2424. https://doi.org/10.1007/s11011-021-00836-y

Hernando, F., Schoots, O., Lolait, S. J., & Burbach, J. P. H. (2001). Immunohistochemical localization of the vasopressin V1b receptor in the rat brain and pituitary gland: Anatomical support for its involvement in the central effects of vasopressin. Endocrinology, 142(4), 1659-68. https://doi.org/10.1210/endo.142.4.8067

Herrera, D. G., & Robertson, H. A. (1996). Activation of c-fos in the brain. *Progress in Neurobiology* 50(2-3), 83-107 https://doi.org/10.1016/S0301-0082(96)00021-4

Herschman, H. R. (1991). Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. *Annual Review of Biochemistry* 60, 281-319. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.60.070191.001433

Higuchi, T., & Okere, C. O. (2002). Role of the supraoptic nucleus in regulation of parturition and milk ejection revisited. *Microscopy Research and Technique*, 56(2), 113-21. https://doi.org/10.1002/jemt.10016

Higuchi, T., Tadokoro, Y., Honda, K., & Negoro, H. (1986). Detailed analysis of blood oxytocin levels during suckling and parturition in the rat. *Journal of Endocrinology*, 110(2), 251-6. https://doi.org/10.1677/joe.0.1100251

Hiruma, H., & Bourque, C. W. (1995). P2 purinoceptor-mediated depolarization of rat supraoptic neurosecretory cells in vitro. *The Journal of Physiology*, 489(3), 805-11. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1995.sp021093

Hoffman, G. E., Smith, M. S., & Verbalis, J. G. (1993). c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 14(3), 173-231. https://doi.org/10.1006/frne.1993.1006

Hogans, A. F., Guroff, G., & Udenfriend, S. (1971). Studies on the origin of pyrimidynes for biosynthesis of neural RNA in the rat. *Journal of*

Neurochemistry, 18(9), 1699-710. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1971.tb03744.x

Hollopeter, G., Jantzen, H. M., Vincent, D., Li, G., England, L., Ramakrishnan, V., Yang, R. B., … Conley, P. B. (2001). Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature*, 409(6817), 202-7. https://doi.org/10.1038/35051599

Honda, K., Sudo, A., & Ikeda, K. (2013). Oxytocin cells in the supraoptic nucleus receive excitatory synaptic inputs from the contralateral supraoptic and paraventricular nuclei in the lactating rat. *Journal of Reproduction and Development*, 59(6), 569-74. https://doi.org/10.1262/jrd.2013-053

Hosoya, Y., & Matsushita, M. (1980). Cells of origin of the descending afferents to the lateral hypothalamic area in the rat, studied with the horseradish peroxidase method. *Neuroscience Letters*, 18(3), 231-36. https://doi.org/10.1016/0304-3940(80)90290-6

Hou, M., Kendall Harden, T., Kuhn, C. M., Baldetorp, B., Lazarowski, E., Pendergast, W., … Erlinge, D. (2002). UDP acts as a growth factor for vascular smooth muscle cells by activation of P2Y6 receptors. American *Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 282(2), H784-92. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00997.2000

Houshmand, F., Faghihi, M., & Zahediasl, S. (2015). Role of Atrial Natriuretic Peptide in Oxytocin Induced Cardioprotection. *Heart Lung and Circulation*, 24(1), 86-93. https://doi.org/10.1016/j.hlc.2014.05.023

Hou-Yu, A., Lamme, A. T., Zimmerman, E. A., & Silverman, A. J. (1986). Comparative distribution of vasopressin and oxytocin neurons in the rat brain using a double-label procedure. *Neuroendocrinology*, 44(2), 235-46. https://doi.org/10.1159/000124651

Hung, L. W., Neuner, S., Polepalli, J. S., Beier, K. T., Wright, M., Walsh, J. J., … Malenka, R. C. (2017). Gating of social reward by oxytocin in the ventral tegmental area. *Science*, 357(6358), 1406-1411. https://doi.org/10.1126/science.aan4994

Hyeon Ahn, J., Shin, M. C., Park, J. H., Kim, I. H., Lee, J. C., Yan, B. C., … Won, M. H. (2015). Increased immunoreactivity of c-Fos in the spinal cord of the aged mouse and dog. *Molecular Medicine Reports*, 11(2), 1043-8. https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2800

Ignacio, I. L., & Wurtman, R. J. (1992). Enhancement by Cytidine of Membrane Phospholipid Synthesis. *Journal of Neurochemistry*, 59(1), 338-43. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb08909.x

Ingall, A. H., Dixon, J., Bailey, A., Coombs, M. E., Cox, D., McInally, J. I., … Tomlinson, W. (1999). Antagonists of the platelet P(2t) receptor: A novel approach to antithrombotic therapy. Journal of Medicinal Chemistry, 42(2), 213-20. https://doi.org/10.1021/jm981072s

Ishizuka, T., Wei, X., & Kubo, T. (1993). Cardiovascular effects of microinjections of thyrotropin-releasing hormone, oxytocin and other neuropeptides into the rostral ventrolateral medulla of the rat. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*, 322, 35-44.

Islam, M. T., Maejima, T., Matsui, A., & Mieda, M. (2022). Paraventricular hypothalamic vasopressin neurons induce self-grooming in mice. Molecular Brain, 15(1), 3871-3885.e4 https://doi.org/10.1186/s13041-022-00932-9

Ison, G., Beaver, J. A., McGuinn, W. D., Palmby, T. R., Dinin, J., Charlab, R., … Pazdur, R. (2016). FDA approval: Uridine triacetate for the treatment of patients following fluorouracil or capecitabine overdose or exhibiting early-onset severe toxicities following administration of these drugs. *Clinical Cancer Research*, 22(18), 4545-9. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0638

Itoi, K., Talukder, A. H., Fuse, T., Kaneko, T., Ozawa, R., Sato, T., Sugaya, T., Uchida, K., Yamazaki, M., Abe, M., Natsume, R., & Sakimura, K. (2014). Visualization of corticotropin-releasing factor neurons by fluorescent proteins in the mouse brain and characterization of labeled neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Endocrinology*, 155(10), 4054-60. https://doi.org/10.1210/en.2014-1182

Ivanov, A. A., Ko, H., Cosyn, L., Maddileti, S., Besada, P., Fricks, I., … Jacobson, K. A. (2007). Molecular modeling of the human P2Y2 receptor and design of a selective agonist, 2′-amino-2′-deoxy-2-thiouridine 5′-triphosphate. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(6), 1166-76. https://doi.org/10.1021/jm060903o

Iwasaki, Y., Maejima, Y., Suyama, S., Yoshida, M., Arai, T., Katsurada, K., … Yada, T. (2015). Peripheral oxytocin activates vagal afferent neurons to suppress feeding in normal and leptin-resistant mice: a route for ameliorating hyperphagia and obesity. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 308(5), 360-9. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00344.2014

Jacobson, K. A., Delicado, E. G., Gachet, C., Kennedy, C., von Kügelgen, I., Li, B., Miras-Portugal, M. T., … Müller, C. E. (2020). Update of P2Y receptor pharmacology: IUPHAR Review 27. *British Journal of Pharmacology* 177(11), 2413-33. https://doi.org/10.1111/bph.15005

Jacobson, K. A., Hoffmann, C., Kim, Y. C., Camaioni, E., Nandanan, E., Jang, S. Y., … Harden, T. K. (1999). Chapter 10 Molecular recognition in P2 receptors: Ligand development aided by molecular modeling and mutagenesis. *Progress in Brain Research*, 120, 119-132. https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)63550-5

Jahangard, L., Shayganfard, M., Ghiasi, F., Salehi, I., Haghighi, M., Ahmadpanah, M., … Brand, S. (2020). Serum oxytocin concentrations in current and recent suicide survivors are lower than in healthy controls. *Journal of Psychiatric Research*, 128, 75-82. https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2020.05.014

Janssens, R., Communi, D., Pirotton, S., Samson, M., Parmentier, M., & Boeynaems, J. M. (1996). Cloning and tissue distribution of the human P2Y1 receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 221(3), 588-93. https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0640

Jiménez, A., Young, L. J., Río, R. T. Del, Laprairie, J. L., & González-Mariscal, G. (2015). Neuroanatomical distribution of oxytocin receptor binding in the female rabbit forebrain: Variations across the reproductive cycle. *Brain Research*, 1629,329-39. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.10.043

Johnston, C. I. (1985). Vasopressin in circulatory control and hypertension. *Journal of Hypertension*, 3(6), 1920-8. https://doi.org/10.1097/00004872-198512000-00001

Jurek, B., & Neumann, I. D. (2018). The oxytocin receptor: From intracellular signaling to behavior. *Physiological Reviews*, 98(3), 1805-1908. https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2017

Kauffenstein, G., Hechler, B., Cazenave, J. P., & Gachet, C. (2004). Adenine triphosphate nucleotides are antagonists at the P2Y12 receptor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2(11), 1980-88. https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2004.00926.x

Kawano, H., & Daikoku, S. (1987). Functional topography of the rat hypothalamic dopamine neuron systems: Retrograde tracing and immunohistochemical study. *Journal of Comparative Neurology*, 265(2), 242-53. https://doi.org/10.1002/cne.902650208

Kawasaki, M., Ponzio, T. A., Yue, C., Fields, R. L., & Gainer, H. (2009). Neurotransmitter regulation of c-fos and vasopressin gene expression in the rat supraoptic nucleus. *Experimental Neurology*, 219(1), 212-22. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.05.019

Kawasaki, M., Yamaguchi, K., Saito, J., Ozaki, Y., Mera, T., Hashimoto, H., … Ueta, Y. (2005). Expression of immediate early genes and vasopressin heteronuclear RNA in the paraventricular and supraoptic nuclei of rats after acute osmotic stimulus. *Journal of Neuroendocrinology*, 17(4), 227-37. https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2005.01297.x

Kemp, P. A., Sugar, R. A., & Jackson, A. D. (2004). Nucleotide-mediated mucin secretion from differentiated human bronchial epithelial cells. American *Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 31(4), 446-55. https://doi.org/10.1165/rcmb.2003-0211OC

Kennedy, E. P., & Weiss, S. B. (1956). The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. The Journal of Biological Chemistry, 222(1). https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)50785-2

Kennedy, C., Qi, A.D., Herold, C.L., Harden, T.K., Nicholas, R.A., (2000). ATP, an agonist at the rat P2Y4 receptor, is an antagonist at the human P2Y4 receptor. *Molecular. Pharmacology*. 57(5), 926-31.

Kim, Y. C., Lee, J. S., Sak, K., Marteau, F., Mamedova, L., Boeynaems, J. M., & Jacobson, K. A. (2005). Synthesis of pyridoxal phosphate derivatives with antagonist activity at the P2Y13 receptor. *Biochemical Pharmacology*, 70(2):266-74. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.04.021

Kindon, N., Davis, A., Dougall, I., Dixon, J., Johnson, T., Walters, I., … Stocks, M. J. (2017). From UTP to AR-C118925, the discovery of a potent non nucleotide antagonist of the P2Y2 receptor. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* Letters, 27(21), 4849-53. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.09.043

King, A. E., Ackley, M. A., Cass, C. E., Young, J. D., & Baldwin, S. A. (2006). Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets. *Trends in Pharmacological Sciences* 27(8), 416-25. https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.06.004

Kingsbury, M. A., & Bilbo, S. D. (2019). The inflammatory event of birth: How oxytocin signaling may guide the development of the brain and gastrointestinal system. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 55, 100794. https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2019.100794

Klavdieva, M. M. (1995). The history of neuropeptides I. Frontiers in Neuroendocrinology, 16(4), 293-321.https://doi.org/10.1006/frne.1995.1011
Knepper, M. A., & Inoue, T. (1997). Regulation of aquaporin-2 water channel trafficking by vasopressin. *Current Opinion in Cell Biology*, 9(4), 560-4. https://doi.org/10.1016/S0955-0674(97)80034-8
Knigge, K. M., & Scott, D. E. (1970). Structure and function of the median eminence. *American Journal of Anatomy*, 129(2), 223-43 https://doi.org/10.1002/aja.1001290211
Knobloch, H. S., Charlet, A., Hoffmann, L. C., Eliava, M., Khrulev, S., Cetin, A. H., Osten, P., Schwarz, M. K., Seeburg, P. H., Stoop, R., & Grinevich, V. (2012). Evoked axonal oxytocin release in the central amygdala attenuates fear response. *Neuron*, 73(3), 553-66. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.11.030
Ko, H., Carter, R. L., Cosyn, L., Petrelli, R., de Castro, S., Besada, … Jacobson, K. A. (2008). Synthesis and potency of novel uracil nucleotides and derivatives as P2Y2 and P2Y6 receptor agonists. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 16(12), 6319-32. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.05.013
Ko, H., Fricks, I., Ivanov, A. A., Harden, T. K., & Jacobson, K. A. (2007). Structure-activity relationship of uridine 5′-diphosphoglucose analogues as agonists of the human P2Y14 receptor. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(9), 2030-39. https://doi.org/10.1021/jm061222w
Kocoglu, S. S., Oy, C., Halk, Z., Cakır, C., Minbay, Z., & Eyigor, O. (2022). Glutamate receptor antagonist suppresses the activation of nesfatin-1 neurons following refeeding or glucose administration. *Folia Morphologica*, 81(2), 379-86. https://doi.org/10.5603/FM.a2021.0034
Kohno, D., Nakata, M., Maejima, Y., Shimizu, H., Sedbazar, U., Yoshida, N., … Yada, T. (2008). Nesfatin-1 neurons in paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus coexpress oxytocin and vasopressin and are activated by refeeding. *Endocrinology*, 149(3), 1295-301. https://doi.org/10.1210/en.2007-1276
Korcok, J., Raimundo, L. N., Du, X., Sims, S. M., & Dixon, S. J. (2005). P2Y6 nucleotide receptors activate NF-κB and increase survival of osteoclasts. *Journal of Biological Chemistry*, 280(17), 16909-15. https://doi.org/10.1074/jbc.M410764200
Könczöl, K., Bodnár, I., Zelena, D., Pintér, O., Papp, R. S., Palkovits, M., … Tóth, Z. E. (2010). Nesfatin-1/NUCB2 may participate in the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats. *Neurochemistry International*, 57(3), 189-97. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.04.012
Könczöl, K., Pintér, O., Ferenczi, S., Varga, J., Kovács, K., Palkovits, M., … Tóth, Z. E. (2012). Nesfatin-1 exerts long-term effect on food intake and body temperature. *International Journal of Obesity*, 36(12),1514-21. https://doi.org/10.1038/ijo.2012.2
Kruk, M. R. (1991). Ethology and pharmacology of hypothalamic aggression in the rat. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 15(4), 527-38. https://doi.org/10.1016/S0149-7634(05)80144-7
Lacroix, S., Vallières, L., & Rivest, S. (1996). c-fos mRNA pattern and corticotropin-releasing factor neuronal activity throughout the brain of rats injected centrally with a prostaglandin of E2 type. Journal of

Neuroimmunology, 70(2), 163-79. https://doi.org/10.1016/S0165-5728(96)00114-2

Laguna-Abreu, M. T. C., Margatho, L., Germano, C. M. R., Antunes-Rodrigues, J., Elias, L. L. K., & De Castro, M. (2007). The effect of adrenalectomy on Fos expression in vasopressinergic and oxytocinergic neurons in response to stress in the rat. *Stress*, 10(4), 332-41. https://doi.org/10.1080/10253890701287614

Lara Aparicio, S. Y., Laureani Fierro, Á. de J., Aranda Abreu, G. E., Toledo Cárdenas, R., García Hernández, L. I., … Pérez Estudillo, C. A. (2022). Current Opinion on the Use of c-Fos in Neuroscience. *Neurosci*, 3(4), 687-702. https://doi.org/10.3390/neurosci3040050

Lazarowski, E. R., Boucher, R. C., & Harden, T. K. (2000). Constitutive release of ATP and evidence for major contribution of ecto-nucleotide pyrophosphatase and nucleoside diphosphokinase to extracellular nucleotide concentrations. *Journal of Biological Chemistry*, 275(40), 31061-8. https://doi.org/10.1074/jbc.M003255200

Lazarowski, E. R., Homolya, L., Boucher, R. C., & Harden, T. K. (1997). Direct demonstration of mechanically induced release of cellular UTP and its implication for uridine nucleotide receptor activation. *Journal of Biological Chemistry*, 272(39), 24348-54. https://doi.org/10.1074/jbc.272.39.24348

Le, T. T., Urasaki, Y., & Pizzorno, G. (2014). Uridine prevents fenofibrate-induced fatty liver. *PLoS ONE*, 9(1), 87179. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087179

Le, T. T., Ziemba, A., Urasaki, Y., Hayes, E., Brotman, S., & Pizzorno, G. (2013). Disruption of uridine homeostasis links liver pyrimidine metabolism to lipid accumulation. *Journal of Lipid Research*, 54(4), 1044-57. https://doi.org/10.1194/jlr.M034249

Lee, S. K., Ryu, P. D., & Lee, S. Y. (2013). Differential distributions of neuropeptides in hypothalamic paraventricular nucleus neurons projecting to the rostral ventrolateral medulla in the rat. *Neuroscience Letters*, 55, 155-65. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.09.070

Leng, G., Brown, C. H., Bull, P. M., Brown, D., Scullion, S., Currie, J., … Ludwig, M. (2001). Responses of magnocellular neurons to osmotic stimulation involves coactivation of excitatory and inhibitory input: An experimental and theoretical analysis. *Journal of Neuroscience*, 21(17), 6967-77. https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-17-06967.2001

Leng, G., Pineda, R., Sabatier, N., & Ludwig, M. (2015). 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The posterior pituitary, from Geoffrey Harris to our present understanding. *Journal of Endocrinology*, 226(2), T173-85. https://doi.org/10.1530/JOE-15-0087

Léon, C., Vial, C., Cazenave, J. P., & Gachet, C. (1996). Cloning and sequencing of a human cDNA encoding endothelial P2Y1 purinoceptor. *Gene*, 171(2), 295-97. https://doi.org/10.1016/0378-1119(96)00027-3

Livermore, A. H., & Du Vıgneaud, V. (1949). Preparation of high potency oxytocic material by the use of counter-current distribution. *The Journal of Biological Chemistry*, 180(1), 365-73. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)56752-1

Li, D., Liu, H., Liu, X., Wang, H., Li, T., Wang, X., Jia, S., Wang, P., & Wang, Y. F. (2020). Involvement of Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channel 3 in Oxytocin Neuronal Activity in Lactating Rats With Pup Deprivation. *ASN Neuro*, 12, 1759091420944658. https://doi.org/10.1177/1759091420944658

Li, D., Liu, X., Liu, H., Li, T., Jia, S., Wang, X., Wang, P., Qin, D., & Wang, Y. F. (2021). Key Roles of Cyclooxygenase 2-Protein Kinase A-Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated Channel 3 Pathway in the Regulation of Oxytocin Neuronal Activity in Lactating Rats with Intermittent Pup-Deprivation. *Neuroscience*, 452, 13-25. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.10.016

Li, J. Y., Boado, R. J., & Pardridge, W. M. (2001). Cloned blood-brain barrier adenosine transporter is identical to the rat concentrative Na+nucleoside cotransporter CNT2. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 21(8), 929-36. https://doi.org/10.1097/00004647-200108000-00005

Li, T., Jia, S. W., Hou, D., Liu, X., Li, D., Liu, Y., Cui, D., Wang, X., Hou, C., Brown, C. H., & Wang, Y. F. (2021). Intranasal Oxytocin Restores Maternal Behavior and Oxytocin Neuronal Activity in the Supraoptic Nucleus in Rat Dams with Cesarean Delivery. *Neuroscience*, 468, 235-46. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2021.06.020

Lipschitz, D. L., Crowley, W. R., & Bealer, S. L. (2003). Central blockade of oxytocin receptors during late gestation disrupts systemic release of oxytocin during suckling in rats. Journal of Neuroendocrinology, 15(8), 743-8. https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2003.01052.x

Liu, J., Sharma, N., Zheng, W., Ji, H., Tam, H., Wu, X., Manigrasso, M. B., Sandberg, K., & Verbalis, J. G. (2011). Sex differences in vasopressin V2 receptor expression and vasopressin-induced antidiuresis. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 300(2), 433-40. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00199.2010

Liu, N., Yang, H., Han, L., & Ma, M. (2022). Oxytocin in Women's Health and Disease. *Frontiers in Endocrinology* 13, 1-11. https://doi.org/10.3389/fendo.2022.786271

Lonods, C., Cooper, D. M. F., & Wolff, J. (1980). Subclasses of external adenosine receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(5 I), 2551-54. https://doi.org/10.1073/pnas.77.5.2551

Lu, H., Chen, C., & Klaassen, C. (2004). Tissue distribution of concentrative and equilibrative nucleoside transporters in male and female rats and mice. *Drug Metabolism and Disposition*, 32(12), 1455-61. https://doi.org/10.1124/dmd.104.001123

Luckman, S. M., Antonijevic, I., Leng, G., Dye, S., Douglas, A. J., Russell, J. A., & Bicknell, R. J. (1993). The Maintenance of Normal Parturition in the Rat Requires Neurohypophysial Oxytocin. *Journal of Neuroendocrinology*, 5(1), 7-12. https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.1993.tb00358.x

Lustig, K. D., Shiau, A. K., Brake, A. J., & Julius, D. (1993). Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(11), 5113-17. https://doi.org/10.1073/pnas.90.11.5113

Machida, K., Wakamatsu, S., Izumi, Y., Yosifovska, T., Matsuzaki, T., Nakayama, Y., Kohda, Y., Inoue, T., Saito, H., Tomita, K., & Nonoguchi, H. (2007). Downregulation of the V2 vasopressin receptor in dehydration: Mechanisms and role of renal prostaglandin synthesis. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 292(4), 1274-82. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00154.2006

Machluf, Y., Gutnick, A., & Levkowitz, G. (2011). Development of the zebrafish hypothalamus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1220(1), 93-105. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05945.x

Mack, S. O., Kc, P., Wu, M., Coleman, B. R., Tolentino-Silva, F. P., & Haxhiu, M. A. (2002). Paraventricular oxytocin neurons are involved in neural modulation of breathing. *Journal of Applied Physiology*, 92(2), 626-34. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00839.2001

Maejima, Y., Horita, S., Otsuka, A., Hidema, S., Nishimori, K., & Shimomura, K. (2020). Oral oxytocin delivery with proton pump inhibitor pretreatment decreases food intake. *Peptid*es, 128, 170312. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2020.170312

Maejima, Y., Sakuma, K., Santoso, P., Gantulga, D., Katsurada, K., Ueta, Y., … Yada, T. (2014). Oxytocinergic circuit from paraventricular and supraoptic nuclei to arcuate POMC neurons in hypothalamus. *FEBS Letters*, 588(23), 4404-12. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.10.010

Maejima, Y., Sedbazar, U., Suyama, S., Kohno, D., Onaka, T., Takano, E., … Yada, T. (2009). Nesfatin-1-Regulated Oxytocinergic Signaling in the Paraventricular Nucleus Causes Anorexia through a Leptin-Independent Melanocortin Pathway. *Cell Metabolism*, 10(5), 355-65. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.09.002

Mai, J. K., & Paxinos, G. (2012). The Human Nervous System. USA: Academic Press.

Makarenko, I. G., Ugrumov, M. V., Derer, P., & Calas, A. (2000). Projections from the hypothalamus to the posterior lobe in rats during ontogenesis: 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate tracing study. *Journal of Comparative Neurology*, 422(3), 327-37. https://doi.org/10.1002/1096-9861(20000703)422:3<327::AID-CNE1>3.0.CO;2-9

Mamedova, L. K., Joshi, B. V., Gao, Z. G., Von Kügelgen, I., & Jacobson, K. A. (2004). Diisothiocyanate derivatives as potent, insurmountable antagonists of P2Y6 nucleotide receptors. *Biochemical Pharmacology*, 67(9), 1763-70. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.01.011

Marteau, F., Le Poul, E., Communi, D., Communi, D., Labouret, C., Savi, P., … Gonzalez, N. S. (2003). Pharmacological characterization of the human P2Y13 receptor. *Molecular Pharmacology*, 64(1), 104-12. https://doi.org/10.1124/mol.64.1.104

Maruoka, H., Jayasekara, M. P. S., Barrett, M. O., Franklin, D. A., De Castro, S., Kim, N., … Jacobson, K. A. (2011). Pyrimidine nucleotides with 4-alkyloxyimino and terminal tetraphosphate δ-ester modifications as selective agonists of the P2Y4 receptor. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(12), 4018-33. https://doi.org/10.1021/jm101591j

McConn, B. R., Koskinen, A., Denbow, D. M., Gilbert, E. R., Siegel, P. B., & Cline, M. A. (2019). Central injection of oxytocin reduces food intake and affects hypothalamic and adipose tissue gene expression in chickens. *Domestic Animal Endocrinology*, 67, 11-20. https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2018.10.005

McEvilly, M., Popelas, C., & Tremmel, B. (2011). Use of uridine triacetate for the management of fluorouracil overdose. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 68(19) 1806-9. https://doi.org/10.2146/ajhp100434

Meis, S., Hamacher, A., Hongwiset, D., Marzian, C., Wiese, M., Eckstein, N., … Kassack, M. U. (2010). NF546 [4,4′-(carbonylbis(imino-3,1-phenylene-carbonylimino-3,1-(4- methyl-phenylene)-carbonylimino))-bis(1,3-xylene-α,α′- diphosphonic acid) tetrasodium salt] is a non-nucleotide P2Y11 agonist and stimulates release of interleukin-8 from human monocyte-derived dendritic cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 332(1), 238-47. https://doi.org/10.1124/jpet.109.157750

Melis, M. R., Argiolas, A., & Gessa, G. L. (1986). Oxytocin-induced penile erection and yawning: Site of action in the brain. *Brain Research*, 398(2), 259-65. https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)91485-X

Melmed, S. (2007). The pituitary fourth edıtıon: The Posterior Pituitary.USA: Academic Press

Michelini, L. C., Marcelo, M. C., Amico, J., & Morris, M. (2003). Oxytocinergic regulation of cardiovascular function: Studies in oxytocin-deficient mice. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 284(6), H2269-76. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00774.2002

Minbay, Z., & Eyigör, Ö. (2020). Oksitosin Nöronlarında Kainat Reseptör Alt Birimlerinin Sentezi: İmmünohistokimyasal Çalışma. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 46(3), 357-63. https://doi.org/10.32708/uutfd.823410

Minbay, F. Z., Eyigor, O., & Çavusoglu, I. (2006). Kainic acid activates oxytocinergic neurons through non-NMDA glutamate receptors. International Journal of Neuroscience, 116(5), 587-600. https://doi.org/10.1080/00207450600592123

Mironova, G. D., Khrenov, M. O., Talanov, E. Y., Glushkova, O. V., Parfenyuk, S. B., Novoselova, T. V., … Lemasters, J. J. (2018). The role of mitochondrial KATP channel in anti-inflammatory effects of uridine in endotoxemic mice. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 654, 70-76. https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.07.006

Miyata, S., Itoh, T., Lin, S. H., Ishiyama, M., Nakashima, T., & Kiyohara, T. (1995). Temporal changes of c-fos expression in oxytocinergic magnocellular neuroendocrine cells of the rat hypothalamus with restraint stress. *Brain Research Bulletin*, 37(4), 391-5. https://doi.org/10.1016/0361-9230(95)00017-8

Moore, D. J., Chambers, J. K., Wahlin, J. P., Tan, K. B., Moore, G. B., Jenkins, O., … Murdock, P. R. (2001). Expression pattern of human P2Y receptor subtypes: A quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction study. *Biochimica et Biophysica Acta Gene*, 1521(1–3), 107-19. https://doi.org/10.1016/S0167-4781(01)00291-3

Moore, D., Chambers, J., Waldvogel, H., Faull, R., & Emson, P. (2000). Regional and cellular distribution of the P2Y1 purinergic receptor in the human brain:

Striking nearonal localisation. *Journal of Comparative Neurology*, 421(3), 37484.https://doi.org/10.1002/(SICI)10969861(20000605)421:3<374::AID-CNE6>3.0.CO;2-Z

Morán-Jiménez, M. J., & Matute, C. (2000). Immunohistochemical localization of the P2Y1 purinergic receptor in neurons and glial cells of the central nervous system. *Molecular Brain Research*, 78(1–2), 50-8. https://doi.org/10.1016/S0169-328X(00)00067-X

Moreschi, I., Bruzzone, S., Bodrato, N., Usai, C., Guida, L., Nicholas, R. A., Kassack, M. U., Zocchi, E., & De Flora, A. (2008). NAADP+ is an agonist of the human P2Y11 purinergic receptor. *Cell Calcium*, 43(4), 344-55. https://doi.org/10.1016/j.ceca.2007.06.006

Moreschi, I., Bruzzone, S., Nicholas, R. A., Fruscione, F., Sturla, L., Benvenuto, F., … De Flora, A. (2006). Extracellular NAD+ Is an Agonist of the Human P2Y11 Purinergic Receptor in Human Granulocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 281(42), 31419-29. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)84054-1

Morgan, J. I., & Curran, T. (1991). Stimulus-transcription coupling in the nervous system: Involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annual Review of Neuroscience,* 14, 421-51 https://doi.org/10.1146/annurev.ne.14.030191.002225

Morris, G. E., Nelson, C. P., Brighton, P. J., Standen, N. B., John Challiss, R. A., & Willets, J. M. (2012). Arrestins 2 and 3 differentially regulate ET A and P2Y 2 receptor-mediated cell signaling and migration in arterial smooth muscle. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 302(5), 723-34. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00202.2011

Mouri, T., Itoi, K., Takahashi, K., Suda, T., Murakami, O., Yoshinaga, K., Andoh, N., Ohtani, H., Masuda, T., & Sasano, N. (1993). Colocalization of corticotropin- releasing factor and vasopressin in the paraventricular nucleus of the human hypothalamus. Neuroendocrinology, 57(1), 34-9. https://doi.org/10.1159/000126339

Munetomo, A., Ishii, H., Miyamoto, T., Sakuma, Y., & Kondo, Y. (2016). Puerperal and parental experiences alter rat preferences for pup odors via changes in the Oxytocin system. *Journal of Reproduction and Development*, 62(1), 17-27. https://doi.org/10.1262/jrd.2015-046

Murakami, H., Ohkura, A., Takanaga, H., Matsuo, H., Koyabu, N., Naito, M., … Sawada, Y. (2005). Functional characterization of adenosine transport across the BBB in mice. International Journal of Pharmaceutics, 290(1–2), 37-44. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.11.005

Muscella, A., Elia, M. G., Greco, S., Storelli, C., & Marsigliante, S. (2003). Activation of P2Y2 receptor induces c-FOS protein through a pathway involving mitogen-activated protein kinases and phosphoinositide 3-kinases in HeLa cells. *Journal of Cellular Physiology*, 195(2), 234-40. https://doi.org/10.1002/jcp.10242

Neumann, I., Douglas, A. J., Pittman, Q. J., Russell, J. A., & Landgraf, R. (1996). Oxytocin released within the supraoptic nucleus of the rat brain by positive feedback action is involved in parturition-related events. *Journal of Neuroendocrinology*, 8(3), 227-33. https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.1996.04557.x

Newman, S.W., Parfitt, D.B., Kollack-Walker, S. (1997). Mating-induced c-fos expression patterns complement and supplement observations after lesions in the male Syrian hamster brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 15(807), 239-59. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1997.tb51924.x

Nicholas, R.A., Watt, W.C., Lazarowski, E.R., Li, Q., Harden, K., 1996. Uridine nucleotide selectivity of three phospholipase C-activating P2 receptors: identification of a UDP- selective, a UTP-selective, and an ATP- and UTP-specific receptor. *Molecular Pharmacology*, 50, 224–229.

Niimi, M., Murao, K., & Taminato, T. (2001). Central administration of neuromedin U activates neurons in ventrobasal hypothalamus and brainstem. *Endocrine*, 16(3), 201-6. https://doi.org/10.1385/ENDO:16:3:201

Norman, A. W., Dean, M. C., & Henry, H. L. (2015) Hormones. London, England: Academic Press,

North, R. A. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological Reviews,* 82(4):1013-67. https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2002

Nükleotid. (2023, 15 Nisan). Erişim adresi: https://tr.wikipedia.org/wiki/N%C3%BCkleotit#/media/Dosya:Nucleotides.png

Oettl, L. L., Ravi, N., Schneider, M., Scheller, M. F., Schneider, P., Mitre, M., … Kelsch, W. (2016). Oxytocin Enhances Social Recognition by Modulating Cortical Control of Early Olfactory Processing. *Neuron*, 90(3), 609-21. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.03.033

Ogiso, K., Asakawa, A., Amitani, H., Nakahara, T., Ushikai, M., Haruta, I., … Inui, A. (2011). Plasma nesfatin-1 concentrations in restricting-type anorexia nervosa. *Peptides*, 32(1), 150-3. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.10.004

Ohbuchı, T., Haam, J., & Tasker, J. G. (2015). Regulation of Neuronal Activity in Hypothalamic Vasopressin Neurons. *Interdisciplinary Information Sciences*, 21(3), 225-234. https://doi.org/10.4036/iis.2015.b.07

Oh-I, S., Shimizu, H., Satoh, T., Okada, S., Adachi, S., Inoue, K., … Mori, M. (2006). Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature*, 443(7112):709-12.https://doi.org/10.1038/nature05162

Olszewski, P. K., Wirth, M. M., Shaw, T. J., Grace, M. K., Billington, C. J., Giraudo, S. Q., & Levine, A. S. (2001). Role of α-MSH in the regulation of consummatory behavior: Immunohistochemical evidence. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 281(2 50-2), 673-80. https://doi.org/10.1152/ajpregu.2001.281.2.r673

Ostrowski, N. L., Lolait, S. J., & Young, W. S. (1994). Cellular localization of vasopressin V1a receptor messenger ribonucleic acid in adult male rat brain, pineal, and brain vasculature. *Endocrinology*, 135(4), 1511-28. https://doi.org/10.1210/endo.135.4.7925112

Otero-Garcia, M., Martin-Sanchez, A., Fortes-Marco, L., Martínez-Ricós, J., Agustin-Pavón, C., Lanuza, E., & Martínez-García, F. (2014). Extending the socio-sexual brain: Arginine-vasopressin immunoreactive circuits in the telencephalon of mice. *Brain Structure and Function*, 219(3), 1055-81. https://doi.org/10.1007/s00429-013-0553-3

Pak, C. W., & Currás-Collazo, M. C. (2002). Expression and plasticity of glutamate receptors in the supraoptic nucleus of the hypothalamus. Microscopy Research and Technique, 56(2), 92-100. https://doi.org/10.1002/jemt.10017

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 https://doi.org/10.1016/j.npep.2011.12.002

Palmer, R. K., Boyer, J. L., Schachter, J. B., Nicholas, R. A., & Harden, T. K. (1998). Agonist action of adenosine triphosphates at the human P2Y1 receptor. *Molecular Pharmacology*, 54(6), 1118-23. https://doi.org/10.1124/mol.54.6.1118 Pan, W., Hsuchou, H., & Kastin, A. J. (2007). Nesfatin-1 crosses the blood-brain barrier without saturation. *Peptides*, 28(11), 2223-8. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.09.005

Pardo, V. G., Boland, R., & de Boland, A. R. (2006). 1α,25(OH)2-Vitamin D3 stimulates intestinal cell p38 MAPK activity and increases c-Fos expression. International Journal of *Biochemistry and Cell Biology*, 38(7), 1181-90. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.12.018

Parker, S. L., & Crowley, W. R. (1993). Stimulation of oxytocin release in the lactating rat by a central interaction of α 1-adrenergic and α-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid-sensitive excitatory amino acid mechanisms. *Endocrinology*, 133(6), 2855-60. https://doi.org/10.1210/endo.133.6.7694847

Parker, S. L., & Crowley, W. R. (1995). Central stimulation of oxytocin release in the lactating rat by N-methyl-D-aspartate: Requirement for coactivation through non-nmda glutamate receptors or the glycine coagonist site. *Neuroendocrinology*, 62(5), 467-78. https://doi.org/10.1159/000127036

Pasternack, S. M., Von Kügelgen, I., Aboud, K. Al, Lee, Y. A., Rüschendorf, F., Voss, K., … Betz, R. C. (2008). G protein-coupled receptor P2Y5 and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth. *Nature* Genetics, 40(3), 329-34. https://doi.org/10.1038/ng.84

Paxinos, G. (2015). The Rat Nervous System. USA:Elsevier.

Paxinos, G., & Watson C. (2007a). Atlas of the Developing Mouse Brain at E17.5, P0, and P6. USA:Elsevier.

Paxinos G., & Watson C. (2007b). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. USA:Academic Press

Peters, G. J., van Groeningen, C. J., Laurensse, E. J., Lankelma, J., Leyva, A., & Pinedo, H. M. (1987). Uridine-induced hypothermia in mice and rats in relation to plasma and tissue levels of uridine and its metabolites. Cancer Chemotherapy and *Pharmacology*, 20(2), 101-8. https://doi.org/10.1007/BF00253962

Petersson, M. (2002). Cardiovascular effects of oxytocin. *Progress in Brain Research*, 139, 281-8. https://doi.org/10.1016/S0079-6123(02)39024-1

Pizzorno, G., Cao, D., Leffert, J. J., Russell, R. L., Zhang, D., & Handschumacher, R. E. (2002). Homeostatic control of uridine and the role of uridine phosphorylase: A biological and clinical update. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Basis of Disease* 1587(2-3):133-44. https://doi.org/10.1016/S0925-4439(02)00076-5

Plessow, F., Marengi, D. A., Perry, S. K., & Lawson, E. A. (2021). Oxytocin Administration Increases Proactive Control in Men with Overweight or Obesity: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Crossover Study. *Obesity*, 29(1), 56-61. https://doi.org/10.1002/oby.23010

Plotsky, P. M. (1987). Regulation of Hypophysiotropic Factors Mediating ACTH Secretion. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 512(1), 205-17. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1987.tb24962.x

Plotsky, P. M., & Sawchenko, P. E. (1987). Hypophysial-portal plasma levels, median eminence content, and immunohistochemical staining of corticotropin-releasing factor, arginine vasopressin, and oxytocin after pharmacological adrenalectomy. *Endocrinology,* 120(4), 1361-9. https://doi.org/10.1210/endo-120-4-1361

Popa, G.T., & Fielding, U. (1933). Hypophysio-Portal Vessels and their Colloid Accompaniment. *Journal of Anatomy*, Anat. 67(Pt 2), 227-232.

Price, C. J., Hoyda, T. D., Samson, W. K., & Ferguson, A. V. (2008). Nesfatin-1 influences the excitability of paraventricular nucleus neurones. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(2):245-50. https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2007.01641.x

Price, T. O., Samson, W. K., Niehoff, M. L., & Banks, W. A. (2007). Permeability of the blood-brain barrier to a novel satiety molecule nesfatin-1. *Peptides*, 28(12):2372-81 https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.10.008

Qi, A. D., Zambon, A. C., Insel, P. A., & Nicholas, R. A. (2001). An arginine/glutamine difference at the juxtaposition of transmembrane domain 6 and the third extracellular loop contributes to the markedly different nucleotide selectivities of human and canine P2y11 receptors. *Molecular Pharmacology*, 60(6):1375-82.https://doi.org/10.1124/mol.60.6.1375

Qin, C., Li, J., & Tang, K. (2018). The paraventricular nucleus of the hypothalamus: Development, function, and human diseases. *Endocrinology*, 159(9), 3458-3472. https://doi.org/10.1210/en.2018-00453

Quintana, D. S., Rokicki, J., van der Meer, D., Alnæs, D., Kaufmann, T., Córdova-Palomera, A., Dieset, I., Andreassen, O. A., & Westlye, L. T. (2019). Oxytocin pathway gene networks in the human brain. *Nature Communications,* 10(1), 668.https://doi.org/10.1038/s41467-019-08503-8

Rafehi, M., Burbiel, J. C., Attah, I. Y., Abdelrahman, A., & Müller, C. E. (2017a). Synthesis, characterization, and in vitro evaluation of the selective P2Y2 receptor antagonist AR-C118925. *Purinergic Signalling*, 13(1):89-103. https://doi.org/10.1007/s11302-016-9542-3

Rafehi, M., Malik, E. M., Neumann, A., Abdelrahman, A., Hanck, T., Namasivayam, … Baqi, Y. (2017b). Development of Potent and Selective Antagonists for the UTP-Activated P2Y4 Receptor. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(7), 3020-3038. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00030

Rahmsdorf, H. J., Schönthal, A., Angel, P., Litfin, M., Rüther, U., & Herrlich, P. (1987). Posttranscriptional regulation of c-fos mRNA expression. *Nucleic Acids Research*, 15(4), 1643-59. https://doi.org/10.1093/nar/15.4.1643

Ralevic, V., & Burnstock, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. In Pharmacological Reviews 50(3):413-92. https://doi.org/10.1007/978-3-642-28863-0_5

Ramanjaneya, M., Chen, J., Brown, J. E., Tripathi, G., Hallschmid, M., Patel, S., … Randeva, H. S. (2010). Identification of nesfatin-1 in human and murine adipose tissue: A novel depot-specific adipokine with increased levels in obesity. *Endocrinology*, 151(7), 3169-89. https://doi.org/10.1210/en.2009-1358

Ramkisoensing, A., & Meijer, J. H. (2015). Synchronization of biological clock neurons by light and peripheral feedback systems promotes circadian rhythms and health. *Frontiers in Neurology* 5(6), 128. https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00128

Rash, J. A., Aguirre-Camacho, A., & Campbell, T. S. (2014). Oxytocin and pain: A systematic review and synthesis of findings. *Clinical Journal of Pain*, 30(5), 453-62. https://doi.org/10.1097/AJP.0b013e31829f57df

Redzic, Z. B., Biringer, J., Barnes, K., Baldwin, S. A., Al-Sarraf, H., Nicola, P. A., … Hladky, S. B. (2005). Polarized distribution of nucleoside transporters in rat brain endothelial and choroid plexus epithelial cells. *Journal of Neurochemistry*, 94(5), 1420-6. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03312.x

Redzic, Z. B., Malatiali, S. A., Grujicic, D., & Isakovic, A. J. (2010). Expression and functional activity of nucleoside transporters in human choroid plexus. *Cerebrospinal Fluid Research*, 7, 2. https://doi.org/10.1186/1743-8454-7-2

Reiner, S., Ziegler, N., Leon, C., Lorenz, K., Von Hayn, K., Gachet, C., … Hoffmann, C. (2009). β-Arrestin-2 interaction and internalization of the human P2Y 1 receptor are dependent on C-terminal phosphorylation sites. *Molecular Pharmacology*, 76(6), 789-803. https://doi.org/10.1124/mol.109.060467

Renn, W. H., & Rhoton, A. L. (1975). Microsurgical anatomy of the sellar region. Journal of *Neurosurgery*, 43(3), 288-298. https://doi.org/10.3171/jns.1975.43.3.0288

Rhodes, C. H., Morriell, J. I., & Pfaff, D. W. (1981). Immunohistochemical analysis of magnocellular elements in rat hypothalamus: Distribution and numbers of cells containing neurophysin, oxytocin, and vasopressin. *Journal of Comparative Neurology*, 198(1), 45-65. https://doi.org/10.1002/cne.901980106

Richardson, U. I., Watkins, C. J., Pierre, C., Ulus, I. H., & Wurtman, R. J. (2003). Stimulation of CDP-choline synthesis by uridine or cytidine in PC12 rat pheochromocytoma cells. *Brain Research*, 971(2), 161-7. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)02333-3

Rigney, N., de Vries, G. J., & Petrulis, A. (2023). Modulation of social behavior by distinct vasopressin sources. *Frontiers in Endocrinology*, 14, 1127792. https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1127792

Rigney, N., De Vries, G. J., Petrulis, A., & Young, L. J. (2022). Oxytocin, Vasopressin, and Social Behavior: From Neural Circuits to Clinical Opportunities. *Endocrinolog*, 163(9), bqac111. https://doi.org/10.1210/endocr/bqac111

Rimoldi, V., Reversi, A., Taverna, E., Rosa, P., Francolini, M., Cassoni, P., Parenti, M., & Chini, B. (2003). Oxytocin receptor elicits different EGFR/MAPK activation patterns depending on its localization in caveolin-1 enriched

domains. *Oncogene*, 22(38), 6054-60. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206612

Robben, J.H., Knoers, N.V., & Deen, P.M. (2004). Regulation of the vasopressin V2 receptor by vasopressin in polarized renal collecting duct cells. *Molecular Biology of the Cell*, 15(12), 5693-9. https://doi.org/10.1091/mbc.e04-04-0337

Roberts, M. M., Robinson, A. G., Fitzsimmons, M. D., Grant, F., Lee, W. Sen, & Hoffman, G. E. (1993). C-fos expression in vasopressin and oxytocin neurons reveals functional heterogeneity within magnocellular neurons. *Neuroendocrinology*, 57(3), 388-400. https://doi.org/10.1159/000126384

Robertson, G.S., Pfaus, J.G., Atkinson, L.J., Matsumura, H., Phillips, A.G., & Fibiger, H.C. (1991). Sexual behavior increases c-fos expression in the forebrain of the male rat. *Brain Research*, 564(2), 352-7. https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91477-i

Rodríguez, E. M., Blázquez, J. L., & Guerra, M. (2010). The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: The former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. *Peptides*, 31(4), 757-76. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.01.003

Rose, J. B., & Coe, I. R. (2008). Physiology of nucleoside transporters: Back to the future. *Physiology*, 23, 41-8, https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2007

Rusnak, M., Tóth, Z. E., House, S. B., & Gainer, H. (2007). Depolarization and neurotransmitter regulation of vasopressin gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Journal of Neuroscience*, 27(1). https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3739-06.2007

Ruthschilling, C. A., Albiero, G., Lazzari, V. M., Becker, R. O., de Moura, A. C., Lucion, A. … Giovenardi, M. (2012). Analysis of transcriptional levels of the oxytocin receptor in different areas of the central nervous system and behaviors in high and low licking rats. *Behavioural Brain Research*, 228(1), 176-84. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.12.005

Sabatier, N., Leng, G., & Menzies, J. (2013). Oxytocin, feeding, and satiety. *Frontiers in Endocrinology*, 4, 35. https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00035

Saha, R. N., & Dudek, S. M. (2013). Splitting Hares and Tortoises: A classification of neuronal immediate early gene transcription based on poised RNA polymerase II. *Neuroscience* 247, 175-81. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.04.064

Saito, R., Sonoda, S., Ueno, H., Motojima, Y., Yoshimura, M., Maruyama, T., … Ueta, Y. (2017). Involvement of central nesfatin-1 neurons on oxytocin-induced feeding suppression in rats. *Neuroscience Letters*, 655, 54-60. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.06.049

Salman, B. (2022). Merkezi yolla uygulanan üridin ve üridin nükleotidlerinin kardiyovasküler parametreler üzerine etkileri. [Yayınlanmamış uzmanlık tezi, Bursa uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi] Erişim adresi: https://uu245-211.uludag.edu.tr/handle/11452/33500

Samani, S. M., Ghasemi, H., Bookani, K. R., & Shokouhi, B. (2019). Serum nesfatin-1 level in healthy subjects with weight-related abnormalities and newly diagnosed patients with type 2 diabetes mellitus; a case-control study. *Acta Endocrinologica*, 15(1), 69-73. https://doi.org/10.4183/aeb.2019.69

Sato, K., Numata, T., Saito, T., Ueta, Y., & Okada, Y. (2011). V2 receptor-mediated autocrine role of somatodendritic release of AVP in rat vasopressin neurons under hypo-osmotic conditions. Science *Signaling,* 4(157), ra5. https://doi.org/10.1126/scisignal.2001279

Savci, V., Goktalay, G., Cansev, M., Cavun, S., Yilmaz, M. S., & Ulus, I. H. (2003). Intravenously injected CDP-choline increases blood pressure and reverses hypotension in haemorrhagic shock: Effect is mediated by central cholinergic activation. *European Journal of Pharmacology*, 468(2), 129-39. https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01602-9

Sawchenko, P. E., & Swanson, L. W. (1982). Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. J*ournal of Comparative Neurology*, 205(3), 260-72. https://doi.org/10.1002/cne.902050306

Sawchenko, P. E., Swanson, L. W., & Vale, W. W. (1984). Co-expression of corticotropin-releasing factor and vasopressin immunoreactivity in parvocellular neurosecretory neurons of the adrenalectomized rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(6),1883-87. https://doi.org/10.1073/pnas.81.6.1883

Schachter, J. B., & Harden, T. K. (1997). An examination of deoxyadenosine 5'(α-thio)triphosphate as a ligand to define P2Y receptors and its selectivity as a low potency partial agonist of the P2Y1 receptor. *British Journal of Pharmacology*, 121(2), 338-44. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701136

Schalla, M. A., & Stengel, A. (2018). Current understanding of the role of nesfatin-1. Journal of the Endocrine Society, 2(10), 1188-1206. https://doi.org/10.1210/js.2018-00246

Scharrer, E. (1928). Die Lichtempfindlichkeit Blinder Elritzen. (Untersuchungen Über das Zwischenhirn der Fische I.). *Zeitschrift Für Vergleichende Physiologie*, 7(1), 1-38. https://doi.org/10.1007/BF00341151

Scodelaro Bilbao, P., Boland, R., & Santillán, G. (2010). ATP modulates transcription factors through P2Y2 and P2Y4 receptors via PKC/MAPKs and PKC/Src pathways in MCF-7 cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 494(1), 7-14. https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.11.002

Sedbazar, U., Ayush, E. A., Maejima, Y., & Yada, T. (2014). Neuropeptide y and á-melanocyte-stimulating hormone reciprocally regulate nesfatin-1 neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *NeuroReport*, 25(18), 1453-8. https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000000293

Sergeeva, O. A., Klyuch, B. P., Fleischer, W., Eriksson, K. S., Korotkova, T. M., Siebler, M., & Haas, H. L. (2006). P2Y receptor-mediated excitation in the posterior hypothalamus. *European Journal of Neuroscience*, 24(5), 1413-26. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05027.x

Sesma, J. I., Kreda, S. M., Steinckwich-Besancon, N., Dang, H., García-Mata, R., Kendall Harden, T., & Lazarowski, E. R. (2012). The UDP-sugar-sensing P2Y14 receptor promotes Rho-mediated signaling and chemotaxis in human neutrophils. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 303(5), 490-498. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00138.2012

Shabalova, A. A., Liang, M., Zhong, J., Huang, Z., Tsuji, C., Shnayder, N. A., … Higashida, H. (2020). Oxytocin and CD38 in the paraventricular nucleus

play a critical role in paternal aggression in mice. *Hormones and Behavior*, 120, 104695. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2020.104695

Sharp, F. R., Sagar, S. M., Hicks, K., Lowenstein, D., & Hisanaga, K. (1991). c-fos mRNA, Fos, and Fos-related antigen induction by hypertonic saline and stress. *Journal of Neuroscience*, 11(8), 2321-31. https://doi.org/10.1523/jneurosci.11-08-02321.1991

Shaver, S. R., Rideout, J. L., Pendergast, W., Douglass, J. G., Brown, E. G., Boyer, J. L., … Yerxa, B. R. (2005). Structure-activity relationships of dinucleotides: Potent and selective agonists of P2Y receptors. *Purinergic Signalling*, 1(2), 183-91. https://doi.org/10.1007/s11302-005-0648-2

Shen, E., & Sun, X. (1995). Endogenous acetylcholine-induced Fos expression in magnocellular neurosecretory neurons in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus. *Neuroscience Letters*, 195(3), 191-4. https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)11816-F

Sherlock, D. A., Field, P. M., & Raisman, G. (1975). Retrograde transport of horseradish peroxidase in the magnocellular neurosecretory system of the rat. *Brain Research*, 88(3), 403-14. https://doi.org/10.1016/0006-8993(75)90653-8

Shimizu, H., Oh-I, S., Hashimoto, K., Nakata, M., Yamamoto, S., Yoshida, N., … Mori, M. (2009a). Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: The leptin-independent mechanism. *Endocrinology*, 150(2), 662-71. https://doi.org/10.1210/en.2008-0598

Shimizu, H., Oh-I, S., Okada, S., & Mori, M. (2009b). Nesfatin-1: An overview and future clinical application. *Endocrine Journal*, 56(4), 537-43. https://doi.org/10.1507/endocrj.K09E-117

Simmons, D. M., & Swanson, L. W. (2009). Comparison of the spatial distribution of seven types of neuroendocrine neurons in the rat paraventricular nucleus: Toward a global 3D model. *Journal of Comparative Neurology*, 516(5), 423-42. https://doi.org/10.1002/cne.22126

Simon, J., Webb, T. E., & Barnard, E. A. (1997). Distribution of [35S]dATPαS binding sites in the adult rat neuraxis. *Neuropharmacology*, 36(9), 1243-51. https://doi.org/10.1016/S0028-3908(97)00124-X

Skinner, J. A., Garg, M. L., Dayas, C. V., Fenton, S., & Burrows, T. L. (2018). Relationship between dietary intake and behaviors with oxytocin: A systematic review of studies in adults. *Nutrition Reviews*, 76(5), 303-31. https://doi.org/10.1093/nutrit/nux078

Smith, C. P. (2009). Mammalian urea transporters. *Experimental Physiology*, 94(2), 543-66. https://doi.org/10.1113/expphysiol.2008.043042

Smith, E. R., Smedberg, J. L., Rula, M. E., Hamilton, T. C., & Xu, X. X. (2001). Disassociation of MAPK Activation and c-Fos Expression in F9 Embryonic Carcinoma Cells following Retinoic Acid-induced Endoderm Differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(34), 32094-100. https://doi.org/10.1074/jbc.M105009200

Sofroniew, M. V. (1983). Morphology of Vasopressin and Oxytocin Neurones and Their Central and Vascular Projections. *Progress in Brain Research*, 60, 101-14. https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)64378-2

Song, X., Guo, W., Yu, Q., Liu, X., Xiang, Z., He, C., & Burnstock, G. (2011). Regional expression of P2Y4 receptors in the rat central nervous system.

Purinergic Signalling, 7(4), 469-88. https://doi.org/10.1007/s11302-011-9246-7

Song, Z., Gomes, D. A., & Stevens, W. (2009). Role of purinergic P2Y1 receptors in regulation of vasopressin and oxytocin secretion. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 297(2), 478-84. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00163.2009

Sonoda, T., & Tatibana, M. (1978). Metabolic fate of pyrimidines and purines in dietary nucleic acids ingested by mice. *BBA Section Nucleic Acids And Protein Synthesis*, 521(1), 55-66. https://doi.org/10.1016/0005-2787(78)90248-4

Spector, R. (1985). Uridine Transport and Metabolism in the Central Nervous System. *Journal of Neurochemistry*, 45(5), 1411-8. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1985.tb07207.x

Spector, R., & Berlinger, W. G. (1982). Localization and Mechanism of Thymidine Transport in the Central Nervous System. *Journal of Neurochemistry*, 39(3), 837-41. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1982.tb07968.x

Spector, R., & Huntoon, S. (1983). Deoxycytidine Transport and Metabolism in the Central Nervous System. *Journal of Neurochemistry*, 41(4), 1131-36. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1983.tb09062.x

Stachowiak, M. K., Sar, M., Tuominen, R. K., Jiang, H. K., An, S., Iadarola, M. J., Poisner, A. M., & Hong, J. S. (1990). Stimulation of adrenal medullary cells in vivo and in vitro induces expression of c-fos proto-oncogene. Oncogene, 5(1), 69-73.

Steculorum, S. M., Paeger, L., Bremser, S., Evers, N., Hinze, Y., Idzko, M., Kloppenburg, P., & Brüning, J. C. (2015). Hypothalamic UDP Increases in Obesity and Promotes Feeding via P2Y6-Dependent Activation of AgRP Neurons. *Cell*, 162(6), 1404-17. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.032

Steculorum, S. M., Timper, K., Engström Ruud, L., Evers, N., Paeger, L., Bremser, … Brüning, J. C. (2017). Inhibition of P2Y6 Signaling in AgRP Neurons Reduces Food Intake and Improves Systemic Insulin Sensitivity in Obesity. *Cell Reports*, 18(7), 1587-1597. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.047

Stengel, A., & Taché, Y. (2010). Nesfatin-1 Role as possible new potent regulator of food intake. Regulatory P*eptides*, 163(1-3), 18-23. https://doi.org/10.1016/j.regpep.2010.05.002

Stengel, A., Goebel, M., Wang, L., & Taché, Y. (2010). Ghrelin, des-acyl ghrelin and nesfatin-1 in gastric X/A-like cells: Role as regulators of food intake and body weight. *Peptides*, 31(2):357-69.https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.11.019

Stengel, A., Goebel, M., Wang, L., Rivier, J., Kobelt, P., Mönnikes, H., … Taché, Y. (2009a). 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. https://doi.org/10.1210/en.2009-0578

Stengel, A., Goebel, M., Yakubov, I., Wang, L., Witcher, D., Coskun, T., … Lambrecht, N. W. G. (2009b). Identification and characterization of nesfatin-1 immunoreactivity in endocrine cell types of the rat gastric oxyntic mucosa. *Endocrinology*, 150(1), 232-38. https://doi.org/10.1210/en.2008-0747

Summerlee, A. J. (1981). Extracellular recordings from oxytocin neurones during the expulsive phase of birth in unanaesthetized rats. *The Journal of Physiology*, 321(1), 1-9. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1981.sp013967

Sutin, J. (1966). The Periventricular Stratum of the Hypothalamus. *International Review of Neurobiology*, 9(C), 263-300. https://doi.org/10.1016/S0074-7742(08)60140-3

Swaab, D. F., Pool, C. W., & Nijveldt, F. (1975). Immunofluorescence of vasopressin and oxytocin in the rat hypothalamo-neurohypophyseal system. *Journal of Neural Transmission*, 36(3–4), 195-215. https://doi.org/10.1007/BF01253126

Swanson, L. W. (2000). Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. *Brain Research*, 886, (1–2), 113-164. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02905-X

Swanson, L. W., & Kuypers, H. G. J. M. (1980). The paraventricular nucleus of the hypothalamus: Cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *Journal of Comparative Neurology*, 194(3), 555-570. https://doi.org/10.1002/cne.901940306

Swanson, L. W., & Mogenson, G. J. (1981). Neural mechanisms for the functional coupling of autonomic, endocrine and somatomotor responses in adaptive behavior. *Brain Research Reviews*, 3(1), 1-34. https://doi.org/10.1016/0165-0173(81)90010-2

Swanson, L. W., & Sawchenko, P. E. (1980). Paraventricular nucleus: A site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. *Neuroendocrinology*, 31(6), 410-7. https://doi.org/10.1159/000123111

Swanson, L. W., Sawchenko, P. E., & Lind, R. W. (1986). Regulation of multiple peptides in CRF parvocellular neurosecretory neurons: Implications for the stress response. *Progress in Brain Research*, 68, 169-90. https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)60238-1

Tang, Y., Benusiglio, D., Lefevre, A., Hilfiger, L., Althammer, F., Bludau, A., … Grinevich, V. (2020). Social touch promotes interfemale communication via activation of parvocellular oxytocin neurons. *Nature Neuroscience*, 23(9), 1125-1137. https://doi.org/10.1038/s41593-020-0674-y

Tashima, Y., Kohda, Y., Nonoguchi, H., Ikebe, M., Machida, K., Star, R. A., & Tomita, K. (2001). Intranephron localization and regulation of the V1a vasopressin receptor during chronic metabolic acidosis and dehydration in rats. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 442(5), 652-61. https://doi.org/10.1007/s004240100590

Thrivikraman, K. V., Ying, S. U., & Plotsky, P. M. (1997). Patterns of Fos-immunoreactivity in the CNS induced by repeated hemorrhage in conscious rats: Correlations with pituitary-adrenal axis activity. *Stress*, 2(2), 145-158. https://doi.org/10.3109/10253899709014745

Tobin, V. A., Hashimoto, H., Wacker, D. W., Takayanagi, Y., Langnaese, K., Caquineau, C., … Ludwig, M. (2010). An intrinsic vasopressin system in the olfactory bulb is involved in social recognition. *Nature*, 464(7287), 413-7. https://doi.org/10.1038/nature08826

Tokuyama, Y., Hara, M., Jones, E. M. C., Fan, Z., & Bell, G. I. (1995). Cloning of rat and mouse P2Y purinoceptors. Biochemical and Biophysical Research Communications, 211(1), 211-8. https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1798

Tolentino, M., Palheta-Junior, R. C., Silva, C. M. S., Cavalcante, A. K. M., Quetz, J. da S., Havt, A., … Aguiar dos Santos, A. (2021). Role of cholecystokinin and oxytocin in slower gastric emptying induced by physical exercise in rats. *Physiology and Behavior*, 233, 113355. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2021.113355

Topal, G., Kafa, İ.M., Hasanoglu Akbulut, N., Coskun, C., Savcı, V., & Eyigor O. (2021). Activation of Nesfatin-1 Neurons by Cytidine-5'-diphosphate choline through Cholinergic Receptors. EMK2021: 1st International Microscopy and Spectroscopy Congress pp 101, Turkey.

Tribollet, E., Barberis, C., Dubois-Dauphin, M., & Dreifuss, J. J. (1992). Localization and characterization of binding sites for vasopressin and oxytocin in the brain of the guinea pig. *Brain Research*, 589(1),15-23. https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)91156-9

Tribollet, E., Charpak, S., Schmidt, A., Dubois-Dauphin, M., & Dreifuss, J. J. (1989). Appearance and transient expression of oxytocin receptors in fetal, infant, and peripubertal rat brain studied by autoradiography and electrophysiology. *Journal of Neuroscience*, 9(5), 1764-73. https://doi.org/10.1523/jneurosci.09-05-01764.1989

Trudel, E., & Bourque, C. W. (2010). Central clock excites vasopressin neurons by waking osmosensory afferents during late sleep. *Nature Neuroscience*, 13(4):467-74. https://doi.org/10.1038/nn.2503

Turner, R. A., Pierce, J. G., & Du Vigneaud, V. (1951). The purification and the amino acid content of vasopressin preparations. *The Journal of Biological Chemistry*, 191(1), 21-8. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)50947-9

Ullmann, H., Meis, S., Hongwiset, D., Marzian, C., Wiese, M., Nickel, P., Communi, D., Boeynaems, J. M., Wolf, C., Hausmann, R., Schmalzing, G., & Kassack, M. U. (2005). Synthesis and structure-activity relationships of suramin-derived P2Y11 receptor antagonists with nanomolar potency. *Journal of Medicinal Chemistry,* 48(22), 7040-8. https://doi.org/10.1021/jm050301p

Urasaki, Y., Pizzorno, G., & Le, T. T. (2014). Uridine affects liver protein glycosylation, insulin signaling, and heme biosynthesis. *PLoS ONE*, 9(6), e99728. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099728

Urasaki, Y., Pizzorno, G., & Le, T. T. (2016). Chronic Uridine Administration Induces Fatty Liver and Pre-Diabetic Conditions in Mice. *PLoS ONE*, 11(1), . e0146994. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146994

Valera, S., Hussy, N., Evans, R. J., Adami, N., North, R. A., Surprenant, A., & Buell, G. (1994). A new class of ligand-gated ion channel defined by P2X receptor for extracellular ATP. *Nature*, 371(6497), 516-19. https://doi.org/10.1038/371516a0

Van den Pol, A. N., & Trombley, P. Q. (1993). Glutamate neurons in hypothalamus regulate excitatory transmission. *Journal of Neuroscience*, 13(7), 2829-36.. https://doi.org/10.1523/jneurosci.13-07-02829.1993

Van Groeningen, G. J., Peters, G. J., Nadal, J. C., Laurensse, E., & Pinedo, H. M. (1991). Clinical and pharmacologic study of orally administrated uridine.

Journal of the National Cancer Institute, 83(6), 437-41. https://doi.org/10.1093/jnci/83.6.437

Vandesande, F., Dierickx, K., & De Mey, J. (1977). The origin of the vasopressinergic and oxytocinergic fibres of the external region of the median eminence of the rat hypophysis. *Cell and Tissue Research*, 180(4), 443-52. https://doi.org/10.1007/BF00220167

Verkhratsky, A., Zimmermann, H., Abbracchio, M. P., Illes, P., & DiVirgilio, F. (2020). In Memoriam Geoffrey Burnstock: Creator of Purinergic Signaling. *Function*, 1(1), zqaa006. https://doi.org/10.1093/function/zqaa006

Vijayalakshmi, D., & Belt, J. A. (1988). Sodium-dependent nucleoside transport in mouse intestinal epithelial cells. Two transport systems with differing substrate specificities. *Journal of Biological Chemistry*, 263(36), 19419-23. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)77649-2

Vincenzetti, S., Polzonetti, V., Micozzi, D., & Pucciarelli, S. (2016). Enzymology of Pyrimidine Metabolism and Neurodegeneration. Current Medicinal Chemistry, 23(14), 1408-31. https://doi.org/10.2174/0929867323666160411125803

Von Kugelgen, I., & Wetter, A. (2000). Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 362(4-5), 310-23. https://doi.org/10.1007/s002100000310

von Kügelgen, I. (2006). Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. Pharmacology and Therapeutics, 110(3):415-32. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.08.014

Wakerley, JB. (2006). Milk ejection and its control. In N., & D. Jimmy (Eds.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (pp. 3129-3190). Amsterdam:Elsevier.

Waldo, G. L., & Harden, T. K. (2004). Agonist Binding and Gq-Stimulating Activities of the Purified Human P2Y1 Receptor. *Molecular Pharmacology*, 65(2), 426-36. https://doi.org/10.1124/mol.65.2.426

Wang, P., Wang, S. C., Liu, X., Jia, S., Wang, X., Li, T., Yu, J., Parpura, V., & Wang, Y. F. (2022). Neural Functions of Hypothalamic Oxytocin and its Regulation. *ASN Neuro* 14, 17590914221100706. https://doi.org/10.1177/17590914221100706

Wang, P., Wang, S. C., Yang, H., Lv, C., Jia, S., Liu, X., Wang, X., Meng, D., Qin, D., Zhu, H., & Wang, Y. F. (2019). Therapeutic potential of oxytocin in atherosclerotic cardiovascular disease: Mechanisms and signaling pathways. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 454. https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00454

Wang, P., Yang, H. P., Tian, S., Wang, L., Wang, S. C., Zhang, F., & Wang, Y. F. (2015). Oxytocin-secreting system: A major part of the neuroendocrine center regulating immunologic activity. *Journal of Neuroimmunology*, 5, 289. https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2015.11.001

Webb, T. E., Simon, J., Krishek, B. J., Bateson, A. N., Smart, T. G., King, B. F., Burnstock, G., & Barnard, E. A. (1993). Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Letters*, 324(2), 219-25. https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81397-I

Weisman, G. A,. Camden, J.M., Peterson, T.S., Ajit, D., Woods, L.T., & Erb, L. (2012). P2 receptors for extracellular nucleotides in the central nervous

system: role of P2X7 and $P2Y_2$ receptor interactions in neuroinflammation. *Molecular Neurobiology*, 46(1), 96-113. https://doi.org/10.1007/s12035-012-8263-z

Wernecke, K., Lamprecht, I., Jöhren, O., Lehnert, H., & Schulz, C. (2014). Nesfatin-1 increases energy expenditure and reduces food intake in rats. *Obesity*, 22(7), 1662-8. https://doi.org/10.1002/oby.20736

Weyler, S., Baqi, Y., Hillmann, P., Kaulich, M., Hunder, A. M., Müller, I. A., & Müller, C. E. (2008). Combinatorial synthesis of anilinoanthraquinone derivatives and evaluation as non-nucleotide-derived P2Y2 receptor antagonists. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 18(1). https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.10.082

Whitnall, M. H., Mezey, E., & Gainer, H. (1985). Co-localization of corticotropin-releasing factor and vasopressin in median eminence neurosecretory vesicles. Nature, 317(6034), 248-50. https://doi.org/10.1038/317248a0

Wildman, S. S., Unwin, R. J., & King, B. F. (2003). Extended pharmacological profiles of rat P2Y 2 and rat P2Y 4 receptors and their sensitivity to extracellular H + and Zn 2+ ions. *British Journal of Pharmacology*, 140(7), 223-27. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705544

Winslow, J. T., & Insel, T. R. (2002). The social deficits of the oxytocin knockout mouse. *Neuropeptides*, 36(2–3), 221-9.. https://doi.org/10.1054/npep.2002.0909

Wirth, M. M., Olszewski, P. K., Yu, C., Levine, A. S., & Giraudo, S. Q. (2001). Paraventricular hypothalamic α-melanocyte-stimulating hormone and MTII reduce feeding without causing aversive effects. *Peptides*, 22(1), 129-34. https://doi.org/10.1016/S0196-9781(00)00367-3

Witt, D.M., & Insel, T.R. (1994). Increased Fos expression in oxytocin neurons following masculine sexual behavior. Neuroendocrinology, 6(1), 13-8. https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.1994.tb00549.x.

Wu, X., Gutierrez, M. M., & Giacomini, K. M. (1994). Further characterization of the sodium-dependent nucleoside transporter (N3) in choroid plexus from rabbit. BBA Biomembranes, 1191(1), 190-96. https://doi.org/10.1016/0005-2736(94)90248-8

Wu, X., Yuan, G., Brett, C. M., Hui, A. C., & Giacomini, K. M. (1992). Sodium-dependent nucleoside transport in choroid plexus from rabbit. Evidence for a single transporter for purine and pyrimidine nucleosides. *Journal of Biological Chemistry*, 267(13), 8813-18. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)50352-0

Wurtman, R. J., Regan, M., Ulus, I., & Yu, L. (2000). Effect of oral CDP-choline on plasma choline and uridine levels in humans. *Biochemical Pharmacology*, 60(7),989-992. https://doi.org/10.1016/S0006-2952(00)00436-6

Wurtman, R. J., Ulus, I. H., Cansev, M., Watkins, C. J., Wang, L., & Marzloff, G. (2006). Synaptic proteins and phospholipids are increased in gerbil brain by administering uridine plus docosahexaenoic acid orally. *Brain Research*, 1088(1), 83-92. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.03.019

Xie, Q., Li, L., & Kawada, S. (2000). Hypotension after coronary arterial occlusion induces regional expression of c-Fos protein in the rat brain. Annals of Thoracic and Cardiovascular Surgery. *Association of Thoracic and Cardiovascular Surgeons of Asia*, 6(5), 319-25.

Xu, P., Feng, X., Luan, H., Wang, J., Ge, R., Li, Z., & Bian, J. (2018). Current knowledge on the nucleotide agonists for the P2Y2 receptor. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 26(2):366-375. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.11.043

Yamamoto, T., Koyama, H., Kurajoh, M., Shoji, T., Tsutsumi, Z., & Moriwaki, Y. (2011). Biochemistry of uridine in plasma. *Clinica Chimica Acta*, 412(19–20), 1712-1724. https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.06.006

Yamamoto, T., Moriwaki, Y., Takahashi, S., Tsutsumi, Z., Yamakita, J. I., Nakano, T., & Higashino, K. (1999). Effect of glucose on the plasma concentration and urinary excretion of uridine and purine bases. Metabolism: Clinical and Experimental, 48(3):338-41. https://doi.org/10.1016/S0026-0495(99)90082-3

Yamamoto, T., Moriwaki, Y., Takahashi, S., Yamakita, J. I., Tsutsumi, Z., Ohata, H., Hiroishi, K., Nakano, T., & Higashino, K. (1997). Effect of ethanol and fructose on plasma uridine and purine bases. *Metabolism*, 6(5). https://doi.org/10.1016/S0026-0495(97)90192-X

Yang, H.-P., Wang, L., Han, L., & Wang, S. C. (2013). Nonsocial Functions of Hypothalamic Oxytocin. *ISRN Neuroscience*, 7, 2013, 179272. https://doi.org/10.1155/2013/179272

Yang, Z., Han, D., & Coote, J. H. (2009). Cardiac sympatho-excitatory action of PVN-spinal oxytocin neurones. *Autonomic Neuroscience*, 147(1–2), 80-5. https://doi.org/10.1016/j.autneu.2009.01.013

Yoshimura, M., Matsuura, T., Ohkubo, J., Maruyama, T., Ishikura, T., Hashimoto, H., … Ueta, Y. (2014). A role of nesfatin-1/NucB2 in dehydration-induced anorexia. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 307(2), 225-36. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00488.2013

Yoshimura, R., Kimura, T., Watanabe, D., & Kiyama, H. (1996). Differential expression of oxytocin receptor mRNA in the developing rat brain. *Neuroscience Research*, 24(3), 291-304. https://doi.org/10.1016/0168-0102(95)01003-3

Yosten, G. L. C., & Samson, W. K. (2009). Nesfatin-1 exerts cardiovascular actions in brain: Possible interaction with the central melanocortin system. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 297(2), R330-6. https://doi.org/10.1152/ajpregu.90867.2008

Yosten, G. L. C., & Samson, W. K. (2010). The anorexigenic and hypertensive effects of nesfatin-1 are reversed by pretreatment with an oxytocin receptor antagonist. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 298(6), 1642-7. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00804.2009

Yosten, G. L. C., Redlinger, L., & Samson, W. K. (2012). Evidence for a Role of Endogenous Nesfatin-1 in the Control of Water Drinking. *Journal of Neuroendocrinology*, 24(7), 1078-84. https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2012.02304.x

Young, W. S., Li, J., Wersinger, S. R., & Palkovits, M. (2006). The vasopressin 1b receptor is prominent in the hippocampal area CA2 where it is unaffected by restraint stress or adrenalectomy. *Neuroscience*, 143(4), 1031-9. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.08.040

Yurtseven, D. G., Kocoglu, S. S., Minbay, Z., & Eyigor, O. (2020). Immunohistochemical evidence for glutamatergic regulation of nesfatin-1 neurons in the rat hypothalamus. *Brain Sciences*, 10(9). https://doi.org/10.3390/brainsci10090630

Zhang, B., Qiu, L., Xiao, W., Ni, H., Chen, L., Wang, F., … Gao, Z. (2021). Reconstruction of the Hypothalamo-Neurohypophysial System and Functional Dissection of Magnocellular Oxytocin Neurons in the Brain. Neuron, 109(2), 331-346.e7. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.10.032

Zhang, Y. Y., Zhu, W. X., Cao, G. H., Cui, X. Y., & Ai, H. Bin. (2009). c-Fos expression in the supraoptic nucleus is the most intense during different durations of restraint water-immersion stress in the rat. *Journal of Physiological Sciences*, 59(5), 367-75. https://doi.org/10.1007/s12576-009-0044-8

Zhang, Y., Guo, S., Xie, C., & Fang, J. (2020). Uridine Metabolism and Its Role in Glucose, Lipid, and Amino Acid Homeostasis. *BioMed Research International*, 14(2020), 7091718. https://doi.org/10.1155/2020/7091718

Zhou, X. B., Lutz, S., Steffens, F., Korth, M., & Wieland, T. (2007). Oxytocin receptors differentially signal via Gq and G i proteins in pregnant and nonpregnant rat uterine myocytes: Implications for myometrial contractility. *Molecular Endocrinology*, 21(3), 21(3), 740-52. https://doi.org/10.1210/me.2006-0220

Zimmerman, C. A., Lin, Y. C., Leib, D. E., Guo, L., Huey, E. L., Daly, G. E., Chen, Y., & Knight, Z. A. (2016). Thirst neurons anticipate the homeostatic consequences of eating and drinking. *Nature*, 537(7622), 680-4. https://doi.org/10.1038/nature18950

Zingg, H. H., & Laporte, S. A. (2003). The oxytocin receptor. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 14(5), 222-7. https://doi.org/10.1016/S1043-2760(03)00080-8

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

3V	: 3. Ventrikül
ACTH	: AdrenokortikotropiK hormon
AgRP	: Agouti ilişkili peptit
AH	: Ön hipotalamus
AN	: Aksesuar çekirdek
ARC	: Arkuat çekirdek
AVP	: Arjinin vazopressin
BIAMY	: Bazolateral amigdala
BNTS	: Stria terminalisin yatak çekirdeği
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat (cAMP)
CART	: Kokain-amfetaminle düzenlenen transkript
CDP	: Sitozin difosfat (CDP)
CNT	: Konsantre edici nükleozid taşıyıcısı
CRF	: Kortikotropin salgılatıcı faktör
CRF	: Kortikotropin salıverici faktör
CRH	: Kortikotropin salgılayıcı hormon
CTP	: Sitozin trifosfat (CTP)
DAG	: Diaçilgliserol
DMH	: Dorsomedial hipotalamus
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPD	: Dihidropirimidin dehidrogenaz (DPD)
DZ	: Dendrtik zon
ENT	: Dengeleyici nükleozid taşıyıcısı
EW	: Edinger-Westphal çekirdek
GPRC	: G protein bağlı reseptör
HİP	: Hipokampus
HPA	: Hipotalamik-hipofiz-adrenal
IP3	: İnositol 1,4,5-trisfosfat
İ.p	: İntraperitoneal
İ.s.v.	: İntraserebroventriküler
KP	: Koroid pleksus (KP)
LH	: Lateral hipotalamusta
LS	: Lateral septum
MC3/4	: Melanocortin 3/4 reseptör (MC3/4)
MCH	: Melanin konsantre edici hormon (MCH)
MeA	: Amigdalanın medial çekirdeği
meAMY	: Medial amigdala
NAcc	: Çekirdek akumbens
NP II	: Nörofizin II
NTS	: Soliter Traktus Çekirdeği
NUCB2	: Nükleobindin 2
Ob	: Olfaktör bulbus
OK	: Optik kiyazma
OT	: Oksitosin
OTR	: Oksitosin reseptör

PAG : Periakuaduktal gri
PC : Prohormon dönüştürücüler
PCL : Fosfolipaz C
POA : Preoptik alan
POMC : Proopiomelanokortin
PVN : Paraventriküler çekirdek
RNA : Ribonükleik asit
ROb : Raphe obscurus
RPa : Raphe pallidus
SCN : Suprakiazmatik çekirdek
SON : Supraoptik çekirdek
Str : Striatum
SZ : Somatik zon
TRH : Tirotropin salgılayıcı hormon
UCK2 : Üridin/sitidin kinaz 2
UDP : Üridin difosfat
UMP : Üridin monofosfat
UPase : Üridin fosforilaz
UTP : Üridin trifosfat
VGL : Ventral glial lamina
VMH : Ventromedial çekirdeK
VP : Vazopressin
VP : Ventral pallidum
VTA : Ventral tegmental alan
α-MSH : α-melanosit uyarıcı hormon

8. EKLER

EK1

Deney Hayvanları Etik Kurul Onayı

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
Görükle Yerleşkesi, 16059 Nilüfer/ BURSA-TÜRKİYE
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN ADI	*Üridin ve üridin nükleotidlerinin nöroendokrin nöronlar üzerindeki aktive edici etkilerinin immünohistokimyasal olarak araştırılması*
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ KURUMU	Prof. Dr. Özhan EYİGÖR BUÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD
	YARDIMCI ARAŞTIRICILAR	Nursel HASANOĞLU AKBULUT
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Nursel HASANOĞLU AKBULUT'un Doktora Tez Projesi
	ARAŞTIRMANIN SÜRESİ	01 Kasım 2021 – 01 Kası 2023
	KULLANILACAK HAYVAN TÜRÜ VE SAYISI	150 Adet Erkek Sıçan

DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	**Belge Adı**	**Tarihi**
	ARAŞTIRMA BAŞVURU FORMU	**08.10.2021**

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No : 2021 - 13 / 09**	**Tarih : 12.10.2021**
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma projesi gerekçe, amaç ve yöntemler dikkate alınarak görüşüldü ve ilgili belgeler incelendi. Projenin etik açıdan uygun olduğuna, çalışmanın aşağıdaki hususlar dikkate alınarak yürütülmesine ve sorumlu araştırıcıya iletilmesine oy birliği/oy çokluğu ile karar verildi. 1) Projede herhangi bir değişiklik gerektiğinde kurulumuzdan onay alınması, 2) Projede çalışacağı bildirilen araştırıcılarda değişiklik olduğunda kurulumuzdan onay alınması, 3) Deney hayvanları üzerinde yapılacak girişimin başlangıç ve bitiş tarihinin bildirilmesi, 4) Çalışma süresinde tamamlanamaz ise ek süre talebinde bulunulması, 5) Çalışma tamamlandığında sonuç raporunun gönderilmesi.	

ÜYELER

Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	**Uzmanlık Dalı**	**Kurumu**	**İlişki (*)**	**İmza**		**Düşünceler**
				Kabul	**Ret**	
Prof. Dr. Gökhan GÖKTALAY Başkan	Tıp- Farmakoloji	Tıp Fakültesi	☐ E ■ H			
Prof. Dr. Erdoğan ŞENDEMİR Üye	Tıp- Anatomi	Tıp Fakültesi	☐ E ■ H			
Dr.Öğr. Üyesi Sezer ERER KAFA Üye	Tıp - Tıp Tarihi ve Etik	Tıp Fakültesi	☐ E ■ H			
Prof. Dr. Veli Yılgör ÇIRAK Üye	Veteriner-Parazitoloji	Veteriner Fakültesi	☐ E ■ H			
Prof. Dr. Özgür ÖZYİĞİT Üye	Veteriner-Patoloji	Veteriner Fakültesi	☐ E ■ H			
Prof. Dr. Aydın İPEK Üye	Ziraat- Zootekni	Ziraat Fakültesi	☐ E ■ H			
Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ Üye	Fen Edebiyat - Biyoloji	Fen Edebiyat Fakültesi	☐ E ■ H			
Asiye Işıl SEZER Üye	Sivil Toplum Kuruluş Üyesi	Diş Hekimi	☐ E ■ H			
Filiz TORUN Üye	Sivil Üye	Emekli	☐ E ■ H			
Faruk KÜÇÜKYILDIZ Üye	Veteriner Hekim	BUÜ-DEHYUAM	☐ E ■ H			

9. TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Özhan EYİGÖR' e;

Doktora eğitim sürecimdeki tüm emeklerinden dolayı Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı hocalarım Prof. Dr. Semiha ERSOY'a, Prof. Dr. Zehra MİNBAY'ya, Prof. Dr. İlkin ÇAVUŞOĞLU'na, Prof. Dr. Zeynep KAHVECİ'ye ve Prof. Dr. Berrin AVCI'ya ve Dr. Öğr. Üyesi Duygu GÖK YURTSEVEN'e;

Tez çalışmamın projelendirilmesinde destek olan ve bana laboratuvarını açan olan Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Mehmet CANSEV'e;

Tezim sırasında her zaman bana destek olan benimle beraber tezimde çalışan arkadaşlarım Uzman Dr. Berna SALMAN'a Arş. Gör. Cansu KOÇ'a, Doktora Öğrencisi Gonca TOPAL'a, Yüksek Lisans öğrencisi Nergis COŞKAN'a teşekkür ederim.

Son olarak beni yalnız bırakmayan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen canım annem ve babam'a, sevgili eşime ve tez yazımında birlikte geçireceğimiz zamanlarda fedakarlık yaparak beni bekleyen kızım Sera'ma çok teşekkür ediyorum.

10. ÖZGEÇMİŞ

. Lise öğrenimini Tuğlacılar Lisesinde tamamladı. 2010 yılında Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldu. 2013 yılında Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde yüksek lisansı tamamladı. 2015 yılında Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda ÖYP Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. 2017 yılında Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimini tamamladı. 2017 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı.