GONCA TOPAL

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANA BİLİM DALI DOKTORA TEZİ

2025

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANA BİLİM DALI

R-SPONDİN PEPTİTLERİNİ SENTEZLEYEN NÖRONLARDA BESLENMEYE BAĞLI NÖRONAL AKTİVASYON VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI VE GLUTAMATERJİK SİSTEMİN BU AKTİVASYONDAKİ ROLÜNÜN BELİRLENMESİ

GONCA TOPAL

(DOKTORA TEZİ)

BURSA-2025

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANA BİLİM DALI

R-SPONDİN PEPTİTLERİNİ SENTEZLEYEN NÖRONLARDA BESLENMEYE BAĞLI NÖRONAL AKTİVASYON VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI VE GLUTAMATERJİK SİSTEMİN BU AKTİVASYONDAKİ ROLÜNÜN BELİRLENMESİ

Gonca TOPAL

(DOKTORA TEZİ)

DANIŞMAN:
Prof. Dr. Özhan EYİGÖR

123S881- Tübitak

BURSA-2025

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum "**R-spondin peptitlerini sentezleyen nöronlarda beslenmeye bağlı nöronal aktivasyon varlığının araştırılması ve glutamaterjik sistemin bu aktivasyondaki rolünün belirlenmesi**" 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.

Gonca TOPAL
Tarih ve İmza

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

14/02/2025

Adı Soyadı: Gonca TOPAL
Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji AD.
Tez Konusu: R-spondin peptitlerini sentezleyen nöronlarda beslenmeye bağlı nöronal aktivasyon varlığının araştırılması ve glutamaterjik sistemin bu aktivasyondaki rolünün belirlenmesi

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

ETİK BEYAN……II
KANUL ONAY ..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU ..... **III**
İÇİNDEKİLER ..... **IV**
TÜRKÇE ÖZET ..... **VI**
İNGİLİZCE ÖZET ..... **VII**
TEZ KONUSUNUN KÜRESEL SÜRDÜRÜLEBİLİR KALKINMA HEDEFLERİ İLE İLİŞKİSİ ..... **VIII**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL BİLGİLER **6**
2.1. Besin Alımı 6
2.2. İştahın Merkezi Düzenlenmesi 7
2.3. Besin Alımında Rol Oynayan Peptitler 11
2.3.1. Oreksijenik peptitler 12
2.3.1.1. Oreksin 12
2.3.1.2. MCH (Melanin konsantre edici hormon) 13
2.3.1.3. Nöropeptit Y (NPY) 14
2.3.1.4. Agouti-ilişkili protein (AgRP) 15
2.3.1.5. Phoeniksin 16
2.3.2. Anoreksijenik peptitler 16
2.3.2.1. Kokain ve amfetamin-düzenleyici transkript (CART) 16
2.3.2.2. Melanokortinler 17
2.3.2.3. Kortikotropin salıverici faktör (CRF) 18
2.3.2.4. Glukagon-benzeri peptitler 18
2.3.2.5. Nesfatin-1 19
2.3.2.6. Nöronostatin 21
2.3.2.7. Speksin 22
2.4. RSPO 22
2.4.1. RSPO'ların keşfi ve yapısal özellikleri 22
2.4.2. RSPO'ların sinyal iletimi 23
2.4.3. RSPO proteinlerinin in vivo işlevleri 25
2.4.3.1. Üreme sistemi gelişimi 25
2.4.3.2. Anjiyogenez 27
2.4.3.3. İskelet gelişimi 28
2.4.3.4. Sindirim sistemleri ve solunum sistemi 29
2.4.4. RSPO1 ve RSPO3'ün beslenmeyi düzenleyen sistemlerle olan ilişkisi 30
2.5. Glutamat ve Glutamat Reseptörleri 33
2.5.1. İyonotropik glutamat reseptörleri (Ligand–kapılı iyon kanalları) 34
2.5.1.1. AMPA reseptörleri (GluA) 36
2.5.1.2. Kainat reseptörleri (GluK) 36
2.5.1.3. NMDA reseptörleri (GluN) 37
2.5.2. Glutamat, glutamat reseptörleri ve hipotalamus 38
2.5.3. Glutamaterjik sistem ve besin alımı 40
2.6. Nöronal Aktivasyon Belirteci c-Fos 41
3. GEREÇ VE YÖNTEM **44**

3.1. Deney Hayvanları 44
3.2. Deney Hayvanlarının Aydınlık-Karanlık Periyotlarının Değiştirilmesi 44
3.3. Deney Grupları 44
3.3.1. Özgün hedef 1'nin deney grupları 44
3.3.2. Özgün hedef 2'nin deney grupları 46
3.3.3. Özgün hedef 3'ün deney grupları 49
3.4. Çalışmada Kullanılan Doku, Teknik ve Antikorlar ile İlgili Genel Bilgiler 49
3.4.1. Perfüzyon fiksasyon ile dokuların eldesi.....49
3.4.2. İmmünohistokimyasal yöntemlerde uygulanan genel kurallar ve antikor optimizasyonu.....49
3.4.3. RSPO1 ve RSPO3 nöronlarında ortaya çıkan nöronal aktivasyonun belirlenmesi 53
3.4.3.1. RSPO1/c-fos ikili immünohistokimyasal işaretleme yöntemi.....54
3.4.3.2. RSPO3/c-fos ikili immünohistokimyasal işaretleme yöntemi.....55
3.4.3. RSPO1 ve RSPO3 nöronlarında eksprese edilen glutamat reseptör alt birim protein ekspresyonlarının gösterilmesi (Kainat için GLUK5; AMPA için GluA2; NMDA için GluN1) 56
3.4.3.1. RSPO1/Glutamat reseptör alt birim reseptörü immünofloresans işaretleme yöntemi.....57
3.4.3.2. RSPO3/Glutamat reseptör alt birim reseptörü immünofloresans işaretleme yöntemi.....58
3.5. Preparatların İncelenmesi ve İstatistiksel Analiz.....59
4. BULGULAR 60
4.1. RSPO1 Nöronlarının Aktivasyonunda Glutamat Reseptör Agonist ve Antagonistlerinin Etkisi 60
4.1.1. Supraoptik ve paraventriküler çekirdekte yerleşik RSPO1 nöronlarının aktivasyonunda kainik Asit ve CNQX'in etkisi 60
4.1.2. Supraoptik ve paraventriküler çekirdekte yerleşik RSPO1 nöronlarının aktivasyonunda AMPA ve CNQX'in etkisi 63
4.1.3. Supraoptik ve paraventriküler çekirdekte yerleşik RSPO1 nöronlarının aktivasyonunda NMDA ve MK-801'in etkisi 66
4.2. Rspo-1 Nöronlarının Besin ve/veya Glikoz Verilerek Uyarılması ve Bu Uyarımda Glutamat Antagonistlerinin Etkinliğinin Araştırılması.....69
4.2.1. Supraoptik ve paraventriküler çekirdekte yerleşik RSPO1 nöronlarının aktivasyonunda beslenme ve CNQX'in etkisi.....69
4.2.2. Supraoptik ve paraventriküler çekirdekte yerleşik RSPO1 nöronlarının aktivasyonunda glikoz enjeksiyonunun ve CNQX veya MK-801'in etkileri 72
4.3. RSPO3 Nöronlarının Aktivasyonunda Glutamat Reseptör Agonist ve Antagonistlerinin Etkisi 75
4.3.1. Supraoptik ve paraventriküler çekirdekte yerleşik RSPO3 nöronlarının aktivasyonunda kainik asit ve CNQX'in etkisi 75
4.3.2. Supraoptik ve paraventriküler çekirdekte yerleşik RSPO3 nöronlarının aktivasyonunda AMPA ve CNQX'in etkisi 78
4.3.3. Supraoptik ve paraventriküler çekirdekte yerleşik RSPO3 nöronlarının aktivasyonunda NMDA ve MK-801'in etkisi 81
4.4. RSPO3 Nöronlarının Besin ve/veya Glikoz Verilerek Uyarılması ve Bu Uyarılmada Glutamat Antagonistlerinin Etkinliğinin Araştırılması.....84
4.4.1. Supraoptik ve paraventriküler çekirdekte yerleşik RSPO3 nöronlarının

aktivasyonunda beslenme ve CNQX'in etkisi.....84
4.4.2. Supraoptik ve paraventriküler çekirdekte yerleşik RSPO3 nöronlarının aktivasyonunda glikoz enjeksiyonunun ve CNQX veya MK-801'in etkileri 87
4.5. RSPO1 Nöronlarında Glutamat Altbirim Reseptörleri Ekspresyonunun Araştırılması 92
4.5.1. RSPO1 nöronlarında kainat altbirim reseptörü GluK5 ekspresyonunun araştırılması 93
4.5.2. RSPO1 nöronlarında AMPA altbirim reseptörü GluR2 ekspresyonunun araştırılması 94
4.5.2. RSPO1 nöronlarında NMDA altbirim reseptörü NMDAR1 ekspresyonunun araştırılması 96
4.6. RSPO3 Nöronlarında Glutamat Altbirim Reseptörleri Ekspresyonunun Araştırılması 97
4.6.1. RSPO3 nöronlarında kainat altbirim reseptörü GluK5 ekspresyonunun araştırılması 97
4.6.2. RSPO3 nöronlarında AMPA altbirim reseptörü GluR2 ekspresyonunun araştırılması 99
4.6.3. RSPO3 nöronlarında NMDA altbirim reseptörü NMDAR1 ekspresyonunun araştırılması 101
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....103
5.1. RSPO1 ve RSPO3 Nöronlarının Hipotalamustaki Lokalizasyonları 103
5.2. RSPO1 ve RSPO3 Nöronlarının Regülasyonunda Glutamaterjik Sistemin Rolünün Araştırılması (Farklı Glutamat Reseptör Agonistlerinin -Kainik asit, AMPA ve NMDA- RSPO1 ve RSPO3 Nöronlarının Aktivasyonuna Olan Etkisinin Gösterilmesi) 104
5.3. RSPO1 ve RSPO3 Nöronlarının Fizyolojik Olarak Uyarılması ve Bu Uyarılmada Non NMDA Glutamat Antagonistinin (CNQX) Etkinliğinin Araştırılması 106
5.4. RSPO1 ve RSPO3 Nöronlarının Glikoz ile Uyarılması ve Bu Uyarılmada Glutamat Antagonistlerinin Etkinliğinin Araştırılması.....109
5.5. RSPO1 ve RSPO3 Nöronlarında Eksprese Edilen Glutamat Reseptör Alt Birim Protein Ekspresyonlarının Gösterilmesi (Kainat için GLUK5; AMPA için GluA2; NMDA için GluN1).....111
6. KAYNAKLAR.....115
7. SİMGELER VE KISALTMALAR 145
8. EKLER.....147
9. TEŞEKKÜR.....148
10. ÖZGEÇMİŞ 149

TÜRKÇE ÖZET

R-spondin sentezleyen nöronların anoreksijenik etkileri olduğu ve hipotalamusta eksprese edildiği rapor edilmiştir. R-spondin sentezleyen nöronların etki mekanizmalarını açıklayan çalışmalar mevcuttur ancak, RSPO1 ve RSPO3 nöronlarının regülasyonunda glutamaterjik sistemin rolünü açıklayan litaratür verisine rastlanmamıştır. Tez çalışmamızda; hipotalamusta lokalize birçok nöroendokrin nöronun aktivitesinin düzenlenmesinde rol alan ve eksitatör amino asit glutamatı nörotransmitter olarak kullanan glutamaterjik sistemin ve beslenme ya da glikoz enjeksiyonu gibi periferik bir faktörün RSPO1 ve RSPO3 nöronları üzerindeki etkilerinin gösterilmesi amaçlandı. Bu doğrultuda üç özgün hedef belirlendi. Özgün hedef 1: RSPO1 ve RSPO3 nöronlarının regülasyonunda glutamaterjik sistemin etkileri araştırıldı. Çalışmada hipotalamusun SON ve PVN'de lokalize RSPO1 ve RSPO3 nöronları incelendi ve aktivasyon belirteci olarak c-Fos kullanıldı. Glutamat agonist enjeksiyonları sonrasında aktive olan nöron sayısında anlamlı artış gözlenirken, her üç agonistin enjeksiyonlarından önce özgün antagonist uygulanması, her iki çekirdekte aktive olan RSPO1 ve RSPO3 nöron sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya yol açtı. Özgün hedef 2: Glutamaterjik sistemin R-spondin nöronlarının beslenme ya da glikoz verilerek uyarılması üzerindeki etkinliği araştırıldı. Beslenme ve ya glikoz enjeksiyonu sonrası aktive olan R-spondin pozitif nöronlar sayısında anlamlı artış gözlenirken, antagonistlerin bu artışı anlamlı olarak baskıladığı belirlendi. Özgün hedef 3 kapsamında ise ikili immünofloresans yöntemi kullanılarak RSPO1 ve RSPO3 nöronlarında glutamat altbirim reseptörlerinin varlığı araştırıldı. RSPO1 ve RSPO3 nöronlarının NMDA ve non-NMDA reseptör alt birimlerininin bir kısmını eksprese ettikleri gösterildi. Sonuç olarak, glutamat agonistleri, besin alımı ya da glikoz uygulaması gibi periferik ya da merkezi sinyallerin RSPO1 ve RSPO3 nöronlarını aktive ettiği ve bu aktivasyonda glutamaterjik sistemin etkin rol oynadığı düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: RSPO1, RSPO3, Glutamat, Hipotalamus, İmmunohistokimya, Nöronal Aktivasyon

İNGİLİZCE ÖZET

INVESTIGATION OF THE PRESENCE OF FOOD İNTAKE-RELATED NEURONAL ACTIVATION IN NEURONS SYNTHESIZING R-SPONDIN PEPTIDES AND DETERMINING THE ROLE OF THE GLUTAMATERGIC SYSTEM IN THIS ACTIVATION

It has been reported that neurons synthesizing R-spondin have anorexigenic effects and are expressed in the hypothalamus. There are studies explaining the mechanisms of action of neurons synthesizing R-spondin, however, no literature data explaining the role of the glutamatergic system in the regulation of RSPO1 and RSPO3 neurons has been found. In our thesis study, it was aimed to show the effects of the glutamatergic system, which plays a role in the regulation of the activity of many neuroendocrine neurons localized in the hypothalamus and uses the excitatory amino acid glutamate as a neurotransmitter, and the effects of a peripheral factor such as nutrition or glucose injection on RSPO1 and RSPO3 neurons. Three original targets were determined in this direction. Specific aim 1: The effects of the glutamatergic system on the regulation of RSPO1 and RSPO3 neurons were investigated. In the study, RSPO1 and RSPO3 neurons localized in the SON and PVN of the hypothalamus were examined and c-Fos was used as an activation marker. After glutamate agonist injections, a significant increase in the number of activated neurons was observed, while administration of the specific antagonist before injections of all three agonists led to a statistically significant decrease in the number of activated RSPO1 and RSPO3 neurons in both nuclei. Specific aim 2: The effectiveness of the glutamatergic system on physiological stimulation of R-spondin neurons by glucose administration was investigated. While a significant increase in the number of activated R-spondin neurons was observed after feeding and glucose injection, it was determined that the antagonists significantly suppressed this increase. Within the scope of specific aim 3, the presence of glutamate subunit receptors in RSPO1 and RSPO3 neurons was investigated using the dual immunofluorescence method. It was shown that RSPO1 and RSPO3 neurons express some of the NMDA and non-NMDA receptor subunits. In conclusion, it was thought that peripheral or central signals such as glutamate agonists, food intake or glucose administration activate RSPO1 and RSPO3 neurons and that the glutamatergic system plays an active role in this activation.

Keywords: RSPO1, RSPO3, Glutamate, Hypothalamus, Immunohistochemistry, Neuronal Activation

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



Doktora tezi olarak sunduğum **"R-spondin peptitlerini sentezleyen nöronlarda beslenmeye bağlı nöronal aktivasyon varlığının araştırılması ve glutamaterjik sistemin bu aktivasyondaki rolünün belirlenmesi"** başlıklı tez **3.** Küresel Sürdürülebilir Kalkınma Hedefleri ile ilişkilidir.

1. GİRİŞ

Besin alımı ve enerji metabolizması, organizmanın yaşamını sürdürmesinde temel ve yaşamsal bir süreçtir. Enerji homeostazı, beyin, mide ve adipoz doku arasındaki karşılıklı etkileşimleri kapsayan, karmaşık ve dinamik bir süreç olan, çeşitli peptitlerin ve hormonların rol oynadığı parasempatik ve sempatik sistem tarafından yönetilir. (Crespo, Cachero, Jimenez, Barrios & Ferreiro 2014). Bu düzenleyici mekanizma, vücudun beslenme, enerji ve çevresel durumu hakkında periferik ve merkezi oreksijenik veya anoreksijenik sinyaller yoluyla, hipotalamus tarafından sürekli olarak kontrol edilmektedir. Hipotalamus, besin alımı ile enerji harcaması arasındaki ilişkiyi düzenleyen, hipofiz hormonlarının endokrin kontrolü, termoregülasyon, kardiyovasküler fonksiyon, sıvı homeostazı ve sirkadiyen ritim gibi birçok homeostatik mekanizmayı kontrol eden 40'tan fazla farklı çekirdek içerir (Berthoud, 2002; Toni, Malaguti, Benfenati, & Martini 2004). Bu çekirdekler, MSS, otonom sinir sistemi ve endokrin sistem arasında bir iletişim merkezi sağlayarak yüksek oranda birbirine bağlıdır. Arkuat çekirdek (ARC), paraventriküler çekirdek (PVN), dorsamedial çekirdek (DMN), ventromedial çekirdek (VMH) ve lateral hipotalamik alan (LHA) da dahil olmak üzere çoğu hipotalamik çekirdek enerji homeostazı ve tokluğun modüle edilmesinde yer alır (Arora, & Anubhuti, 2006; Parker, & Bloom, 2012; Wynne, Stanley, McGowan, & Bloom ve ark., 2005; Yu, & Kim, 2012).

Memelilerde RSPO protein ailesi, RSPO1, RSPO2, RSPO3 ve RSPO4 olmak dört bağımsız üyeden oluşur (Kazanskaya ve ark., 2004; Kim ve ark., 2006; Nam ve ark., 2006). RSPO'lar cinsiyetin belirlenmesi ve uzuvların, akciğerlerin, plasentanın, böbreğin ve tırnakların gelişimi gibi çeşitli gelişimsel olaylarda yer alır (Aoki ve ark., 2007; Bell ve ark., 2008; Blaydon ve ark., 2006; Parma ve ark., 2006). RSPO1 ve RSPO3 böbrek progenitörlerini korumak için gerekli iken (Vidal ve ark., 2020) (Vidal ve ark., 2020) RSPO2 mutant farelerin uzuvlarda ve akciğerde ciddi malformasyonlar geliştiği kanıtlanmıştır (Bell ve ark., 2008). Ayrıca, son çalışmalar RSPO'ların tümör gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (He ve ark., 2023).

Lösin bakımından zengin tekrar içeren G-protein-bağlı reseptörler (LGRs) LGR4, LGR5 ve LGR6, RSPO1-4 proteinlerinin reseptörleri olarak tanımlanmıştır (Carmon, Gong, Lin, Thomas & Liu 2011; De Lau ve ark., 2011; Glinka ve ark., 2011; Gong ve

ark., 2012). RSPO'lar, bu reseptörlere bağlanarak Wnt/β-katenin sinyali ile hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını ve yetişkin kök hücre homeostazını düzenlerler (Carmon ve ark., 2011; De Lau ve ark., 2011; Glinka ve ark., 2011; Ruffner ve ark., 2012).

LGR4'ün, besin alımı ve enerji homeostazından sorumlu arkuat çekirdekte yüksek oranda eksprese edildiği gösterilmiştir (Li ve ark., 2005). LGR4 ve ligandları olan RSPO1 ve RSPO3'ün in situ hibridizasyon tekniği ile mRNA düzeyinde, besin alımının regülasyonunda rol oynayan arkuat çekirdek, ventromedial çekirdek ve median eminens'te eksprese edildiği gösterilmiştir (Li ve ark., 2014). Aynı araştırmada sıçanlara R-spondinlerin intraserebroventriküler (i.s.v.) olarak verilmesinin, anoreksijenik peptit olan pro-opiomelanokortin'in (POMC) mRNA ekspresyon düzeyinin arttığı gösterilmiştir (Li ve ark., 2014). Başka bir çalışmada, RSPO1'in i.s.v. enjeksiyonu sonrasında POMC nöronlarının c-Fos aktivasyonu gösterdiği tespit edilmiştir (Otsuka ve ark., 2019).

R-spondin protein ailesi, Wnt/β-katenin sinyalizasyonunu geliştiren, kök hücre büyümesi ve gelişiminde pleiotropik fonksiyonlara sahip bir protein grubu olarak tanımlanmış olmasına rağmen, son yapılan çalışmalarda bu peptitin besin alımını baskılayarak anoreksijenik etkide rol oynayabileceği ortaya konmuştur (Li ve ark., 2014). Sonraki çalışmalar bu bulguları doğrulamış ve yukarıda anlatıldığı üzere, RSPOs/LGR4 sinyalizasyonunun besin alımını düzenleyen hormonlar için yeni bir mekanizma olarak önerilmesine sebep olmuştur.

Glutamat, merkezi sinir sisteminde (MSS) çok çeşitli sistemlerin işleyişinde yer alır ve nöroendokrin sistemlerin düzenlenmesinde de önemli rolleri vardır (Brann, 1995; Brann, & Mahesh, 1994). Glutamat aracılı nörotransmisyon, iyonotropik ve metabotropik reseptörler üzerinden gerçekleşir (Niciu, Kelmendi, & Sanacora 2012; Ozawa, Kamiya, & Tsuzuki 1998). Glutamat reseptörleri membran proteinleridir ve hem eksitatör hem de inhibitör sinaptik iletişime aracılık ederler (Gereau, & Swanson, 2008). Hipotalamusta lokalize nöronların glutamaterjik innervasyonunun belirlenmesinin ardından (Van Den Pol, 1991; Van Den Pol, Wuarin, & Dudek 1990; Van Den Pol, & Trombley, 1993) glutamatın hipotalamus-hipofiziyal endokrin sistem aksındaki etkilerini araştırmaya yönelik çalışmalar artmıştır. Yapılan çalışmalarda glutamat agonistlerinin periferik ya da merkezi uygulamaları sonrasında ortaya çıkan

hormon salınımının artması veya azalması, deneklerdeki fizyolojik değişiklikler gibi son etkiler araştırılmış (Abbud, & Smith, 1991; Bisset, & Fairhall, 1996; Brann, & Mahesh, 1994; Crowley, Parker, Strong & Spinolo 1992) agonist ve antagonistlerin nöroendokrin nöronlar üzerindeki aktive edici etkileri (c-Fos ekspresyonu ile) incelenmiştir (MacDonald, Roberson, & Wilkinson 1990, 1993). Laboratuvarımızda yapılan bir çalışmada, anoreksijenik etki gösteren nesfatin-1 nöronlarının eksitatör nörotransmitter olarak glutamat agonistleri ile aktive oldukları ve nesfatin-1 nöronlarının iyonotropik glutamat reseptör alt birimlerini eksprese ettiği gösterilmiştir (Yurtseven, Kocoglu, Minbay, & Eyigor 2020). Laboratuvarımızda yapılan bir diğer bir çalışmada ise, anoreksijenik bir peptit olduğu bilinen nöronostatin nöronlarının glutamat agonistleri ile aktive oldukları (p-STAT ekspresyonu ile) ve nöronostatin nöronlarının iyonotropik glutamat reseptör alt birimlerinin bir kısmını eksprese ettiği gösterilmiştir (Kocoglu, Cakir, Minbay, & Eyigor 2020; Kocoglu, Yurtseven, Cakir, Minbay, & Eyigor 2022).

C-fos geni bir transkripsiyon faktörüdür ve c-Fos bu genin protein ürünüdür. c-Fos proteinin ekspresyonu ise nöronal aktivasyon belirteci olarak kullanılmaktadır (Hoffman, Smith, & Verbalis 1993; Sagar, Sharp, & Curran 1988). Yapılan çalışmalarla c-Fos ekspresyonu, in-situ hibridizasyon tekniği ile mRNA seviyesinde ya da immünohistokimyasal olarak protein düzeyinde belirlenebilir ve bu sayede aktive olan nöronların fonksiyonel anatomik haritalanmasına olanak sağlar. Nöron çekirdeğinde lokalize olan c-Fos proteini sayesinde, aktivasyon gösteren nöronun fenotipini belirlenebilir, herhangi bir sitoplazmik yapının kullanılmasıyla birlikte ikili immünohistokimyasal işaretleme yapılabilir (Eriksson, Ceccatelli, Uvnas-Moberg, Iadarola, & Hökfelt 1996). c-Fos proteinin bazal durumlarda ekspresyon düzeyleri minimal seviyede iken, belirli fizyolojik durumlar karşısında artar ve bu durumun belirlenmesiyle aktive olan sistem hakkında bilgi edinilebilir. Deneklere bir uyaran uygulandığında, uyaranı takip eden 60-90 dakika içerisinde hücrelerde c-Fos immünoreaktivitesi maksimum seviyeye ulaşır ve bu hücrelerin fonksiyonel anlamda aktivasyon gösterdikleri belirlenebilir.

R-spondin proteinleri (RSPO1-4), Wnt sinyal yollarının aktivasyonu yoluyla hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve erişkin kök hücrelerin idamesini düzenleyen LGR4 ve LGR5 reseptörleri için endojen ligandlar olarak tanımlanmış (Clevers, &

Nusse, 2012; Niehrs, 2012) olmasına rağmen LGR4'ün R-spondinlere bağlandıktan sonra Wnt/β-katenin sinyalleşmesini hangi hücre içi yolağı kullanarak yaptığı ise hala araştırılmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, besin alımı ve obeziteden lipid metabolizmasına kadar değişen alanlarda LGR4 ile enerji metabolizması arasında bir ilişki olduğunu da ortaya koymuştur. LGR4'ün ligandları olan RSPO1 ve RSPO3 peptitlerinin hipotalamusun enerji homeostatik alanlarındaki varlığı, hipotalamik anoreksijenik etileri kanıtlanmış nöronlar ile birlikte ko-lokalize olmaları, bu peptitlerin açlıkla down-regüle olup tokluk faktörü insülinle up-regüle olmaları gözönüne alındığında, anoreksijenik faktörler olarak enerji homeostazının regülasyonunda rol oynayabilecekleri söylenebilir. Dolayısıyla tez çalışmasında R-spondin peptitlerinden bu iki peptit, RSPO1 ve RSPO3, üzerine odaklanılmıştır. Bu bilgilerden yola çıkarak tez çalışması kapsamında kurduğumuz hipotez "RSPO peptitlerini sentezleyen ve salgılayan nöronlar fizyolojik tokluk veya glukoz yüklenmesi sonrası aktive olur ve bu aktivasyonda glutamaterjik sistem rol alır" şeklindedir. Bu hipotezi doğrulamak için belirlenen özgün hedefler aşağıdaki gibidir:

Özgün hedef 1: Glutamat agonist ve antagonistlerinin RSPO1 ve RSPO3'ü eksprese eden nöronlarda nöronal aktivasyona etkilerinin belirlenmesi. Bu hedefe yönelik gerçekleştirilecek çalışmalarda glutamat agonisti ve antagonisti uygulamalarını takiben nöronal aktivasyondaki değişimlerin c-Fos immünohistokimyası ile doku üzerinde ve hücresel düzeyde görsel verilerle gösterilmesi hedeflenmektedir.

Özgün hedef 2: R-spondin peptitlerini (RSPO1 ve RSPO3) eksprese eden hipotalamik nöronların açlık sonrası beslenme ile oluşan tokluk durumunda ya da yine açlık sonrası glikoz yüklenmesi gibi durumlarda fizyolojik olarak nöronal aktivasyon gösterdiklerinin ve bu aktivasyonda glutamaterjik antagonizmanın etkisinin belirlenmesi. Bu hedefe yönelik çalışmalarda 48 saatlik açlık sonrasında besin ve/veya glikoz verilmesiyle ortaya çıkması beklenen aktivasyonun ve bu aktivasyonda glutamat antagonistlerinin olası baskılayıcı etkilerinin nöronal aktivasyon belirteci c-Fos immünohistokimyasıyla hücresel düzeyde gösterilmesi hedeflenmektedir.

Özgün hedef 3: RSPO1 veya RSPO3 nöronlarında glutamat reseptör alt ünitelerinin ekspresyonlarının belirlenmesi. Bu hedefe yönelik çalışmalarda farklı glutamat reseptör ailelerine (AMPA, kainat veya NMDA reseptörleri) dair alt birim

proteinlerinin ikili immünofloresan tekniği ile bu nöronlarca sentezlendiğinin konfokal mikroskobik analizlerle gösterilmesi hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

Canlıların yaşamlarını sürdürmesi için gereken enerji, dışarıdan beslenme yoluyla alınan ya da vücutta depolanan protein, yağ ve karbonhidratların metabolize edilmesi ile sağlanır. Besin alımı, belirli aralıklarla günlük olarak gerçekleştirilen bir homeostaz mekanizmasıdır. Besin alımının kontrolü ve enerji homeostazisi, hipotalamus, sindirim sistemi ve adipoz doku arasındaki iletişim tarafından sağlanır ve bu süreç, çeşitli peptitlerin, hormonların rol oynadığı sempatik ve parasempatik sistemden oluşan bir ağ tarafından yönetilmektedir (Crespo ve ark., 2014).

2.1. Besin Alımı

Besin alımı ve enerji metabolizması vücut ağırlığının korunmasında temel düzenleyicilerdir. Biyolojik ve klinik kanıtlar, vücut ağırlığının tamamen istemli kontrol altında olduğu varsayımıyla çelişen genlerin ve çevresel faktörlerin karmaşık bir etkileşimini ortaya koymaktadır. Bu bağlamda, MSS organizmanın metabolik homeostazının algılanması ve kontrolünde çok önemli bir rol oynamaktadır. Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları, vücut kitle indeksi ile ilişkili genlerin çoğunun MSS'de, birçoğunun da hipotalamusta ifade edildiğini ortaya koymaktadır (Locke ve ark., 2015; Rohde ve ark., 2019; Speliotes ve ark., 2010) Hipotalamus ve beyin sapı, beslenme davranışlarını düzenlemek için periferden ve diğer beyin bölgelerinden gelen sinirsel ve hormonal sinyalleri entegre eder (Cummings, & Overduin, 2007). Hormonal, nöronal ve metabolik uyarımların davranışsal ve bilişsel uyaranlarla entegrasyonu, besin alımı döngüsünü düzenler (Strubbe, & Woods, 2004).

Ancak, insanlar yalnızca homeostatik sinyallere yanıt olarak değil, aynı zamanda psikolojik ve sosyo-kültürel yönlerle ilgili diğer nedenlerle de beslenme davranışı gösterirler (Blundell ve ark., 2010). Tüm bu bilgilerin entegrasyonu insanların, neyi ne zaman ve ne kadar yediğini belirler. Besin alımı döngüsü aşamaları açlık, doygunluk ve tokluktur (J. E. Blundell, & Halford, 1994). Açlık, yeme isteğidir ve midede rahatsız edici bir boşluk olarak tanımlanır (Cannon, & Washburn, 1993). Doygunluk, öğünün sonlanmasıyla sonuçlanan dolgunluk hissini ifade eder. Tokluk, bir sonraki öğünün zamanlamasını belirleyen yemek sonrası olaylara verilen terimdir (Cummings, & Overduin, 2007). Doygunluk, öğün boyutunu kontrol eden ve öğünün sonlandırılmasına yol açan süreçtir (Camilleri, 2015). Yemek sonrası tokluk hissi veya

mide bulantısı, şişkinlik gibi semptomlar olarak tanımlanmıştır. Doygunluk, normal bir tokluk seviyesine ulaşmadan önce tüketilen kalorilerle ölçülür (Camilleri, 2015; Halawi ve ark., 2017).

Doygunluk, gastrointestinal sistemden gelen hacim bağımlı sinyallere ve bağırsak epiteli ile besinler arasındaki etkileşimden salınan nöroendokrin efektörlere dayanır. Tüm bu olaylar zinciri, beyin sapındaki ve hipotalamustaki iştah inhibisyon nöron sistemini harekete geçirir (Heisler, & Lam, 2017). Sosyo-kültürel ve yeme yönlerinden gelen bilişsel bilgiler, bu mekanik ve nöroendokrin gastrointestinal sinyalleri düzenleyebilir. Bu düzenlemeye yemenin hedonik düzenlenmesi denir.

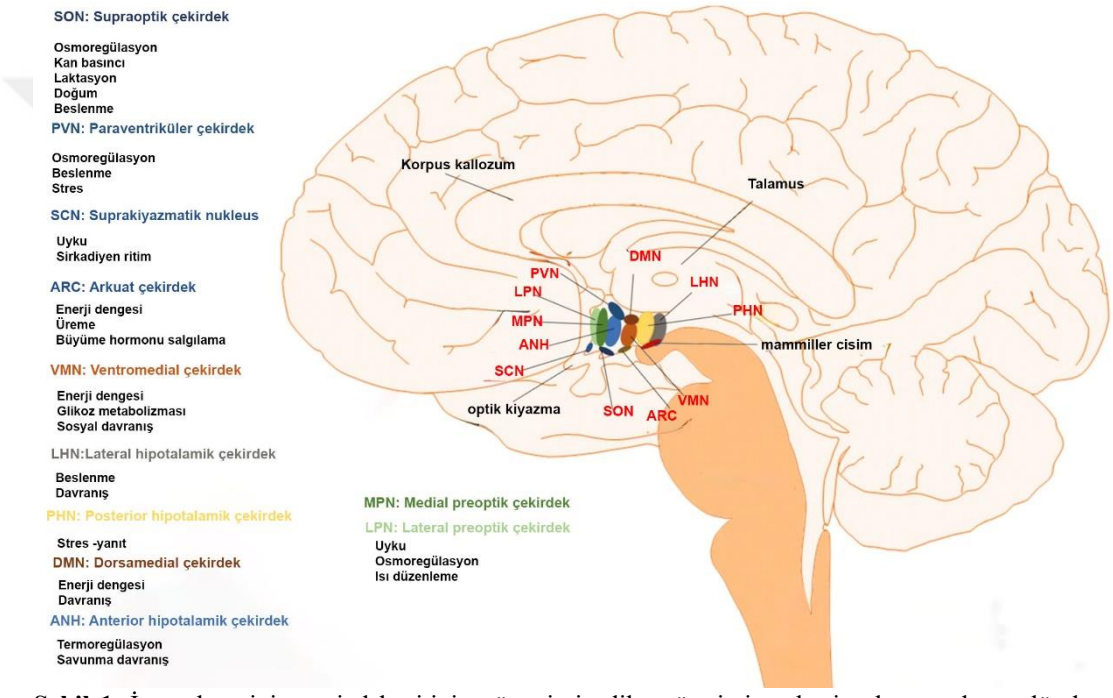
Gastrointestinal motilite, mide ve bağırsaktan gıdanın geçişini kontrol eder. Bu süreç, gıda sindirimi ve gıda alımının düzenlenmesi için önemlidir. Gıda alımından sonra, besinler mideyi doldurur ve mide içi basıncı artırmadan önce hacmini 15 kata kadar genişletir. Bu durum gastrik akomodasyon sonucu gerçekleşir. Gastrik akomodasyon, gastrik duvar gevşemesinin sonucudur ve yemek sonrası mide hacmindeki artışla ilişkilidir. Gastrik akomodasyon, mide içi basıncı düşük tuttuğu için doygunlukta önemlidir (Kuiken ve ark., 1999). Midenin gastrik mekanoreseptörleri gerginliği algıladığında, vagus aracılığıyla beyin sapındaki soliter traktus çekirdeğine (NST) bir doygunluk sinyali iletilir. Bu tokluk sinyali mide içeriğinin duodenuma boşalmasını sağlayarak mide içi basıncı azaltmaktadır.

2.2. İştahın Merkezi Düzenlenmesi

İştahın kontrolünü sağlayan merkezler beyinde hipotalamus ve beyin sapındaki soliter traktus nükleusudur (NTS) (Yu, & Kim, 2012). 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). Bu bölgelerde gri maddeye gömülmüş çekirdeklerin yanı sıra aksonal bağlantılar ve çoklu lif yolları bulunmaktadır.

Hipotalamus, hormon salgılanmasını, homeostatik işlevleri kontrol eden ve sosyal

etkileşimler gibi karmaşık davranışları şekillendiren nöronal ve endokrin bilgilerin merkezi bir entegratörü olarak görev yapar. Hipotalamik sistem, koronal düzlemde periventriküler, medial ve lateral olmak üzere üç ana bölgeye ayrılabilir. Bu bölgeler, paraventriküler çekirdek (PVN), supraoptik çekirdek (SON), suprakiazmatik çekirdek (SCN), dorsomedial hipotalamus (DMH), ventromedial hipotalamus (VMH), lateral hipotalamus (LH), arkuat çekirdek (ARC) ve retrokiazmatik alan (RHC) gibi farklı morfolojik ve fonksiyonel çekirdekleri içeren küçük ve dağınık nöronal kümelerden oluşur (Saper, & Lowell, 2014) (Şekil 1).



Şekil 1. İnsan beyninin sagital kesitinin gösterimi, glikoz üretimi ve besin alımının kontrolünde rol oynayan hipotalamik çekirdekler tasvir edilmiştir (Güemes, & Georgiou, 2018).

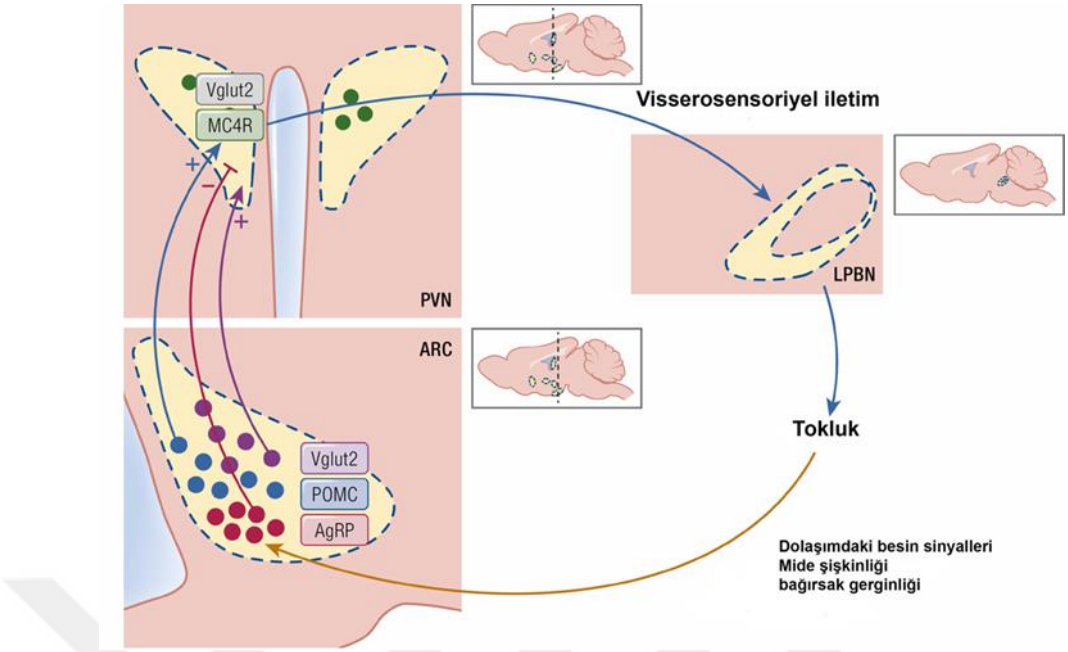
Besin alımını ve enerji homeostazının kontrolünü sağlayan açlık ve tokluk merkezlerinin hipotalamusta yer aldığı bilinmektedir. Bir grup araştırmacı tarafından yapılan çalışmalar sonucunda, iştahı baskılayan (anoreksijenik) merkezin ventromedial hipotalamusta (VMH) lokalize olduğu, başka bir çalışmada ise, iştahı artıran (oreksijenik) merkezin lateral hipotalamik alanda (LH) yer aldığı gösterilmiştir (Anand, & Brobeck, 1951; Hetherington, & Ranson, 1983). Hipotalamusta yer alan ARC, metabolik kontrolde çok önemli rollere sahiptir. Median eminensin (ME) hemen yakınındaki ayrıcalıklı anatomik konumu sayesinde bu bölge, organizmanın çevresinden gelen çok yönlü geri bildirim sinyallerini almak için ideal bir konumdadır.

Klasik olarak, metabolizma ve beslenme düzenleyici nöral devrelerin kontrolünü ve organizmanın enerji durumunu iletmek üzere çevreden gelen geri bildirim sinyalleri aracılığıyla homeostatik olarak kontrolünü sağladığı görülmüştür (Kennedy, 1953). Özellikle ARC'de lokalize olmuş besin alımı üzerinde zıt fonksiyon ve etkilere sahip iki farklı nöronal popülasyon tanımlanmıştır (Sohn, 2015). Birincisi oreksijenik Agouti-İlişkili Protein (AgRP) ve Nöropeptid Y (NPY) nöronlarıdır. İkinci nöron popülasyonu ise anoreksijenik kokain ve amfetaminle düzenlenen transkript (CART) ve pro-opiomelanokortin (POMC) nöronlarıdır. Bu peptitleri salgılayan nöron popülasyonları 'first order' nöronlar olarak tanımlanır ve bu nöronlar akson uzantılarını paraventriküler çekirdekte, lateral hipotalamik alanda ve perifornikal alanda eksprese olan 'second order' nöronlara gönderirler (Valassi, Scacchi, & Cavagnini 2008).

Enerji homeostazının düzgün bir şekilde korunması için, bu nöronları içeren nöronal ağın koordineli bir şekilde düzenlenmesi gereklidir. Bu yolaktaki herhangi bir bozukluk hipofaji/açlık veya hiperfaji/obezite ile sonuçlanabilir (Sohn, 2015). İnsülin ve leptin gibi hormonlar aracılığıyla taşınan periferik sinyallerin hipotalamik arkuat çekirdeğe ulaşması sonucu katabolik yol aktive olur ve anoreksijenik peptitlerin (POMC/CART) salınımı gerçekleşir (Cowley ve ark., 2001; Valassi ve ark., 2008). Gastrointestinal sistem tarafından üretilen tokluk sinyali (ghrelin, kolesistokinin gibi) anabolik yolu aktive eder ve bu da oreksijenik peptidlerin (NPY/AgRP) salınmasına neden olur (Van Den Pol, & Trombley, 1993). Hipofiz bezinin ön lobunda, POMC adrenokortikotropin hormona (ACTH), β -lipotropik hormona (β -LPH) ve N-POMC'ye parçalanır, ancak hipotalamusta ACTH ve β -LPH daha fazla parçalanarak sırasıyla α ve β melanosit uyarıcı hormon (α MSH, β -MSH) elde edilir (Hahn, Breininger, Baskin, & Schwartz 1998). MC3R ve MC4R, beyinde ve beyin sapında yaygın olarak eksprese edilen ve α-MSH'in biyolojik etkilerine aracılık eden melanokortin reseptörleridir. MC3R ve MC4R'leri eksprese eden hedef nöronlar; PVN, ARC, NST, DMN (ventral kısmı hariç), medial ve median preoptik nükleus, vagusun dorsal motor nükleusu, anteroventral periventriküler hipotalamik nükleus ve kaudoputamende eksprese olurlar (Kishi ve ark., 2003). İştahın kontrolü ve enerji homeostazında MC3R ve MC4R'lerinin rol oynadıklarına dair birçok çalışma mevcuttur (Butler ve ark., 2000; Huszar ve ark., 1997; Lee ve ark., 2016). Kemirgenlerde yapılan çalışmalarda MC4R'lerin delesyonunda, hiperfaji ve obezite

sonuçları ortaya çıktığı bulunmuştur (Huszar at al., 1997). MC3R'nin silindiği transgenik farelerde, yağ kitlesinde artış olduğu (Butler ve ark., 2000), insanlarda bu genin mutasyonunun ise obeziteye neden olduğu görülmüştür (Lee ve ark., 2016). α-MSH, MC3R ve MC4R için endojen agonist olarak tanımlanmıştır ve α-MSH'nin i.s.v. yolla verilmesi besin alımını inhibe ederken (Pétervári ve ark., 2011) bu reseptörlerin endojen antagonistlerden biri olan AgRP'nin i.s.v. yolla uygulanması besin alımını arttırmıştır (Cone, 2005, 2006; Tracy, Clegg, Johnson, Davidson, & Benoit 2008).

MC4R, esas olarak PVN'de eksprese edilen bir G-protein-bağlantılı reseptördür. AgRP ve POMC nöronları, MC4R'ün oldukça yoğun eksprese edildiği PVN'e projeksiyonlar göndermektedir (Mountjoy, Mortrud, Low, Simerly, & Cone 1994; Zhu ve ark., 2020). Hızlı etkili bir tokluk mekanizması, ARC'de bulunan glutamat salgılayan oksitosin reseptörü eksprese eden (Vglut2/OxtR) nöronlar tarafından iletilir. Eksitatör Vglut2/OxtR projeksiyonları, PVN'de bulunan MC4R eksprese eden (PVHMC4R) nöronları üzerindeki GABAerjik AgRP projeksiyonları ile sinaptik olarak birleşir ve tokluğa neden olur (Fenselau ve ark., 2017). PVHMC4R nöronları, tokluğu teşvik eden kritik bir nöronal popülasyondur ve beslenmenin düzenlenmesinde 'second order' nöron grubunda yer alır. PVHMC4R nöronları, beyin sapındaki lateral parabrakial çekirdeğin (LPBN) dahil olmak üzere çeşitli yerlere glutamaterjik sinyaller gönderir (Heisler, & Lam, 2017). Bu aktivasyon sonucu, LPBN tokluk hissini teşvik eder. Zamanla, var olan aktivasyon negatif bir geri bildirimle sonuçlanır. Sonunda PVN nöronlarını inhibe ederek PVN ve LPBN arasında var olan nöral devreyi susturur ve tekrar yiyecek tüketimi başlar (Garfield ve ark., 2015) (Şekil 2)



Şekil 2. Beslenmenin nöronal düzenlenmesi (Jais, & Brüning, 2022).

2.3. Besin Alımında Rol Oynayan Peptitler

Besin alımında rol oynayan peptidler, MSS'de, sindirim sisteminde ve adipoz dokuda sentezlenir ve salınımı gerçekleşir. Bu peptidler hem sindirim sistemindeki ekzokrin bezleri ve düz kas dokusunu hem de periferik sinir sistemini etkiler. Periferik organlarda sentezlenen peptidler, mide ve ince bağırsak motilitesini etkileyerek, bağırsak geçiş süresini uzatarak gastrik distansiyonu ve öğünler arasındaki tokluk hissini artırır. Periferik etkilerinin yanı sıra, bu peptidler merkezi sinir sistemini de etkiler. Hipotalamik nöronlar tarafından salgılanan nöropeptitler, nöronlar tarafından sentezlenen, düzenli bir şekilde salınan ve nöronlarda bulunan reseptörler üzerinde etki eden en küçük peptit molekülleri olarak tanımlanabilir (Burbach, 2011). Hem hipotalamusta hem de beyindeki diğer iştah düzenleme merkezlerinde etki ederek beslenmenin düzenlenmesinde önemli bir rol oynarlar (Pałasz, Della Vecchia, Saganiak, & Worthington 2021). Bu peptitler özellikle hipotalamustaki oreksijenik ve anoreksijenik sinyalleri etkilerler ve bu sayede besin alımının regülasyonunda rol oynarlar (Sam, Troke, Tan, & Bewick 2012).

Besin alımıyla ilişkili peptitler, hem de beslenme davranışı üzerindeki farklı etkilerine göre hem de eksprese edildikleri sisteme göre sınıflandırılır. Besin alımı üzerindeki etkilerine göre oreksijenik ve anoreksijenik peptitler olarak sınıflandırılırlar. Organizmada eksprese edildikleri sisteme göre ise; MSS'de

üretilenler merkezi peptitler ve sindirim sistemi ve yağ dokusunda üretilenler periferik peptitler olarak sınıflandırılırlar. (Tablo 1).

Tablo 1. Besin alımı ve enerji homeostazının regülasyonunda rol alan nöropeptitler

Sentezlenip salındıkları lokasyona göre			
		Merkezi Peptitler	**Periferal Peptitler**
Etki mekanizmalarına göre	**Oreksijenik Peptitler**	Nöropeptit Y (NPY) Agouti-gen ilişkili protein (AgRP) Melanin konsantre edici hormon (MCH) Hipokretin/Oreksin Galanin Galanin-benzeri peptit Serebellin1 Phoeniksin	Ghrelin
	Anoreksijenik Peptitler	Kokain ve amfetamin ilişkili 12ranscript (CART) α-Melanosit uyarıcı hormon (α MSH) Glukagon-benzeri peptitler (GLP1 ve GLP2) Kortikotropin salgılatıcı faktör (CRF) Nörotensin Nesfatin Nöronostatin Speksin RSPO1 / RSPO3	Leptin Peptit tirozin tirozin (PYY) Glukagon-benzeri peptit-1 (GLP-1) Oksintomodülin (OXM) Kolesistokinin (CCK) Pankreatik polipeptit (PP) Glukagon İnsülin Bombesin

2.3.1. Oreksijenik peptitler

2.3.1.1. Oreksin

Oreksin A ve B, öncüsü pre-pro oreksinden türetilir. Oreksin A'da 33 amino asit (aa) ve oreksin B'de 28 aa bulunur Oreksinler, G-protein bağlı reseptörler olan hipokretin reseptörü tip 1 (HCRTR1) ve tip 2 (HCRTR2) olarak da adlandırılan Oreksin-1 reseptörüne (OX1R) ve Oreksin-2 reseptörüne (OX2R) bağlanır. Orexin A, hem OX1R hem de OX2R'ye bağlanır, ancak orexin B esas olarak OX2R'ye bağlanır (Sakurai ve ark., 1998).

Oreksinler, insanlar ve fareler arasında yüksek benzerlik gösterir. Bu peptiler esas olarak lateral hipotalamus, dorsomedial hipotalamus, perifornikal alan ve posterior hipotalamik alanda bulunan nöronlar tarafından ifade edilir (Date ve ark., 1999; Nambu ve ark., 1999; Sakurai ve ark., 1998). Oreksin-immünoreaktif aksonların ve akson sonlanmalarının hipotalamusta ve diğer beyin bölgelerinde dağılımını gösteren çalışmalar mevcuttur. Hipotalamusta yaygın olarak dağılmışlardır ancak özellikle besin alımıyla ilişkili olan ARC ve PVN'de yoğun olarak eksprese olurlar.

Oreksinler isimlerini beslenmeyi uyarmak anlamına gelen orexis'ten almıştır (Laburthe, & Voisin, 2012). Besin alımının kısıtlamasıyla indüklenen hipoglisemide

oreksin nöronlarının aktivasyonu pozitif c-Fos ekspresyonu ile gösterilmiş, bu nöronların besin alımı üzerindeki etkilerini doğrulamıştır (Ferguson, & Samson, 2003). Çalışmalar, i.s.v. oreksin uygulamasının deneklerde besin alımını artırdığını göstermiştir (Lubkin, & Stricker-Krongrad, 1998; Sakurai ve ark., 1998). Oreksinin, gelişmekte olan domuzların hipotalamusunda ekprese olduğu bulunmuş ve balıklarda beslenme davranışını düzenlediği gösterilmiştir (Dyer, Touchette, Carroll, Allee, & Matteri 1999; Lin ve ark., 2000). Oreksinin ayrıca koyunlarda da LHA'da lokalize olduğu, i.s.v. enjeksiyonu sonrası 4 saat içinde kümülatif yem alımının iki katına çıktığı rapor edilmiştir (Sartin ve ark., 2001). Oreksin nöronlarının da glikoz seviyelerine duyarlı olduğu, artan glikoz konsantrasyonlarının oreksin nöronlarının uyarılmasını engellediği ve farelerde beslenme davranışını uyardığı gösterilmiştir (Burdakov, Gerasimenko, & Verkhratsky 2005; Yamanaka ve ark., 2003).

Enerji homeostazının düzenlenmesinde, oreksin sentezleyen nöronlar, α-melanin uyarıcı hormon ve nöropeptid-Y (NPY) sentezleyen nöronlar ile entegre olarak etki eder (Horvath, Andrews, & Diano 2009). Glutamat agonistlerinin oreksin nöronları üzerinde aktive edici etkisi olduğu (Eyigor, Minbay, Cavusoglu, & Jennes 2010) ve oreksin nöronlarının glutamat altbirim reseptörlerini eksprese ettiği bildirilmiştir (Eyigor, Minbay, & Kafa 2012).

Oreksinler, uyku ve uyanıklığın teşvik edilmesi, analjezi, biliş ve hafızada iyileşme, ödül ve motivasyon, enerji homeostazı, prolaktin inhibisyonu, büyüme hormonu salgılanması, kan basıncında artış, kalp atış hızı, solunum frekansında artış ve ayrıca mide asidi salgılanmasında artış gibi birçok fizyolojik süreçte görev alır (Li ve ark., 2013; Scammel, & Winrow, 2011).

2.3.1.2. MCH (Melanin konsantre edici hormon)

Melanin-konsantre edici hormon, lateral hipotalamus (LH) ile zona insertada (ZI) ekspresyon gösteren ve oreksijenik etkilere sahip olduğu bilinen bir nöropeptittir (Bittencourt ve ark., 1992). MCH nöronları, periferik bölgeden doğrudan sinyaller alan 'first order', ARC nöronlarının kontrolü altında olduklarından beslenmeden sorumlu 'second order' nöronlar olarak kabul edilirler (Al-Massadi ve ark., 2021). Alfa-melanosit uyarıcı hormon (α-MSH) ve CART eksprese eden ARC POMC nöronları tokluk sinyali verir ve gıda alımını ve enerji depolanmasını inhibe ederler. Nöropeptid

Y (NPY) ve agouti geniyle ilişkili peptid (AgRP) içeren komşu nöronlar açlık sinyali verir ve besin alımını ve kilo alımını teşvik eder (Vohra, Benchoula, Serpell, & Hwa 2022). NPY- AgRP, leptin ve insülin tarafından inhibe edilirken, POMC nöronları bunlar tarafından uyarılır. Her iki popülasyon da MCH nöronlarına projeksiyonlar gönderir ve bu da POMC nöronlarını negatif olarak düzenler. Çeşitli çalışmalarda, MCH'nin besin alımını artırarak ve enerji harcamasını azaltarak enerji korunumunu ve birikimini teşvik ettiği ortaya çıkmıştır (Ludwig ve ark., 2001; Mul ve ark., 2010; Shimada, Tritos, Lowell, Flier, & Maratos-Flier 1998). İ.s.v. yolla MCH verilmesinin akut etkileri 24 saat sonra kaybolurken, kronik infüzyonunun zaman içinde besin alımını ve vücut ağırlığını arttırdığı gösterilmiştir (Rossi ve ark., 1997). Farelerde ve sıçanlarda MCH'nin hem akut hem de kronik i.s.v. infüzyonlarının, obez hayvanlarda hiperfajiye yol açtığı bildirilmiştir (Gomori ve ark., 2003). Yapılan çalışmalarda, obezitenin çoğu fare modelinde MCH seviyelerinın artış gösterdiği kanıtlanmıştır (Stricker-Krongrad, Dimitrov, & Beck 2001). Transgenik fare modellerinde MCH'nin aşırı ekspresyonunun vücut ağırlığını arttırdığı ve obeziteye yol açtığı gösterilmiştir (Ludwig ve ark., 2001). Bu durumun tersine, MCH'nin farmakolojik veya genetik inhibisyonunun (Ito ve ark., 2009) veya MCHR1'in blokajının (Marsh ve ark., 2002), gıda lezzetinden bağımsız olarak hem zayıf hem de obez farelerde kilo kaybına yol açtığı kanıtlanmıştır (Noble ve ark., 2019). Ek olarak, MCH nöron ablasyonu yaşla ilişkili kilo alımını azaltır (Alon, & Friedman, 2006). MCH nöronları beslenmeyle ilgili çeşitli periferik sinyallere yanıt verir ve bunlarla etkileşime girer. MCH nöronları glikoz tarafından stimüle edilirler (Burdakov ve ark., 2005) ve periferik glikoz homeostazını düzenlerler (Kong ve ark., 2010). MCH'nin merkezi infüzyonu glikoz intoleransına neden olur (Al-Massadi ve ark., 2019; Schneeberger ve ark., 2018) MCH nöronlarındaki glutamat sinyalinin, glikoz toleransı üzerindeki MCH-nöron aracılı etkiler için gerekli olduğu ve glikoza duyarsız MCH nöronlarına sahip farelerin glikoz toleransını değiştirdiği gösterilmiştir (Schneeberger ve ark., 2018).

2.3.1.3. Nöropeptit Y (NPY)

Nöropeptit Y, 36 aa'lik bir peptittir (Nguyen ve ark., 2012; Tatemoto, Carlquist, & Mut 1982) ve primer eksprese olduğu yer hipotalamik arkuat çekirdek (ARC) olmakla beraber, NPY nöronları LHA, PVN, DMH, VMN, PFA ve beynin diğer

bölgelerine projeksiyonlarını gönderirler (Ramos, Meguid, Campos, & Coelho 2005). Beyinde enerji homeostazını ve yağ depolamasını düzenleyen bir nörotransmitter rolü oynar (Gehlert, 1999). NPY, besin alımı üzerine etkilerini, NPY Y1, NPY Y2, NPY Y4, NPY Y5 ve NPY Y6'yı içeren birden fazla NPY G-protein bağlı reseptör (NPYR) aracılığıyla iletir (Blomqvist, & Herzog, 1997; Yulyaningsih, Zhang, Herzog, & Sainsbury 2011). NPY, bu reseptörler arasından, NPY Y1 ve NPY Y5 yoluyla anoreksijenik sinyalleri inhibe eder (Pronchuk, Beck-Sickinger, & Colmes 2002; Roseberry, Liu, Jackson, Cai, & Friedman 2004). Nguyen ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışma hipofaji teşhisi konulan NPY Y1 ve NPY Y5 çift nakavt (KO) farelerin vücut ağırlığında artış gerçekleştiğini göstermiştir (Nguyen ve ark., 2012). Çalışmalar NPY'nin oreksijenik etkilerin aracılık etmesinde NPY Y reseptörlerinin önemini göstermektedir. Ayrıca NPY nöronları, AgRP nöronları ile %90 ko-lokalizedir (Schwartz ve ark., 2000).

2.3.1.4. Agouti-ilişkili protein (AgRP)

Agouti-İlişkili Protein (AgRP), post-translasyonel olarak parçalanmış bir pro-protein yoluyla üretilen, olgun ve disülfür açısından zengin AgRP'yi serbest bırakan 50 aa'lik bir nöropeptittir (Biebermann, Kühnen, Kleinau, & Krude 2012; Creemers ve ark., 2006). ARC' de lokalize AgRP eksprese eden nöronlar, leptin, ghrelin ve insülin hormonlarından gelen sinyalleri algılar ve LHA ve PVN dahil olmak üzere birkaç farklı beyin bölgesine projeksiyonlar gönderir (Krashes ve ark., 2014). İn situ hibridizasyon tekniği ile PVN, LHA ve DMN bölgelerinde AgRP mRNA'sının NPY mRNA'sı ile ko-lokalize olduğu gösterilmiştir (Broberger, Johansen, Johansson, Schalinng, & Hökfelt 1998; Hahn ve ark., 1998). AgRP'nin merkezi uygulanmasının ve aşırı ekspresyonunun hiperfajiye ve obeziteye yol açabileceği gösterilmiştir (Barsh, 1999; Broberger, & Hökfelt, 2001). AgRP ayrıca melanokortin reseptörlerinden olan MC3R ve MC4R'nin endojen antagonisti olarak bilinir (Ollmann ve ark., 1997). NPY/AgRP nöronları inhibitör GABAerjik sinyaller salgılarlar ve MSS'de lokalize anoreksijenik nöronları etkileyerek besin alımının artmasına neden olurlar (Cowley ve ark., 2001b; Sohn, 2015b).

2.3.1.5. Phoeniksin

Phoeniksin sentezleyen nöronların immünohistokimyasal olarak ARC ve NTS'de (Yosten, vd., 2013; Prinz ve Stengel, 2017) ve phoeniksin reseptörü olan G protein-bağlı reseptör 173 (GPR173)'ün ise ARC ve PVN'de eksprese edildiği gösterilmiştir (Stein, vd., 2016; Treen Alice K. vd., 2016). Bu beyin bölgeleri besin alımının düzenlenmesiyle yakından ilişkilidir (Prinz ve diğerleri, 2017; Schalla ve Stengel, 2019), bu nedenle phoeniksinin besin alımında potansiyel bir rolü olduğunu düşünülmektedir. Hipotalamustaki phoeniksin ekspresyonu, hormonlar ve yağ asitleri gibi periferik sinyaller tarafından modüle edilmiştir (McLlwraith, Loganathan, & Belsham ve ark., 2018). Aydınlık fazda i.s.v. phoeniksin-14 enjeksiyonunun sıçanlarda besin alımında doza bağlı bir artışa neden olduğu bildirilmiştir. Spesifik olarak, besin alımının derinlemesine değerlendirilmesi, phoeniksin-14'ün i.s.v. enjeksiyonunun öğün boyutunda, öğün süresinde, öğün zamanında ve besin alım oranında bir artışa neden olduğunu, öğünler arasındaki aralık ve tokluk oranının ise azaldığını göstermiştir (Schalla ve ark., 2017). Bununla birlikte, phoeniksin-14 karanlık fazda i.s.v. olarak enjekte edildiğinde veya aydınlık fazda intraperitoneal olarak enjekte edildiğinde, besin alımını etkilememiştir (Schalla ve ark., 2017). Yenidoğan tavuklarda, phoeniksin-14'ün i.s.v. uygulaması, nöropeptid Y1 (NPY1), nöropeptid Y5 (NPY5) ve kortikotropin salgılayan faktör 1/2 (CRF1/CRF2) reseptörlerinin aracılık ettiği hiperfajiye neden olmuştur (Rajaei, Zendehdel, Rahnema, Hassanpour, & Asle-Rousta 2022). Anoreksiya nervoza (AN) hastalarında, serum phoeniksin seviyesinin azaldığı bildirilmiştir (Pałasz ve ark., 2021).

2.3.2. Anoreksijenik peptitler

2.3.2.1. Kokain ve amfetamin-düzenleyici transkript (CART)

Kokain ve amfetaminle düzenlenen transkript peptidi (CART), iştahın düzenlenmesinde ve enerji homeostazisinde rol oynayan önemli bir nörotransmitter ve hormondur (Lau, & Herzog, 2014). Hipotalamik paraventriküler çekirdek (PVN), dorsomedial çekirdek, ventromedial çekirdek , lateral hipotalamik alan ve arkuat çekirdekte (ARC) CART immünoreaktif hücrelerinin varlığı, memelilerde besin alımının kontrolündeki rolünün göstergesidir (Cavalcante ve ark., 2011; Hunter ve ark., 2004). CART sentezleyen nöronların %90'ı, arkuat çekirdekteki POMC

sentezleyen nöronlarla birlikte ko-lokalizedir. Adipositlerden gelen insülin ya da leptin sinyalleri ile aktivasyon gösteren CART nöronları, uzantılarını ‘second order’ olarak bilinen nöronlara gönderirler (Susan, Sahandy, Ladenheim, Schwartz, & Moran 2001). Kemirgenlerin merkezi sinir sistemine i.s.v. olarak CART uygulanmasının, beslenme davranışında tonik bir inhibisyona neden olduğu ve vücut ağırlığını azalttığı kanıtlanmıştır (Kristensen ve ark., 1998; Larsen, & Hunter, 2006; Méndez-Díaz ve ark., 2009). ARC-PVN bağlantısında CART uygulanmasını takiben beslenmenin önemli ölçüde baskılandığı bildirilmiştir (Fekete, Wittman, Liposits, & Lechan 2004; Wang, Billington, Levine, & Kotz 2000). Paraventriküler çekirdekte eksprese olan CART m-RNA’sının, CRF-içeren nöronlarla ve vazopressin nöronlarıyla (Li, Hwang, & Hu 2002), arkuat çekirdekte eksprese olan CART’ın α-MSH ile (Adam, Archer, Findlay, Thomas, & 2002) ko-lokalize olduğu gösterilmiştir.

2.3.2.2. Melanokortinler

Melanokortinler, Pro-opiomelanokortin (POMC) prekürsör molekülünden türeyen bioaktif peptitlerdir (Arora, & Anubhuti, 2006). Hipotalamik alanlarda lokalize olan nöronlarda eksprese edilen bu peptitlerin fizyolojik rolleri hakkında bilgi veren birçok çalışma mevcuttur. Melanokortinler, iştahın kontrolünde ve enerji homeostazisinde rol alan melanokortin-4 reseptörü (MC4R) için endojen bir agonisttirler (Neary, Goldstone, & Bloom 2004). α-MSH’ın i.s.v. olarak verilmesi beslenmeyi inhibe eder ve vücut ağırlığının azalmasına sebep olur. Genel olarak, MC4R'deki melanokortin sinyallemesinin anorektik etkilerinin PVN'deki nöronlar aracılığıyla meydana geldiği düşünülmektedir (Balthasar ve ark., 2005; Garfield ve ark., 2015; Shah ve ark., 2014), ancak amigdala, DMH gibi diğer bölgelerdeki nöronlar melanokortinlerin iştah üzerindeki etkilerine katkıda bulunur (De Backer ve ark., 2011; Fenselau ve ark., 2017; Shah ve ark., 2014) . Sempatik preganglionik kolinerjik nöronlarda ifade edilen MC4R, sempatik sinir sistemi aktivitesini artırarak enerji harcaması ve glikoz homeostazı üzerindeki etkileri düzenler (J. Rossi ve ark., 2011). MC4R’nin endojen antagonisti olarak görev yapan AgRP’nin ve MC3R’nin stimüle edici etkisi sonucu α-MSH sinyali inhibe olur ve besin alımı uyarılır (M. Rossi ve ark., 1998).

2.3.2.3. Kortikotropin salıverici faktör (CRF)

Hipofizden salınımı gerçekleşen adrenokortikotropik hormonun (ACTH) fizyolojik düzenleyicisi olarak tanımlanan kortikotropin salıverici faktör (CRF), 41 amino asitli bir nöropeptittir (Vale, Spiess, Rivier, & Rivier 1981) ve ana ekspresyon yeri PVN'dir (Crespo ve ark., 2014). Stresli bir uyarana yanıt olarak, paraventriküler çekirdeğin parvisellüler salgı nöronları CRF'yi hipofiz portal sistemine salgılar ve burada ön hipofize taşınır (Joshi, McAree, & Chandler 2020). CRF, hem termojenik hem de endojen kaynaklı anorektik bir ajandır (Richard, Huang, & Timofeeva 2000). CRF'nin i.s.v. olarak verilmesi, spontan besleme davranışını veya açlıkla uyarılmış besleme davranışını baskılar (Heinrichs, Menzaghi, & Koob ve 1998; Levine, & Billington, 1989; Morley, 1987). Buna ek olarak, CRF'nin kronik olarak kullanılması ise, anoreksi ile progresif kilo kaybına sebep olmaktadır (Schwartz, Dallman, & Woods 1995). Ayrıca, MSS dışında, diğer periferal organlarda da (karaciğer, akciğer, kalp, kan damarları, dalak, plasenta, ovaryum, testis) bulunduğu rapor edilmiştir (Boorse, & Denver, 2006).

2.3.2.4. Glukagon-benzeri peptitler

Glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) ve glukagon benzeri peptid-2 (GLP-2) olarak bilinen iki peptitin aynı proglukagon geninden türetildiği bildirilmiştir. İsimleri genetik kökenlerini ve glukagon ile birbirlerine olan benzerliklerini yansıtır. pre-Proglukagon, glukagon'un öncülüdür ve soliter traktusun kaudal çekirdeğinin nöronlarında, pankreastaki α-hücrelerinde ve bağırsaktaki L-hücrelerinde sınırlı miktarlarda eksprese edilmektedir (Mariam, & Niazi, 2024). Pankreasta gerçekleşen birtakım post translasyonel işlemler sonucunda proglugakon yıkılır ve GLP-1, GLP-2 ile glicentin adı verilen başka bir peptid üretilir (Drucker, 2007). GLP-1 ve GLP-2; besin alımından sonra dolaşıma salıverilen peptitler olmasına rağmen NTS'nin kaudal parçasında lokalize olan nöronlarda nörotransmitter olarak da rol alır. Besin ve su alımının regülasyonunda rol oynayan çoğu hipotalamik çekirdekte GLP-1 reseptörleri ile GLP-1 içeren sinir lifleri yer alır (Merchenthaler, Lane, & Shughrue 1999). GLP-1 başlıca glikoz düzenlemesinde rol oynar. İnsülin salgısını artırır, glukagon salgısını baskılar, gastrik boşalmayı geciktirir ve tokluk veya dolgunluk hissini destekler (Nauck, & Meier, 2016). GLP-2, bağırsak astarının bakımı ve onarımında rol oynar.

Besin emilimini iyileştirdiği, bağırsak geçirgenliğini azalttığı ve bağırsakta hücre çoğalmasını uyardığı gösterilmiştir (Guan ve ark., 2006). Ayrıca sıçanlarda GLP-1 ve GLP-2'nin i.s.v. enjeksiyonlarının besin alımını baskıladığı gösterilmiştir (Tang-Christensen ve ark., 1996; Tang-Christensen, Larsen, Thulesen, Romer, & Vrang 2000).

2.3.2.5. Nesfatin-1

82 amino asitlik bir molekül olan Nesfatin-1, N-teminal (N23), orta (M30) ve C-terminal (C-29) olmak üzere 3 alandan oluşmaktadır. M30 alanının, bu nöropeptidin fizyolojik, özellikle de anorektik etkilerinin indüklenmesinde kilit bir rol oynadığı ileri sürülmüştür (Oh-I ve ark., 2006). Sıçan beyninde, nesfatin-1 ekspresyonu gösteren nöronlar esas olarak arkuat çekirdek (ARC), paraventriküler çekirdek (PVN) ve supraoptik çekirdekte (SON) ve ayrıca dorsomedial hipotalamus (DMH), lateral hipotalamusta (LH) ve zona insertada yer almaktadır (Goebel, Stengel, Wang, Lambrecht, & Tache 2009; Shimizu ve ark., 2009a; Stengel, Goebel, Wang, & Tache 2010; Yurtseven ve ark., 2020). Nesfatin-1'in anoreksijenik etkisinin çoğunlukla ilk üç düzenleyici hipotalamik merkezde gerçekleştirildiği varsayılmaktadır. Nesfatin-1'i eksprese eden nöronlar, açlık ve tokluğun regülasyonunda yer alan MCH, CART, α-MSH, POMC, NPY, CRF, büyüme hormonunu-salgılayıcı hormon (GHRH), vazopressin, oksitosin gibi diğer nöropeptitlerle ko-lokalize olarak bulunurlar (Brailoiu ve ark., 2007; Foo, Brismar, & Broberger 2008; Fort ve ark., 2008; Kohno ve ark., 2008; Maejima ve ark., 2009; Okere, Xu, Roubos, Sonetti, & Kozicz 2010). Nesfatin-1, aynı zamanda mide ve bağırsak mukozal hücreleri ve pankreas beta hücreleri gibi endokrin hücrelerden salınır, kas ve yağ dokuları gibi periferik dokularda bulunur (Chen, Shu, Cong, Jiang, & Jiang 2015; Khalili, Shekari Khaniani, Afkhami, & Mansoori Derakhshan 2017; Mogharnasi, TaheriChadorneshin, Papoli-Baravati, & Teymuri 2019).

Nesfatin-1'in, kan beyin bariyerini geçtiği rapor edilmiştir (Anwar ve ark., 2014; Chen ve ark., 2015; Li, Wang, Chen, Guan, & Jiang 2010). Nesfatin-1'in merkezi olarak verildiği ad libitum beslenen fare ve sıçanlarda (Goebel-Stengel, Wang, Stengel, & Tache 2011; Gotoh ve ark., 2013; Könczöl ve ark., 2012; Maejima ve ark., 2009; Stengel ve ark., 2009; Yosten, & Samson, 2009) veya aç hayvanlarda

(Wernecke, Lamprecht, Jöhren, Lehnert, & Schulz 2014; Yosten, & Samson, 2009) anoreksijenik etkisi yapılan çalışmalarla doğrulanmıştır. Nesfatin-1'in intranazal olarak verildiğinde, leptine benzer şekilde besin alımını azalttığı gösterilmiştir (Shimizu, Oh-I, Okada, & Mori 2009b). Nesfatin-1'in periferik uygulamadan sonra besin alımının baskılanmasındaki rolleri de araştırılmıştır. Farelerde intraperitoneal (i.p.) nesfatin-1 enjeksiyonunun besin alımında üç saatlik bir inhibisyona neden olduğu ve subkutan uygulamasının da benzer bir etkiye neden olduğu, ancak bu anoreksijenik etkinin yalnızca 14 saat boyunca devam ettiği gösterilmiştir. Tekrarlanan i.p. enjeksiyonlar, altı günlük bir süre içinde vücut ağırlığı artışını önemli ölçüde engellemiştir (Shimizu, Ohsaki, Oh-I, Okada, & Mori 2009c; Stengel, 2015). Uzun süreli subkutan nesfatin-1 infüzyonunun da sıçanlarda besin alımında önemli bir düşüşe neden olduğu gösterilmiştir (Mortazavi, Gonzalez, Ceddia, & Unniappan 2015).

Nesfatinerjik sistemin beslenme davranışını düzenlediği ve birçok sistemle etkileşime girdiği gösterilmiştir. Nesfatin-1, beyindeki en iyi bilinen oreksijenik peptit olan NPY ile doğrudan etkileşim halindedir. NPY, PVN'deki nesfatin-1 nöronlarını inhibe edebilirken, nesfatin-1'in ARC'deki NPY nöronlarını inhibe ettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Chen ve ark., 2015; Schalla, & Stengel, 2018; Stengel, 2015; Stengel, Mori, & Tache 2013a). Nesfatin-1'in leptinden bağımsız olarak anoreksijenik etkiler gösterdiği kanıtlanmıştır (Stengel, 2015; Stengel ve ark., 2013; Stengel, & Taché, 2013b).

Yapılan çalışmalarda nesfatin-1'in neden olduğu anoreksijenik etkinin, MC3R/MC4R reseptör antagonisti SHU9119'un merkezi uygulanmasıyla bloke edildiği gösterilmiştir (Oh-I ve ark., 2006; Yosten, & Samson, 2009). Nesfatin-1'in merkezi veya periferik uygulanmasının sıçanlarda, NTS'de POMC ve CART mRNA ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Oh-I ve ark., 2006; Shimizu ve ark., 2009c; Wernecke ve ark., 2014). Bu iki sistem arasındaki etkileşim, PVN'de α-MSH uygulamasının Nucb2 mRNA ekspresyonunu arttırdığını (Oh-I ve ark., 2006) ve NUCB2/nesfatin 1 nöronlarını aktive ettiğini (Sedbazar, Ayush, Maejima, & Yada 2014) gösteren çalışmalarla desteklenmiştir. Ayrıca, nesfatin-1'in CRF eksprese eden nöronların uyarılabilirliğini etkilediği (Price, Samson, & Ferguson 2008) ve aynı zamanda PVN'de CRF protein seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir (Gotoh ve ark.,

2013).

2.3.2.6. Nöronostatin

Nöronostatin peptiti, ilk kez 2008 yılında tanımlanmış nöropeptittir (Samson ve ark., 2008). Hipotalamusta besin alımından sorumlu bölgelerde lokalize olduğu gösteren çalışmalar mevcuttur. Nöronostatini eksprese eden nöronların perikaryonlarının, hipotalamusta, periventriküler çekirdekte (PeV) yerleşim gösterdiği, nöronostatin-pozitif akson terminallerinin suprakiazmatik çekirdek (SCN) ventromedial hipotalamik çekirdek (VMH) ile ARC ve median eminenste (ME) bulunduğu gösterilmiştir (Kocoglu ve ark., 2020). Besin alımının kontrolünden sorumlu alanlarda yüksek ekspresyonunun yanı sıra, mide ve bağırsakta da ekspresyonunun gözlendiği bildirilmektedir. Bu veriler, nöronostatinin iştah ve metabolizmanın düzenlenmesinde kritik bir rol oynadığını düşündürmektedir (Dun ve ark., 2010; Samson ve ark., 2008). Nöronostatinin (1,2–12 nmol/kg) i.s.v. uygulamasının, doza bağlı bir şekilde sıçanlarda besin ve su alımını baskıladığı gösterilmiştir (Samson ve ark., 2008; Yosten, Pate, & Samson 2011). Ancak, nöronostatinin intra-hipokampal enjeksiyonu sıçanların iştahını etkilememiştir (Carlini ve ark., 2011). Yapılan çalışmalar, nöronostatinin gastrointestinal dokularda c-Fos veya c-Jun ekspresyonuna yol açarak, gastrointestinal motilitenin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını ileri sürmektedir (Samson ve ark., 2008). Su ve arkadaşları, farelerde nöronostatinin (40-800 nmol/kg) i.s.v. enjeksiyonunun gastrik boşalmayı geciktirdiğini ve doz bağımlı bir şekilde gastrointestinal geçişe izin verdiğini bulmuştur (Su ve ark., 2012). Ayrıca, klasik opioid reseptör antagonisti nalokson veya MC3R/MC4R reseptör antagonisti SHU9119 , nöronostatinin etkilerini belirgin şekilde baskılamıştır; bu da nöronostatinin i.s.v. enjeksiyonuyla indüklenen gastrointestinal etkilerin opioid sistemi ve merkezi melanokortin sistemi tarafından düzenlendiğini göstermektedir (Su ve ark., 2012). Besin alımı ve gastrointestinal motilitenin yakından ilişkili olduğu düşünüldüğünden, nöronostatin tarafından paraventriküler çekirdek (PVN) nöronlarının elektrofizyolojik aktivitelerinde meydana gelen değişiklikler, onun gıda alımı ve gastrik motilitenin düzenlenmesinde önemli rolleri olduğunu ima etmektedir (Samson ve ark., 2008).

2.3.2.7. Speksin

Speksin (SPX), kisspeptin (KISS) ve galanin (GAL) peptitleri ile aynı gen ailesine mensuptur ve speksin (SPX), galanin reseptörü 2 (GALR2) ve galanin reseptörü 3 (GALR3) aracılığıyla hareket ederek üreme ve beslenme üzerinde inhibitör etkiler uygulayan hipotalamik nöropeptittir (Lv ve ark., 2020; Wang, Tran, Lee, & Belsham 2020). SPX'nin, besin alımının regülasyonunda rol oynayan hipotalamik çekirdeklerden PVN ve SON' de eksprese olduğu bulunmuştur (Pałasz ve ark., 2021). SPX immünoreaktivitesi ayrıca hipokampüs, amigdala, serebellum ve beyin sapında da gösterilmiştir (Pałasz, Janas-Kozik, Borrow, Arias-Carrión, & Worthington 2018). Ayrıca, beyin, kalp, akciğer, karaciğer, tiroid, adrenal bez, kas doku, yağ doku, ovaryum, testis, pankreas, mide ve gastrointestinal sistemin farklı bölümlerinde de eksprese olduğu bilinmektedir (Ma, Bai, He, & Wong 2018). Balıklarla yapılan bir çalışmada, besin alımının telensefalon, hipotalamus ve optik tektumda SPX ekspresyonunu uyardığı, SPX'in i.s.v. enjeksiyonunun ise yalnızca yiyecek tüketimini ve beslenme davranışını baskılamakla kalmayıp aynı zamanda anoreksijenik faktörlerin (örn. CART, POMC, CCK ve MCH) ekspresyonunu indüklediği ve buna paralel olarak SPX yanıtlarının olduğu beyin bölgelerinde oreksijenik sinyallerde (örn. NPY, AgRP ve Apelin) düşüşe neden olduğu gösterilmiştir (Wong ve ark., 2013). Beyindeki SPX ekspresyonunda besin alımı sonrasıdaki artış ve hipotalamustaki beslenme sinyallerinin SPX tarafından farklı şekilde düzenlenmesine ilişkin bulgular, balıklar üzerinde yapılan benzer deneylerle de doğrulanmıştır (Li ve ark., 2016; Wu ve ark., 2016).

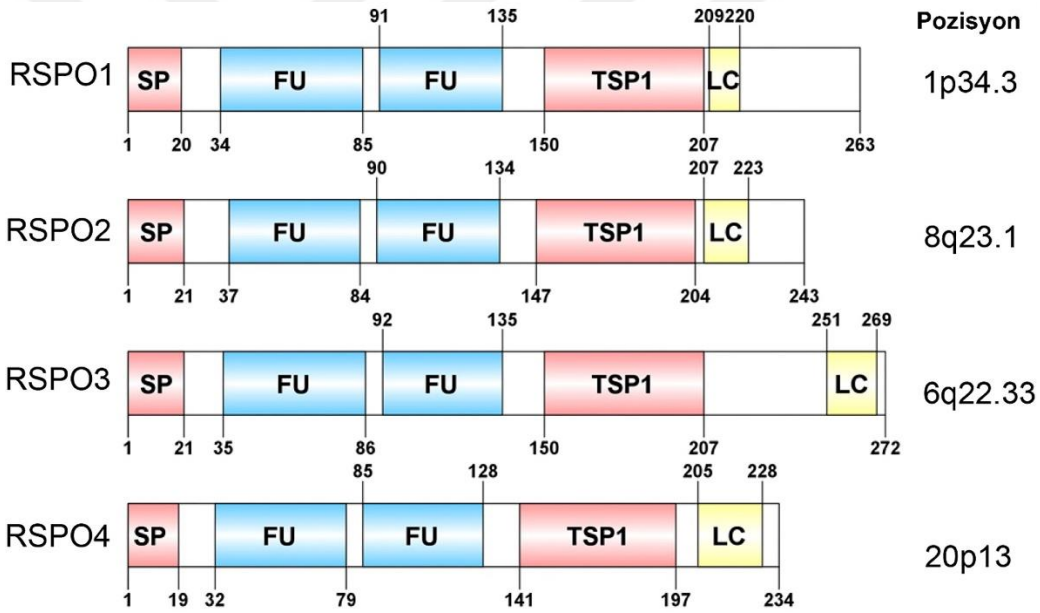
2.4. RSPO

2.4.1. RSPO'ların keşfi ve yapısal özellikleri

RSPO gen ailesinin ilk üyesi olan hPWTSR, daha sonra hRSPO3 olarak isimlendirilmiştir ve ilk kez insan fetal beyin cDNA kütüphanesinin sekanslama çalışmaları sırasında keşfedilmiştir (Jin, & Yoon, 2012; Chen ve ark., 2002). Sonraki yıllarda ise farklı türlerde diğer RSPO genleri keşfedilmiştir (Jin, & Yoon, 2012; Kamata ve ark., 2004; Kazanskaya ve ark., 2004; Nam, Turcotte, Smith, Choi, & Yoon, 2006). RSPO (roof plate-specific spondin; RSPO) geninin formal adı, gelişmekte olan embriyoların nöral tüp tavan plağında eksprese edilen fare RSPO1

geninden alınmıştır (Kamata ve ark., 2004).

Memelilerde RSPO protein ailesi, %40-60 oranında aa sekans benzerliği ve önemli yapısal homolojilere sahip RSPO1, RSPO2, RSPO3 ve RSPO4 olmak üzere dört bağımsız üyeden oluşur (Kazanskaya ve ark., 2004; Nam ve ark., 2006; Kim ve ark., 2011). Şimdiye kadar bildirilen tüm RSPO proteinleri dört ana işlevsel bölge içerir: iki bitişik sistein açısından zengin 92-94 aa uzunluğunda furin benzeri domain (FU1-FU2), 55-57 aa uzunluğunda trombospondin tip I tekrar domaini (TSP1) ve C-terminusunda değişen uzunlukta bir LC alanı. Tipik bir salgı proteini olarak RSPO proteininin N-terminusunda 20-25 amino asit uzunluğunda bir sinyal peptidi vardır. Sinyal peptidinden sonra, sistein açısından zengin ve RSPO protein yapısındaki en korunan bölgeler olan iki bitişik furin benzeri alan vardır (Şekil 3).

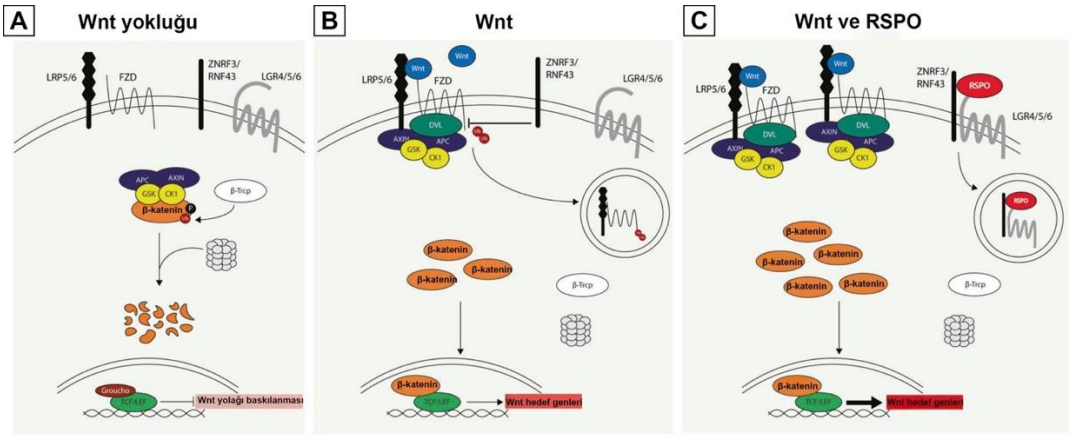


Şekil 3. İnsan RSPO'larının etki alanı, yapısı ve kromozomal lokalizasyonu. RSPO1-4'ün uzunlukları sırasıyla 263, 243, 292 ve 234 amino asittir. SP: sinyal peptidi; FU: Furin benzeri sistein açısından zengin bölge; TSP1: trombospondin tip 1 tekrarları; LC: düşük karmaşıklık bölgesi (He ve ark., 2023)

2.4.2. RSPO'ların sinyal iletimi

R-spondin proteinlerinin, hücre çoğalması, kök hücrelerin kontrolü, doku homeostazisi ve doku jenerasyonu dahil olmak üzere birçok temel süreci düzenleyen Wnt/β-katenin sinyal yolunun güçlendirilmesini sağlayan proteinler olduğu ilk kez 2004 yılında Kazanskaya ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalar sonucu keşfedilmiştir (Kazanskaya ve ark., 2004; Clevers, 2006). Bu temel rol nedeniyle, Wnt/β-katenin sinyal yolunun aktivitesi, başka bir deyişle efektör protein β-katenin'in

aşağı akış transkripsiyonel aktivitesi, birden fazla düzeyde gerçekleştirilen sıkı bir düzenleme gerektirir. Yolun merkezi kısıtlaması, β-katenin bozunmasını indükleyen ve bu şekilde yolu inhibe eden hücre içi APC içeren yıkım kompleksi tarafından sağlanır (Şekil 4A). Yolak, hücre dışı Wnt ligandlarının LRP5/6 ve Frizzled (FZD) membran reseptörlerine bağlanmasıyla aktive olur ve bu da β-kateninin bozunma kompleksinden ayrışmasına, β-kateninin stabilizasyonuna ve nükleer translokasyonuna ve ardından çekirdekteki hedef genlerin transkripsiyonel düzenlenmesine yol açar (Şekil 4B). Başka bir negatif düzenleme seviyesi, LRP5/6 ve FZD reseptörlerinin bozunmasını teşvik eden ubikitin ligazları olan ZNRF3 ve RNF43 tarafından sağlanır, böylece membranöz Wnt reseptörünün kullanılabilirliği ve ardından aşağı akış β-katenin sinyal kapasitesi azalır (Hao ve ark., 2012; Koo ve ark., 2012). RSPO proteinlerinin müdahale ettiği bu son ZNRF3/ RNF43 aracılı negatif geri bildirim döngüsüdür ve ek bir kanonik Wnt yolu düzenlemesi seviyesi sağlar. FU1, FU2 ve TSP alanları RSPO proteinlerinin sırasıyla ZNRF3/RNF43, Lösin açısından zengin tekrar içeren G-protein bağlı reseptörler (LGR) 4–6 ve heparin sülfat proteoglikanlarına (HSPG'ler) bağlanmasını sağlar (Nam ve ark., 2006; Zebisch ve ark., 2013; Ohkawara, Glinka, & Niehrs 2011). ZNRF3/RNF43 ve LGR'lerle etkileşim yoluyla RSPO'lar ubikitin ligazları ZNRF3/RNF43'ün membran temizliğini indükler, bu da hücre membranında Wnt reseptörünün kullanılabilirliğinin artmasına ve dolayısıyla Wnt/β-katenin yolağının Wnt ligand aracılı aktivasyonunun güçlendirilmesine yol açar (Şekil 4C) (Hao ve ark., 2012).



Şekil 4. Wnt yolu ve RSPO'nun güçlendirici etkisi. A, Wnt ligandlarının yokluğunda merkezi yıkım kompleksi β-katenin yıkımını indükleyerek Wnt hedef genlerinin transkripsiyonunu kısıtlar. B, Wnt ligandları, β-katenin'in degradasyon kompleksinden ayrılmasını indükleyerek β-katenin birikimine, nükleer translokasyona ve Wnt hedef genlerinin transkripsiyonuna yol açar. C, RSPO'lar, negatif düzenleyiciler ZNRF3/RNF43'ü membrandan temizleyerek kanonik Wnt yolunu güçlendirir, böylece membrandaki Wnt reseptörü kullanılabilirliğini ve Wnt ligand aracılı yol aktivasyonunun güçlendirilmesini artırır (ter Steege, & Bakker, 2021).

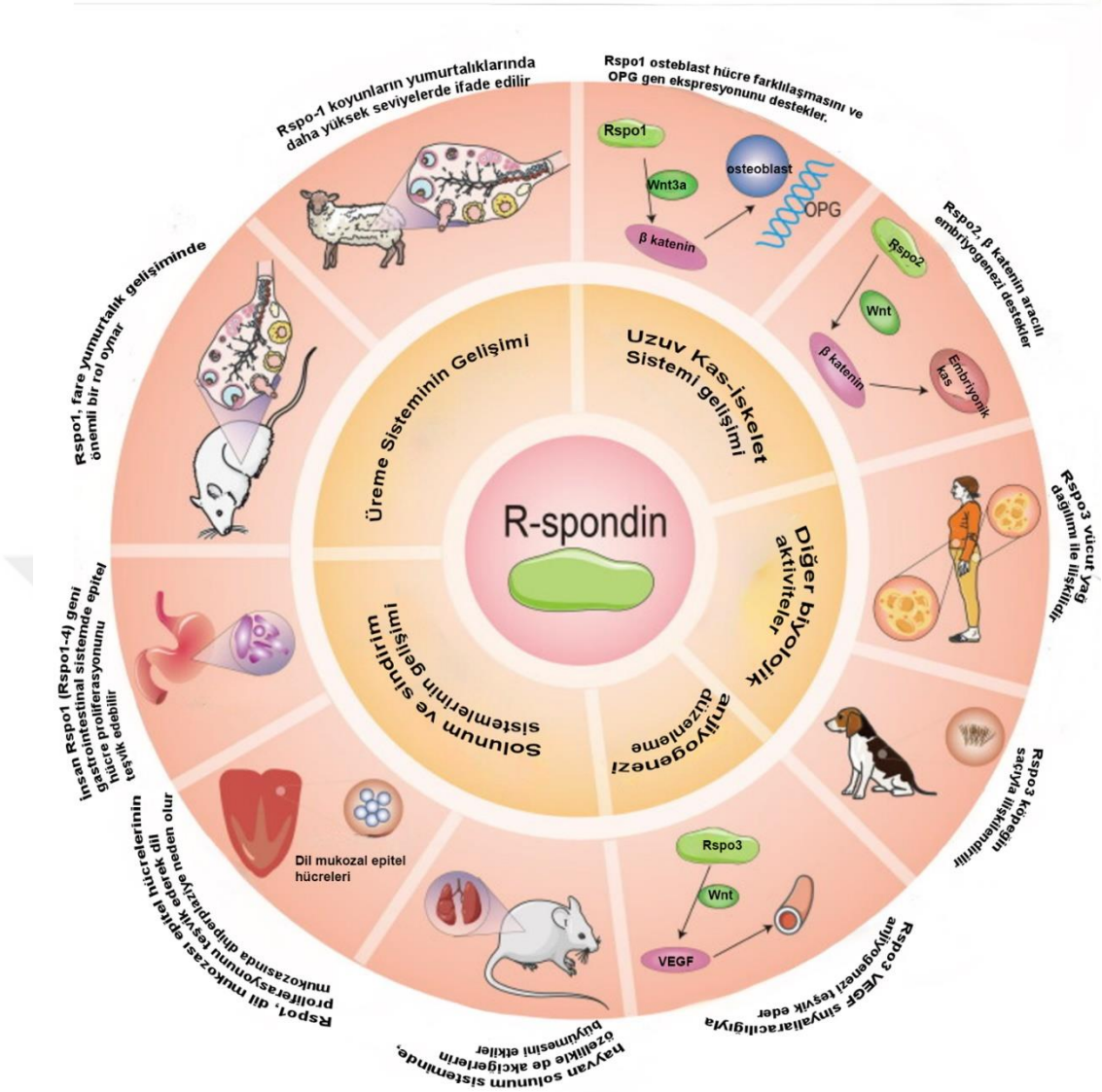
2.4.3. RSPO proteinlerinin in vivo işlevleri

2.4.3.1. Üreme sistemi gelişimi

RSPO ailesinin hayvan üreme sistemlerinin gelişimi üzerinde büyük bir etkisi vardır (Şekil 5). Smith ve arkadaşları, her türe ait embriyonik gonadlarda cinsiyet farklılaşmasının başlangıcında gonad RSPO1 geninin ifadesinin yukarı düzenlendiğini öne sürmüşlerdir (Smith ve ark., 2008). Tavuk embriyolarında, RSPO1 ekspresyonunun dişi ovaryum farklılaşması sırasında artmış olduğunu, bu artışın dişiye özgü Foxl2 gen aktivasyonu ve östrojen sentezi ile tutarlı olduğunu göstermişlerdir. Balıklarda cinsiyet belirlenmesini incelemek için, zebra balığında RSPO1 geninin araştırıldığı bir çalışmada, ovaryumdaki RSPO1 ekspresyonunun testisteki ekspresyon seviyelerinden daha güçlü olduğu gösterilmiş, çeşitli cinsiyetlerin organları arasında RSPO1 ekspresyon seviyelerinin farklılığı ortaya koyulmuştur (Zhang ve ark., 2011). Ayrıca, meme epitelindeki RSPO1 sinyali de memenin normal gelişimi için gereklidir. Tomizuka ve arkadaşları yaptıkları çalışmada model olarak RSPO1 geninin susturulduğu (RSPO1-/-) fareler oluşturmuş ve daha sonra RSPO1-/- dişi farelerin üreme kanallarında ve fetüslerde

psödoseksüellik dahil olmak üzere bu farelerin erkek özellikleri sergilediğini gözlemlemişlerdir (Tomizuka ve ark., 2008). Bu çalışma sonucunda, RSPO1'in gonadal farklılaşmayı hızlandırabileceği, erkek üreme siteminde farklılaşma programını inhibe edebileceği ve oositlerin hayatta kalmasına katkı sağlayabileceği sonucunu çıkarmışlardır.

RSPO2'nin de dişi üreme sisteminin gelişimini düzenleyebileceğine dair çalışmalar mevcuttur. Choi ve arkadaşları, farelerde oosit gelişiminde önemli bir rol oynayan Nobox genini nakavt etmelerine rağmen, RSPO2 geninin erken oogenezde önemli ölçüde ifade edildiğini göstermişlerdir. Bu çalışma sonucunda da RSPO2'nin Nobox geninden sonra oositlerin gelişimini düzenleyen önemli bir gen olduğunu ileri sürmüşlerdir (Choi ve ark., 2007). Başka bir çalışmada hem insan hem de fare ovaryumlarında RSPO2 ekspresyonunun, foliküler büyümenin başlangıcından itibaren gelişmekte olan foliküllere ait oositlerle sınırlı olduğu bulunmuştur (De Cian ve ark., 2020). RSPO2, dişi üreme kapasitesinin korunmasında yeri doldurulamaz bir rol oynar. Nam ve arkadaşları, RSPO2 gen ifadesini bloke eden bir fare modeli oluşturarak dişi ve erkek farelerin üreme yeteneklerini değerlendirmişlerdir. RSPO2 (þ/) erkek fareleri normal üreme performansı gösterirken, RSPO2 (þ/) dişi farelerin 4 aylık yaştan itibaren doğurganlıklarını kaybetmeye başladıklarnı göstermişlerdir (Nam ve ark., 2007). Keçi gonadal gelişimi üzerine yapılan bir çalışmada araştırmacılar, RSPO1 ve RSPO2'nin cinsiyete bağlı bir ekspresyon paterni sergilediklerini ve bu genlerin ekspresyonunun ovaryumda daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (Kocer ve ark., 2008).



Şekil 5. RSPO ailesinin in vivo fonksiyonları. RSPO ailesi, üreme sistemi gelişimi, uzuv kas-iskelet gelişimi, anjiyogenez, solunum ve sindirim sistemi gelişimi ve diğer biyolojik aktiviteler dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik işlevlere sahiptir (He ve ark., 2023'ten modifiye edilmiştir).

2.4.3.2. Anjiyogenez

Wnt/β-katenin sinyalizasyonu, anjiyogenez süreci için önemli bir yolaktır. RSPO3'ün, Wnt/β-katenin sinyalizasyonunu aktive edebildiği ve anjiyogenez üzerinde önemli etkilere sahip olabileceği ileri sürülmüştür. Aoki ve arkadaşları, mutant RSPO3 alleli taşıyan fare modelleri oluşturmuş ve homozigot mutant farelerin yaklaşık embriyonik 10. günde plasentanın labirent tabakasındaki hasar nedeniyle öldüğünü keşfetmişlerdir. Bu çalışma sonucunda, RSPO3'ün kan damarlarının oluşumu ve gelişimini etkileyebileceğini ileri sürmüşlerdir (Aoki ve ark., 2007). Kazanskaya ve arkadaşları RSPO3 gen ekspresyonunun Xenopus embriyolarında

azaltılmasının vasküler sistemde birtakım kusurlara yol açtığını ortaya koymuşlardır ve bu durumun RSPO3 düzenlemesinin anjiyoblast ve kan hücresi spesifikasyonu arasındaki ilişkinin hayati olduğunu öne sürmüşlerdir. Benzer şekilde, farelerde RSPO3 geninin tamamen susturulmasının vasküler kusurlara ve ölüme neden olduğu bulunmuştur. Ayrıca, RSPO sinyallerinin insan endotelyal hücrelerinde proliferasyonu ve anjiyogenezi artırabildiğine dair çaışmalar mevcuttur (Kazanskaya ve ark., 2008). Yapılan in vivo çalışmalarda, kültür koşulları altında, RSPO1'in tek başına testis anjiyogenezini teşvik etmek için yeterli olduğu kanıtlanmıştır (Caruso ve ark., 2015). Bu çalışmalar sonucunda, RSPO3, hayati ve evrimsel olarak korunan bir anjiyogenik faktör olarak tanımlanmıştır.

2.4.3.3. İskelet gelişimi

İskelet gelişimi Wnt/β-katenin sinyal yolağı tarafından düzenlenir. Wnt/β-katenin sinyali, osteoprotegerin (OPG) gen ifadesinin gelişimini, farklılaşmasını ve aktivasyonunu teşvik ederek kemik gelişiminin kontrolünü sağlar (Glass DA ve ark., 2005). Bell ve arkadaşları, kanonik Wnt/β-katenin sinyal yolağı aracılığıyla LRP6 tarafından aracılık edilen RSPO2'nin, solunum yolu ve uzuvların farklılaşmasını ve büyümesini sağladığını göstermişlerdir (Bell ve ark., 2008). RSPO'ların, farelerin gelişmekte olan ve postnatal iskelet dokularında yüksek oranda eksprese edildiği bildirilmiştir. RSPO'ların osteoblast farklılaşmasını teşvik ettiği ve RSPO2'nin eksikliğinin, kemik gelişiminde kusurlara yol açtığı kanıtlanmıştır (Hankenson, Sweetwyne, Shitaye, & Posey 2010). Han ve arkadaşları, RSPO'ların iskelet kası hücrelerinin gelişiminde Wnt/β-katenin sinyal yolağı aktivatörleri olduğunu araştırmıştır. Özellikle, RSPO2 geninin eksikliğinde, fare embriyolarının gelişen uzuvlarında MYF5'in ekspresyonunun azaldığı gözlemlenmiştir (Han, Jin, Seto, & Yoon 2011). Ayrıca, yapılan başka bir çalışmada, RSPO2 geninin knockout edilmesinin farelerde iskelet büyümesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Knight ve ark., 2018). Doherty ve arkadaşları, Wnt ile ilişkili reseptör olarak da bilinen LGR'nin RSPO ligandlarıyla etkileşime girdiğini ve kemik ve diş biyolojisinde önemli bir rol oynadığını belirtmişlerdir (Doherty, & Sanjay, 2020).

2.4.3.4. Sindirim sistemleri ve solunum sistemi

Son zamanlarda yapılan birtakım çalışmalar, RSPO'ların hem sindirim hem de solunum sistemlerinin gelişiminde önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur. Örneğin, yapılan in vitro bir çalışma, rekombinant insan RSPO1 (rhRSPO1) tedavisinin fare bağırsak organoid kültürünü iyileştirdiğini ve sağ kalım oranlarını artırdığını öne sürmüştür. hRSPO1, çeşitli dokuların bağırsak endokrin ve epitel hücrelerinde eksprese edilmektedir ve ayrıca kemoterapi kaynaklı bağırsak mukozit modeli üzerinde etkinlik göstermiştir (Levin ve ark., 2020). Zhao ve arkadaşları rekombinant RSPO1 proteinini in vitro olarak farelere enjekte ederek dil, mide, karaciğer, akciğer, ince bağırsak, kalın bağırsak, deri ve gonadlara olan etkisini test etmiştir. Sonuçlara göre RSPO1, dil mukozasındaki bazal epitel hücrelerinin Wnt/β-katenin sinyal yolağı aracılığıyla proliferasyonunu arttırmıştır (Jingsong ve ark., 2009). Ek olarak, başka bir çalışmada kültür ortamında RSPO eksikliğinde in vitro tat tomurcuğu hücrelerinin çoğalamadığı bildirilmiştir, bu da RSPO'nun farklılaşmış tat hücrelerinin çoğalması için gerekli olduğunu göstermektedir.

LGR5, hem Wnt/β-katenin hem de Wnt/PCP sinyal yolağını düzenleyen RSPO reseptörüdür. Harnack ve arkadaşları, RSPO3'ün farklılaşmış hücrelerde Wnt sinyal yolağı aracılığıyla epitel onarımında anahtar bir unsur olduğunu göstermiştir (Harnack ve ark., 2019). Axin2, Wnt sinyal yolağının bir belirteci olup, RSPO3 hem Axin2 hem de LGR5'in ekspresyon sürecine katılmaktadır. Sigal ve arkadaşları, RSPO3 geninin yokluğunun mide bezlerinde Helicobacter pylori (H. pylori) hiperkolonizasyonuna yol açtığını kanıtlamıştır. LGR5þ hücrelerinin eksikliği benzer sonuçlar vermiştir ve stroma içinde RSPO3'ün aşırı ekspresyonu, H. pylori'nin mide bezlerinden temizlenmesini sağlamıştır. Bu sonuçlara göre, RSPO3/LGR5 sindirim sistemi mukozasının rejenerasyonunu düzenleyebilir ve savunma yeteneklerini geliştirebilir (Sigal ve ark., 2019). Yan ve arkadaşları, Wnt ve RSPO ligandlarının bağırsak kript kök hücrelerinin koordinasyonunda rolü olduğunu belirlemiştir. Wnt proteini, RSPO reseptörünün ekspresyonunun korunmasını ve RSPO ligandlarının LGR5'in kendini yenilemesini sağlamıştır (Yan ve ark., 2017). Greicius ve arkadaşlarının bir raporu, RSPO3'ün lamina proprianın perikriptal myofibroblastlarında eksprese edildiğini ve bunun kanonik Wnt/β-katenin sinyal yolağını ve organoid proliferasyonunu önemli ölçüde tetikleyebileceğini göstermiştir. RSPO3'ün in vitro olarak çözülmesi, organoid

büyümesinde önemli bir azalmaya yol açmıştır, eksojen olarak verilen RSPO3 proteini büyüme hızını geri kazandırmıştır (Greicius ve ark., 2018). Liu ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, hepatositlerin RSPO3 ile ön işlemden geçirildikten sonra hipoksi/reoksijenasyon (H/R) hasarına daha az duyarlı olduğu doğrulanmıştır. LGR4'ün devre dışı bırakılması, RSPO3'ün koruyucu etkilerini zayıflatarak, RSPO3/LGR4'ün, β-katenin'i uyararak hepatositleri H/R hasarından koruduğu ileri sürülmüştür (Liu, Yin, Yu, Li, & Zhang 2018).

Solunum sisteminde, Nam ve arkadaşları RSPO2 geninin silindiği transgenik farelerin akciğer gelişimi kusurlarına sahip olduğunu kanıtladılar (Nam ve ark., 2007). Bell ve arkadaşlarının RSPO2 genini silerek yaptıkları başka bir çalışmada, transgenik farelerin akciğer hipoplazisi geliştirdiği ve trakeobronşiyal halka ve laringeal yapılarda bozulmalar olduğu keşfedilmiştir (Bell ve ark., 2008). İn situ hibridizasyon tekniği kullanılarak yapılan bir çalışmada, akciğer kanseri dokularının RSPO1, RSPO2 ve RSPO3'ü mRNA düzeyinde eksprese ettikleri gösterilmiş ve bu ekspresyonun normal doku örneklerindeki düzeylerden belirgin şekilde daha düşük olduğu bulunmuştur (Wu ve ark., 2019). Munguıa-Reyes ve arkadaşları RSPO2 ve reseptörü LGR6'nın yukarı regüle edilmesinin idiyopatik pulmoner fibrozisli (İPF) hastaların akciğerlerindeki fibroblastlarda ve epitel hücrelerinde meydana geldiğini bulmuşlardır (Munguía-Reyes ve ark., 2018).

2.4.4. RSPO1 ve RSPO3'ün beslenmeyi düzenleyen sistemlerle olan ilişkisi

R-spondin (RSPO) ailesi proteinleri LGR'ler için potansiyel endojen ligandlar olarak tanımlanmıştır (Carmon ve ark., 2011; de Lau, Snel, & Clevers 2012; Ohkawara ve ark., 2011; Ruffner ve ark., 2012). Bu proteinler, LGR4, LGR5 ve LGR6 reseptörlerine bağlanarak hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını ve yetişkin kök hücre homeostazını düzenlemek için Wnt/β-katenin sinyali aracılığıyla işlev görürler (Carmon ve ark., 2011; J. Lau, & Herzog, 2014; Ohkawara ve ark., 2011; Ruffner ve ark., 2012). G protein-bağlı reseptörler (GPCRs) çeşitli uyaranlara (örneğin; ışık, koku veren odorant maddeler, tat molekülleri, lipid analogları, aminler, nükleotitler, peptitler ve protein hormonlar) yanıt veren ve bu sinyalleri heterotrimerik G proteinlerinin aktivasyonu yoluyla hücre içine ileten transmembran proteinlerdir (Joost, & Methner, 2002). GPCRs'leri içeren lösin bakımından zengin tekrarlar

(LGRs), kendine özgü bir protein mimarisi ile karakterize edilen ayrı bir alt grup oluştururlar. Bu proteinlerin memelilerde, glikoprotein hormonlardan gonadotropinler [folikül uyarıcı hormon (FSH), lüteinize edici hormon (LH), koryogonadotropin (CG)] ile tiroid uyarıcı hormonun (TSH) aktivitesine aracılık ettiği, üreme ve metabolizmanın endokrin düzenlenmesinde rol aldığı uzun yıllardır bilinmektedir (Grossmann, Weintraub, & Szkudlinski 1997; Themmen, & Huhtaniemi, 2000; Van Loy ve ark., 2008). Filogenetik analizler, A, B ve C alt tipleri olmak üzere üç farklı LGR tipinin varlığını göstermiştir. A alt tipi; glikoproteinler için gerekli olan hormonları içerirken, B alt tipi insan orphan reseptörlerini, C alt tipi ise insan relaksin-ilişkili proteinler için gerekli olan reseptörleri içerir (Van Loy ve ark., 2008). B alt tipi, amino asit dizilerinde %50 benzerlik olan LGR4, LGR5 ve LGR6 ligandları ile karakterize edilmektedir (Hsu, Liang, & Hsueh 1998; McDonald ve ark., 1998). Lösin'den zengin, tekrar içeren G protein-bağlı reseptör 4 (LGR4), böbrekler, saç folikülleri, üreme organları, meme dokusu ve diş hücreleri dahil olmak üzere birçok organ ve dokuda yaygın olarak eksprese edilir (Kato ve ark., 2006; Koizumi ve ark., 2015; Mohri, Kato, Umezewa, Okuyama, & Nishimori 2008; Oyama, Mohri, Sone, Nawa, & Nishimori 2011; Yamakami ve ark., 2016). LGR4 ayrıca gıda alımı, enerji harcaması ve lipid metabolizmasının yanı sıra pankreas β-hücresi proliferasyonu ve insülin sekresyonu dahil olmak üzere enerji metabolizmasının düzenlenmesine katkıda bulunur (Z. Li, Zang, & Mulholland 2015). LGR4 geni eksik knock-out farelerde yapılan araştırmalarda, perinatal aşamadaki hayvanların hayatta kalması ve büyümesi için LGR4 sinyal sisteminin gerekliliği gösterilmiştir (Kato ve ark., 2006; Mazerbourg ve ark., 2004). Bir başka çalışmada, LGR4 ekspresyonu serebellar Purkinje hücrelerinde gösterilmiş olmakla beraber, araştırmacılar tarafından LGR4'ün beyincikteki nöral hücrelerin gelişimini ve farklılaşmasını düzenleyerek motor aktiviteyi modüle edebileceği bildirilmiştir (Guan ve ark., 2014). LGR4 ekspresyonu ayrıca olfaktör bulbus, korteks, hipokampus, amigdaloid çekirdekler ve hipotalamusta tespit edilmiştir (Van Schoore, Mendive, Pochet, & Vassart 2005). Hipotalamik çekirdeklerden arkuat çekirdekte, LGR4'ün yüksek orandaki ekspresyonu gösterilmiştir (J. Y. Li ve ark., 2005). LGR5 ince bağırsak ve kolonda lokalize kök hücrelerde (Barker ve ark., 2007), LGR6 ise saç köklerindeki hücrelerde kök hücre belirteci olarak tanımlanmıştır (Snippert ve ark., 2010).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, gıda alımı ve obeziteden lipid metabolizmasına kadar değişen alanlarda LGR4 ile enerji metabolizması arasında bir ilişki olduğunu da ortaya koymuştur. Li ve arkadaşlarının yapmış oldukları in situ hibridizasyon çalışmalarında, LGR4 mRNA'sı ve ligandlarının (RSPO1 ve RSPO3) hipotalamusun enerji homeostazı ve beslenme davranışı ile ilgili alanlarından olan arkuat çekirdek, ventromedial çekirdek ve median eminens'te mRNA düzeyinde eksprese edildiği ve bu moleküler ilişkinin besin alımının regülasyonunda rol oynadığı bildirilmiştir (J. Y. Li ve ark., 2014). Ayrıca LGR4'ün ventromedial çekirdekteki ekspresyon paterni, beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) ile örtüşmektedir (Larsen, Hay-Schmidt, Ronn, & Mikkelsen 2008). Yine in situ hibridizasyon tekniğinin kullanıldığı bir başka çalışmada, LGR4 mRNA'sının korteks, hipokampus, amigdala ve hipotalamusta yüksek oranda eksprese edildiği ortaya koyulmuştur. LGR4 mRNA'sı kortekste tabaka II ve III'te, hipokampus'te CA1, CA2, CA3 bölgelerinde, dentat gyrusta (DG) ve epitalamusun habenular çekirdeğinde (Hbs) eksprese edilmektedir (Van Schoore ve ark., 2005). RSPO1 eksprese eden nöronlar, ilgili antikor kullanımıyla immunohistokimyasal teknikle, supraoptik çekirdek (SON), anterior paraventriküler çekirdek (PVN), lateral hipotalamik alan (LH), ventromedial çekirdekte (VMH), arkuat çekirdek (ARC) suprakiazmatik çekirdek (SCh), periventriküler hipotalamik çekirdek (PeV), anterior hipotalamik alan ve magnoselüler preoptik çekirdekte (MCPO) gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada RSPO3'ü eksprese eden nöronlar, SON, PVN, ARC, VMH, SCh, Pev, LHA, zona inserta (ZI) ve anterior parvisellüler çekirdekte immunohistokimyasal olarak gösterilmiştir (Yurtseven Gok, Coskan, Topal, Hasanoglu Akbulut, & Eyigor 2023).

R-spondinlerin i.s.v. enjeksiyonu sonrasında, sıçan arkuat çekirdeğinde anoreksijenik peptit pro-opiomelanokortin'in (POMC) mRNA ekspresyon düzeyinin arttığı, oreksijenik peptit Nöropeptit-Y'nin (NPY) mRNA ekspresyonunun ise azaldığı rapor edilmiştir (J. Y. Li ve ark., 2014). Lgr4 geni knockout (LGR4 cKO) fare modelinin kullanıldığı bir başka çalışmada, POMC ekspresyonu azalırken, NPY ekspresyonunun etkilenmediği bildirilmiştir. Wild tipi farelere RSPO1'in i.s.v. enjeksiyonu sonrasında ise ARC'de lokalize anoreksijenik POMC nöronlarının c-Fos aktivasyonu gösterdiği tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada, ARC'de LGR4 geninin koşullu olarak silinmesinin RSPO1'in anoreksijenik etkilerini ortadan kaldırdığını

göstermişlerdir (Otsuka ve ark., 2019). Li ve arkadaşlarının 2019 yılında yaptığı bir çalışmada, arkuat çekirdekte lokalize kokain ve amfetaminle düzenlenmiş transkripti (CART) içeren nöronların hem LGR4'ü hem de insülin reseptörünü eksprese ettiği, RSPO1'in i.s.v. enjeksiyonu sonrasında bu nöronlardaki c-Fos ekspresyonunun indüklendiği, CART'ın susturulması sonucunda da RSPO1'in anoreksijenik etkilerinin azaldığı gösterilmiştir (Li, Wu, Lee, Zhou, & Owyang 2019). Yine aynı çalışmada, diyabetik hayvanlarda ve insüline dirençli obez sıçanlarda VHM'deki RSPO1'in ekspresyonunun mRNA düzeyinde azaldığı gösterilmiştir. Bu duruma karşı insülin tedavisinin RSPO1 ekspresyonunu normalleştirdiği ve diyabete bağlı hiperfajiyi ortadan kaldırdığı keşfedilmiştir. RSPO1ve RSPO3 peptit seviyelerinin açlıkla down-regüle edilirken, tokluk faktörü insülinle up-regüle edildiği gösterilmiştir. RSPO1 veya RSPO3'ün i.s.v. enjeksiyonundan sonra gözlenen besin alımının inhibisyonu bu kavramı desteklemektedir (J. Y. Li ve ark., 2014). RSPO1, besin alımını inhibe etmede RSPO3'ten daha potent olup, daha yüksek bir afinite ile LGR4'e bağlanmaktadır (Carmon ve ark., 2011).

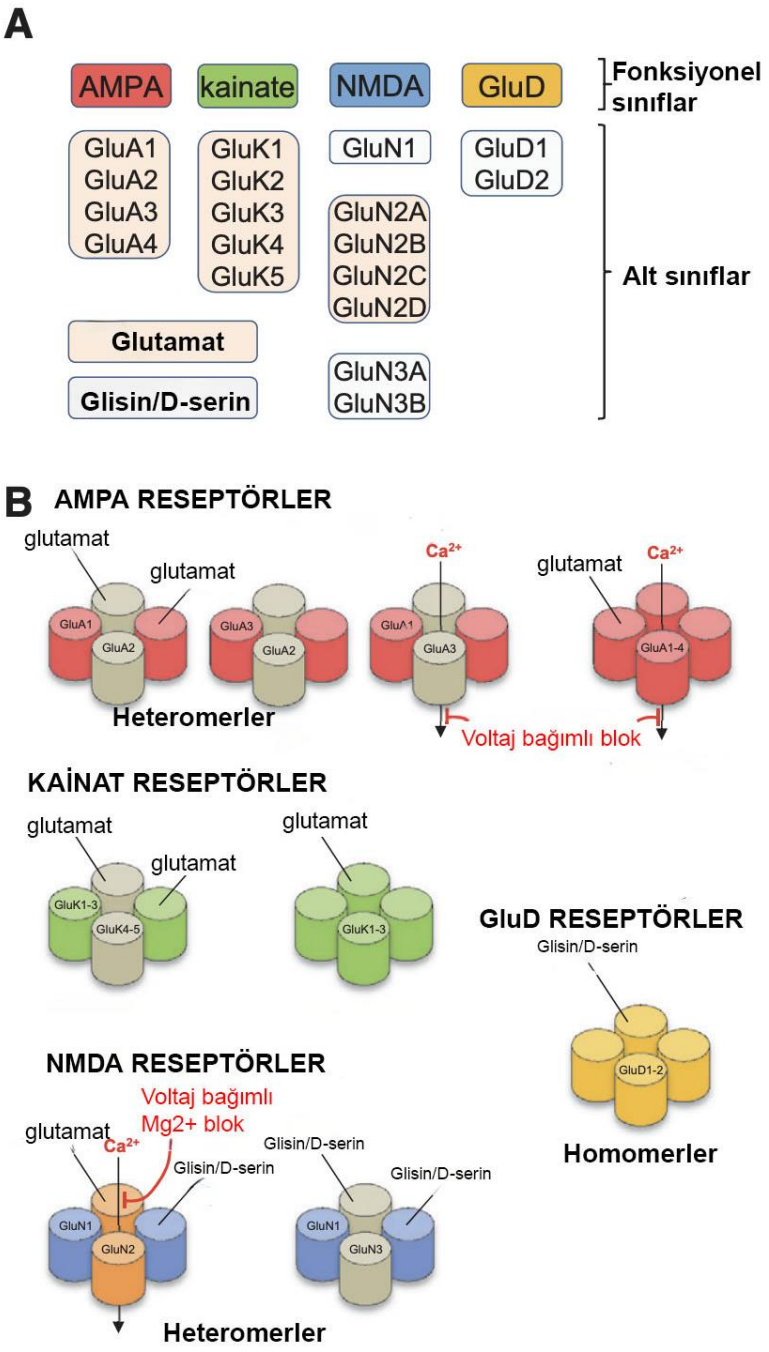
2.5. Glutamat ve Glutamat Reseptörleri

Merkezi sinir sistemindeki (MSS) eksitatör etkisi 1950'li yılların ortalarında keşfedilen glutamat, çoğu intraselüler kompartmanda yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Yapılan çalışmalar, glutamat ve aspartatın MSS'de işlev gören major eksitatör aminoasit nörotransmitterler olarak rol oynadığını göstermiştir (Brann, 1995; Brann, & Mahesh, 1994; Kew, & Kemp, 2005; Meldrum, 2000; Wollmuth, & Sobolevsky, 2004). Kan-beyin bariyerini aşamadığı bilinen glutamat, beyinde glikozdan sentezlenir ve nöral glutamat sentezi 2 faklı şekilde gerçekleşebilir. Birinci olarak glutamat, glikozun yıkımlanması sonucu oluşan ve Krebs siklüsüne giren asetil-CoA'nın geçirdiği bir seri kimyasal reaksiyon sonucu dönüştüğü α ketoglutaratın transaminasyonu sonucunda sentezlenebilir. İkinci olarak da, glutaminaz enziminin enzimatik aktivasyonu, glutamin taşıyıcılarının aktivitesi, glutamatın ekstraselüler boşluktan geri alım mekanizmalarının gerçekleşmesi sonucu glutaminden de sentezlenebilir (Erecińska, & Silver, 1990). Glutamaterjik sinapslar, presinaptik sinir terminalleri ile postsinaptik dendritik çıkıntılar veya komşu sinir uçları arasındaki eksitatör geçiş yerleri olarak tanımlanır (Niciu ve ark., 2012). Glutamat, presinaptik

terminallerde var olan veziküllerden voltaj bağımlı Ca2+ kapılarının bulunduğu mekanizma yardımıyla salınır (Meldrum, 2000). Glutamat sinaptik aralığa salınır ve salınır salınmaz, pre- ya da post-sinaptik membrandaki reseptörlerine bağlanarak onları aktive eder. Glutamat aracılı nörotransmisyon; metabotropik (G-protein bağlı) ve iyonotropik (Ca2+ ve Na+ katyonlarına özgü iyon kanalları içeren) glutamat reseptörleri üzerinden gerçekleşir (Kew, & Kemp, 2005; Kubo, & Ito, 2004). Glutamat reseptörleri, hem inhibitör hem de eksitatör sinaptik iletişime aracılık ederler (Gereau, & Swanson, 2008). İyonotropik glutamat reseptörleri, iyon kanalları oluşturarak hızlı eksitatör postsinaptik potansiyel oluşturur ve nöronal depolarizasyona neden olurlar, metabotropik reseptörler ise nörotransmisyonda modülatör olarak görev alırlar (Köles, Wirkner, & Illes 2001).

2.5.1. İyonotropik glutamat reseptörleri (Ligand–kapılı iyon kanalları)

İyonotropik glutamat reseptörleri, ya sadece Na+ ya da hem Na+ hem de Ca++'a geçirgen ligand kapılı iyon kanalları oluştururlar (Chen, Wei, Lang, Ju, & Chan 2001; Danbolt, 2001). Glutamat ile glutamat agonistlerine yanıt olarak iyonotropik glutamat reseptörlerinde konformasyon değişiklikleri ortaya çıkar ve beraberinde transmembran iyon kanalları açılır (Hollmann, & Heinemann, 1994; Petralia, & Wenthold, 1999). Desensitizasyon ya da glutamat'ın deaktivasyonuyla kanallar spontan olarak kapanır (Kubo, & Ito, 2004). İyonotropik glutamat reseptörleri, glutamat agonistlerine olan bağlanma afiniteleri değerlendirilerek α-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoazolpropionik asit (AMPA), 2-karboksi-3-karboksimetil-4-izopropenilpirolidin (kainat) reseptörleri ve N-metil D-aspartat (NMDA) olmak üzere 3 gruba ayrılırlar (Kew, & Kemp, 2005; Lerma, Paternain, Rodriguez-Moreno, & Lopez-Garciaa 2001; Tse, & Yung, 2000). Bu reseptör ailelerinin herbirine ait alt birimleri aşağıda detaylı olarak verilmiştir. Bu glutamat alt birimleri homomerik (tek bir alt birim) ya da heteromerik (birden fazla farklı alt birim kombinasyonu) olarak iyon kanallarını oluştururlar ve bu kombinasyonlar fonksiyonel reseptör kanallarını içerir (Alt ve ark., 2004; Howe, 1996; Monyer ve ark., 1992) (Şekil 6).



Şekil 6. İyonotropik glutamat reseptörlerinin yapısal ve işlevsel çeşitliliği. (A) İyonotropik glutamat reseptörleri dört işlevsel sınıfa ayrılır: AMPA, kainat, NMDA ve GluD reseptörleri. Bu sınıfların her birinde glutamat veya glisin/D-serin'e bağlanan çoklu alt birimler klonlanmıştır. (B) Ayrı işlevsel sınıflardan gelen alt birimler işlevsel iyon kanalları olarak bir araya gelemezler, ancak her işlevsel sınıf içindeki alt birimler belirli kurallar kümesi tarafından yönlendirilerek bir araya gelebilirler. AMPA reseptör alt birimleri işlevsel homomerler ve heteromerler oluşturabilirler, ancak GluA2 içeren heteromerler MSS boyunca baskındır. Kainat reseptör alt birimleri GluK1-3 işlevsel homomerler ve heteromerler olarak bir araya gelebilirler, ancak GluK4-5 işlevsel reseptörler oluşturmak için GluK1-3 ile birlikte ifade edilmelidir. NMDA reseptörleri, iki GluN1 alt birimi ve iki GluN2 alt birimi (GluN1/2) veya iki GluN3 alt birimi (GluN1/3) içeren heteromerik reseptörlerdir. GluD alt birimleri, iyonotropik sinyalizasyona aracılık edemeyen homomerler oluşturur (Hansen ve ark., 2021)

2.5.1.1. AMPA reseptörleri (GluA)

Glutamat reseptörlerinden AMPA'nın, MSS'deki sinapsların pekçoğunda hızlı eksitatör sinir iletimine aracılık ettiği bilinmektedir (Palmer, Cotton, & Henley 2005). AMPA reseptör alt birimleri yeni nomenklatüre göre GluA1, GluA2, GluA3 ve GluA4 olarak isimlendirilirler ve bunlar alt birimlerinden oluşan heteromerik ya da homomerik konfigürasyondaki (GluA1/GluA2, GluA3/GluA4 veya GluA2/GluA4 gibi) reseptörlerdir (Herguedas ve ark., 2016; Mayer, 2016). Bu alt ünitelerin amino asit dizilimlerinin %70'i benzer yapıdadır (Hollmann, & Heinemann, 1994; Ozawa ve ark., 1998; Seeburg, 1993). Yapısal olarak, AMPA reseptör alt birimleri bir amino-terminal alanı, bir ligand bağlama alanı, pore kanalını oluşturan bir transmembran alanı ve bir karboksil-terminal alanı içerirler (Bessa-Neto, & Choquet, 2023; Diering, & Huganir, 2018; Malinow, & Malenka, 2002; Stockwell, Watson, & Greger 2024). AMPA reseptör alt birimlerinin bilinen potent agonistleri quisqualate, AMPA, glutamat ve kainattır. Quinoxalinedione'lar (CNQX, DNQX, NBQX ve YM90K) ise AMPA reseptörlerinin potent antagonistidir ve kainat reseptörlerini de bloklarlar (Alt ve ark., 2004). AMPA ve kainat reseptörleri, Na+'un (bazı reseptörlerinde ise Ca2+'un) hücre içine alınması ve K+'un ise dışarı verilmesi sonucu sinapsların pekçoğunda hızlı eksitatör nörotransmisyonu sağlar (Petralia, Wang, & Wenthold 1994c; Petralia, & Wenthold, 1992, 1999). AMPA reseptörlerinin intrasellüler Ca2+ geçirgenlikleri, GluA2'nin bulunmasıyla belirlenir (L. W. Chen ve ark., 2001).

2.5.1.2. Kainat reseptörleri (GluK)

Glutamat reseptörlerinden kainat; AMPA reseptörleri için güçlü bir agonisttir ancak bunun yanında, farklı bir sınıf olarak bilinen kainat reseptörleri üzerinde spesifik etkiler gösterir. Kainat reseptörleri yeni nomenklatüre göre GluK1, GluK2, GluK3, GluK4 ve GluK5 olmak üzere 5 alt birimden oluşur (Huettner, 2003; Lomeli ve ark., 1992). Bu beş altbirim, kainat affinitelerine ve yapısal benzerliklerine göre iki gruba ayrılırlar (Bleakman, Gates, Ogden, & Mackowiak 2002; Pinheiro, & Mulle, 2006): GluK1–3 düşük afiniteye sahip kainat reseptör alt birimleridir ve yapısal benzerlik oranları %75–80'dir. GluK4 ve GluK5 ise yüksek affiniteli grubu oluşturur ve %68 oranında yapısal benzerlik gösterirler. Bu iki grup %45 oranında benzerlik gösterir (Conti, Amici, & Micheli 2002). GluK1–3, tek başına homomerik kanal yapısı

oluşturabilme yeteneğine sahipken, GluK4 ve GluK5, sadece diğer alt birimlerle (GluK1–3) birlikte eksprese edildikleri zaman kanal oluşturabildikleri bildirilmiştir (Frerking, & Nicoll, 2000; Lerma ve ark., 2001). Böylece, alt birimlerin değişik kombinasyonları ile fonksiyonel olarak farklı çok sayıda kainat reseptörü oluşur (Conti ve ark., 2002). AMPA ve kainat reseptörleri non-NMDA reseptörleri olarak da sınıflandırılırlar ve bu reseptörlerin her ikisiyle de etkileşime girebilen birkaç agonist ve antagonisti ortak kullandığı bildirilmiştir (Lerma, 2003). Hem heteromerik hem de homomerik kainat reseptörleri, kainat, quisqualate ve glutamata yanıt verirler ve quinoxalinedione'lar ile inhibe edilirler. Ancak, bu reseptörlerin desensitizasyonlarının (yanıtlarının) AMPA reseptörleri ile karşılaştırıldığında daha düşük olduğu bildirilmiştir (Ozawa ve ark., 1998). Kainat reseptörlerinin diğer iyonotropik reseptörlerden farklı olarak, çoğunlukla aynı nöronda olmak üzere, presinaptik ve postsinaptik lokalizasyonlara sahip olduğu gösterilmiştir (Kamiya, 2002). Presinaptik kainat reseptörleri, glutamat ve diğer transmitterlerin salınımını düzenlerken, eksitatör sinaptik transmisyonu ise postsinaptik kainat reseptörleri düzenler (Huettner, 2001, 2003). Kainat reseptörlerinin farklı lokalizasyonlarda farklı subunit kompozisyonlara sahip olduğunu ve bazı durumlarda, yaygın bilinen iyonotropik fonksiyonlarının yanı sıra G protein–bağımlı sinyalizasyon fonksiyonlarının da var olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Isaac, Mellor, Hurtado, & Roche 2004; Rodríguez-Moreno, & Sihra, 2007).

2.5.1.3. NMDA reseptörleri (GluN)

NMDA alt birim reseptörleri yeni nomenklatüre göre GluN1, GluN2A, GluN2B, GluN2C, GluN2D, GluN3A ve GluN3B olarak isimlendirilen 7 alt birimden oluşur (Collingridge, Olsen, Peters, & Spedding 2009; Traynelis ve ark., 2010). NMDA reseptör alt birimlerinin homomerik reseptör kanalları oluşturamadıkları bilinmektedir. GluN1 ve GluN2 alt birimlerini içeren NMDA reseptörlerinin aktivasyonu için iki agonistin (glutamat ve glisin), glutamatın GluN2 alt biriminin S1 ve S2 bölgelerine ve glisinin ise GluN1 alt biriminin S1 ve S2 bölgelerine bağlanması gerekir (Chen, & Wyllie, 2006; Erreger, Chen, Wyllie, & Traynelis 2004). NMDA reseptörlerinin *in vitro* fonksiyonel anlamda eksprese olabilmeleri için minimum düzeyde zorunlu olarak hücre dışı alanda heterodimer düzeninin bir dimeri olarak

GluN1'i ve en az bir GluN2 alt birim varyantının di-heteromerik birleşimini içeriyor olmaları gerekir (Karakas, Simorowski, & Furukawa 2011; Mayer, 2016; Mori, & Mishina, 1995; Nakanishi, 1992). Ancak, GluN2 alt biriminin birden fazla alt tipini veya GluN3 alt birimlerini içeren daha karmaşık tri-heteromerik düzenekler in vitro olarak üretilebilir ve in vivo olarak meydana gelebilir. NMDA reseptör komplekslerinin, biyofiziksel ve farmakolojik özellikleri, allosterik modülatörler ile antagonistlere duyarlılıkları, yapılarında bulunan alt birimlerin kompozisyon değişikliğine göre farklılık gösterir. Bu bilgiler doğrultusunda, reseptörlerin alt birim kompozisyondaki değişimler NMDA reseptörlerinin fonksiyonel özelliklerini de belirlediği bildirilmiştir (Cull-Candy, Brickley, & Farrant 2001; Mayer, 2016; Pachernegg, Strutz-Seebohm, & Hollmann 2012; Paoletti, 2011). NMDA reseptörleri, AMPA reseptörlerinden farklı bir şekilde MSS'deki eksitatör sinir iletimine aracılık ederler. Ca2+'a yüksek geçirgenlik gösterirler, Mg2+ ile voltaj-bağımlı şekilde bloklanabilir ve yavaş aktivasyon ya da deaktivasyon kinetikleri ile karakterize edilmiş reseptörler olarak bilinirler (Lester, Clements, Westbrook, & Jahr 1990; Macdermott, Mayer, Westbrook, Smith, & Barker 1986; Mayer, Westbrook, & Guthrie 1984; Nowak, Bregestovski, Ascher, Herbet, & Prochiantz 1984). NMDA reseptörlerinin üzerinde ko-ligandların, katyonların (Mg2+, Zn2+ ve H+), poliaminlerin ve de disosiyatif anesteziklerin (ketamin) bağlanabildiği en az 6 bağlanma bölgesi tanımlanmıştır. Glutamat/aspartat ve glisin NMDA reseptörlerinin potent agonistleri olarak bilinir ve glutamat, aspartat ile kıyaslandığında NMDA reseptörlerini daha güçlü stimüle eder. Antagonistleri ise dizocilpine (MK-801), fensiklidin (PCP), ketamin, dexanabinol, xenon ve agmatindir (Balla, Koneru, Smiley, Sershen, & Javitt 2001; Javitt ve ark., 2004; Krystal ve ark., 1994; Moghaddam, & Adams, 1998; Patil ve ark., 2007; Umbricht ve ark., 2000). NMDA reseptörlerinin, plastisite, nörotoksisite ve eksitatör sinaptik transmisyon olaylarında kritik öneme sahip olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Cull-Candy ve ark., 2001; Ozawa ve ark., 1998).

2.5.2. Glutamat, glutamat reseptörleri ve hipotalamus

Hipotalamusun nöroendokrin bölgelerine uygulanan glutamat reseptör agonistleri ve antagonistleri, endokrin salgılar üzerinde çok sayıda etki gösterir ve incelenen tüm nöropeptitlerin salınımında etkileri olduğunu gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur

(Belousov, & Van Den Pol, 1997). MSS ve hipotalamustaki glutamat reseptörlerinin mRNA ve protein düzeylerindeki dağılımını gösteren çalışmalar da bu verileri destekler niteliktedir (Eyigor, Centers, & Jennes 2001, 2005; Martin ve ark., 1993; Petralia, Wang, & Wenthold 1994a; Petralia, Yokotani, & Wenthold 1994b; Petralia, & Wenthold, 1992). Glutamatın hipolalamustaki dağılımı ile ilgili ultrastrüktürel düzeyde yapılan çalışmalarda, ventromedial (VMH) nükleus, ARC, suprakiazmatik nükleus (SCN), parvisellüler ve magnosellüler paraventriküler (PVN) nukleuslarda presinaptik butonlarda glutamat immunopozitifliği gösterilmiştir (Van Den Pol, 1991; van den Pol ve ark., 1990). İmmünoreaktif glutamat aksonlarının tüm mediobazal hipotalamus bölgelerindeki dentritik uzantılar ve hücre gövdeleri ile temas ettiği (van den Pol ve ark., 1990). SON'de lokalize olan magnosellüler nöroendokrin hücrelerdeki sinaptik girdilerin üçte birinden fazlasının glutamatı eksprese ettiği kanıtlanmıştır (Goldsmith, Thind, Perera, & Plant 1994). İmmünohistokimyasal ve insitu hibridizasyon çalışmaları ile AMPA reseptör ailesinden GluA1 ve GluA2'nin protein düzeyinde ve mRNA düzeyinde hipotalamusta ARC, SON, PVN, medial preoptik nukleus (MPO) ve SCN'de gösterilirken, GluA3 ve GluA4 alt birimlerinin hipotalamusta daha düşük yoğunlukta eksprese edildiği bildirilmiştir (Brann, & Mahesh, 1994; Eyigor ve ark., 2001; Van Den Pol, 1991). Sıçan hipotalamusunda, korteks gibi beyin bölgeleriyle karşılaştırıldığı zaman orta derecede NMDA reseptör bağlama alanları gösterilmiş (Bran, Zamorano, Chorich, & Mahesh 1993; Cotman, Monaghan, Ottersen, & Storm-Mathisen 1987) olmakla birlikte bu oranın non-NMDA reseptörleri (AMPA ve kainat) ile karşılaştırıldığında daha düşük olduğu bildirilmiştir (Cotman ve ark., 1987). GluN1 ve GluN2 alt birim reseptörlerinin SON'deki ekspresyon paternlerinin mRNA ve protein düzeyinde araştırıldığı bir çalışmada; GluN1, GluN2B ve GluN2D alt birimlerinin oldukça güçlü, GluN2A alt biriminin ise diğer altbirim reseptörlerine göre daha zayıf bir ekspresyon paterni sergilediği gösterilmiştir (Doherty, & Sladek, 2011). Sıçan ve maymun hipotalamusunda yapılan çalışmalarda, kainat reseptörlerinin NMDA reseptörlerine benzer ekpresyon paterni sergiledikleri gösterilmiştir (Cotman ve ark., 1987). Kainat reseptörlerinin, preoptik seviyede ve mediobazal hipotalamusta ise özellikle median eminens ve ARC'de yoğun olarak gözlendiği bildirilmiştir (Cotman ve ark., 1987; Eyigor ve ark., 2001). Kainat reseptör altbirimlerinin immünohistokimyasal olarak değerlendirildiği çalışmalarda,

GluK1 reseptör proteininin, anteroventral periventriküler nukleus (AVPV), SCN, PVN, SON, ve ekspresе olduğu (Eyigor ve ark., 2005), GluK5 ve GluK2 reseptör proteinlerinin hipotalamusta yaygın olarak bulunmasına karşın ekpresyonun özellikle AVPV, PVN'nin posterior magnosellüler ve medial parvisellüler bölümünde, SCN ve ARC'de (Minbay, & Eyigor, 2020) yoğun olduğu gösterilmiştir. Laboratuvarımızda yapılan, hipotalamusta lokalize nöronlardaki glutamat reseptör ailelerinin tüm alt birimlerinin immünohistokimyasal yöntemle protein düzeyindeki ekspresyonlarını belirlemeyi amaçladığımız çalışmamızda, AMPA reseptör alt birimlerinden GluA1 ve GluA2'nin hipotalamusta yaygın olarak ekspresе olduğu, GluA3 ve GluA4 ekspresyonunun ise çok sınırlı olduğu bulunmuştur. Aynı çalışmada kainat reseptör alt birimlerinden GluK5'in ekpresyonunun çok yaygın olduğu ve GluK1/2/3 ekprese eden nöronların daha sınırlı olduğu, NMDA reseptör alt birimlerinden GluN1'in ise hipotalamusta yoğun olarak ekspresе olduğu gösterilmiştir (Gök Yurtseven, Topal, Minbay, & Eyigör 2021).

2.5.3. Glutamaterjik sistem ve besin alımı

Glutamatın, hipotalamusta besin alımının regülasyonunda önemli rol oyanayan lateral hipotalamik alandaki akson terminallerinde bulunduğu ve LHA nöronlarının bazı glutamat reseptör alt birimlerini ekprese ettiği bildirilmiştir (Van Den Pol, & Trombley, 1993). Sıçanlarda yapılan bir çalışmada, LHA'ya direkt olarak enjekte edilen Kainik asit, AMPA veya NMDA'nın, doza bağımlı bir sekilde besin alımını uyardığı gösterilmiştir (Glenn Stanley, Ha, Spears, & Dee 1993). AMPA reseptör agonistleri ve antagonistlerinin sıçanlara i.s.v. olarak verildiği çalışmalarda, hedeflenen bölgelere bağlı olarak besin alımını indüklediği ya da baskıladığı bildirilmiştir. Birkaç çalışma, CNQX ve NBQX'in perifornik hipotalamik bölgelere veya PVN'ye enjekte edildiğinde doza bağlı bir şekilde beslenmeyi indüklediği, AMPA enjeksiyonunun ise LHA'ya enjekte edildiğinde besin alımını arttırdığını göstermiştir (Hettes ve ark., 2003, 2010). Bu verilerle uyumlu olarak, besin alımı ve gıda kısıtlamasının beynin farklı bölgelerindeki AMPA reseptör altbirim ekspresyonlarını belirgin şekilde düzenlediği öne sürülmüştür. Örneğin, kısa süreli yüksek yağlı bir diyetin hipotalamusta GluA1 ve GluA2 ekspresyonunu ve GluA1 fosforilasyon seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (Liu ve ark., 2021). Bunun aksine,

DNQX'in uygulanması veya nucleus accumbens'teki GluA1 alt biriminin spesifik olarak bloke edilmesinin besin alımını indüklediği bildirilmiştir (Carr, Cabeza De Vaca, Sun, & Chau 2009). SON'de lokalize nesfatin-1 nöronlarının, yeniden beslenme veya i.p. glikoz enjeksiyonu ile aktive edildiği bir çalışmada, CNQX enjeksiyonunun aktive olan nesfatin-1 nöron yüzdesini büyük ölçüde azalttığı gösterilmiştir (Kocoglu ve ark., 2022). Başka bir çalışmada, nucleus accumbens'teki MCHR1 aktivitesinin hem farmakolojik hem de genetik manipülasyonlarından sonra, GluA1 yüzey ekspresyonunda ve GluA1 fosforilasyon seviyelerinde bir azalmaya paralel olarak beslenme davranışlarını indüklediği gösterilmiştir (Sears ve ark., 2010). Arka beyine NMDA glutamat reseptör antagonistlerinin uygulanmasının, i.p. CCK-8 enjeksiyonundan sonra besin alımının baskılanmasını engellediği kanıtlanmıştır (Campos, Wright, Czaja, & Ritter 2012). NTS'de besin alımının baskılanmasının, MC4R aktivasyonuna ve bu durumu takiben NMDA reseptörlerini içeren (NR2A/B) PKA-bağımlı mekanizmaya bağlı olarak sağlandığı ileri sürülmüştür (Campos, & Ritter, 2015). Leptin aracılı sinyallemenin, hipokampüste nöronal uyarılabilirliği ve sinaptik plastisiteyi etkilemek için NMDA ve AMPA reseptörlerini modüle ettiği gösterilmiştir (Gavello, Carbone, & Carabelli 2016). Bütün yapılan çalışmalardan elde edilen veriler, beslenmenin regülasyonunda glutamatın önemli bir etkisi olduğunu ve bu süreçte rol oynayan mekanizmalara AMPA, kainat ve NMDA reseptörlerinin aracılık ettiğini göstermektedir.

2.6. Nöronal Aktivasyon Belirteci c-Fos

Gen ifadesinin düzenlenimi için her canlı organizmada bulunan transkripsiyon faktörleri, nöronal uyarımı, nöronal işlevi, nöronal gelişimi ve uzun vadeli sinaptik plastisiteyi düzenleyen nörogenezde aktif rol oynayan spesifik proteinlerdir. Bir nöron büyük miktarda sinaptik input aldığında, voltaj kapılı kalsiyum kanallarını veya kalsiyum iyonları sinaptik reseptörlerini kullanarak nöronlara doğru akar. Bu akış, birçoğu kalsiyum-bağımlı kinaz kaskadını aktive eden ve hedef genlerin indüksiyonunu hızla tetikleyen bir dizi transkripsiyon faktörünü aktive eder (Bito, Deisseroth, & Tsien 1997; Flavell, & Greenberg, 2008; Kawashima, Okuno, & Bito 2014)

‘‘Immediate-Early’’ genleri (IEG'ler), belirli ve yakın bir uyarana yanıt olarak hemen aktive olan ve c-Fos durumunda olduğu gibi yeni proteinlerin sentezini gerektirmeyen bir grup genden oluşur. *c-fos* geni, Fos adı verilen bir nükleer proteini kodlar ancak aktivasyonu, kinazlar tarafından aracılık edilen bir fosfat grubunun eklenmesiyle değişir. c-Fos ailesinin üyeleri, hücre farklılaşması ve proliferasyonu, motor kontrolü, öğrenme ve bilişle ilgili çok sayıda ve çeşitli genin transkripsiyonunu aktivasyonunda rol alan transkripsiyon faktörü AP-1'i oluşturmak amacıyla c-Jun proteiniyle dimerize olur (Cruz-Mendoza, Jauregui-Huerta, Luquin, Aguilar-Delgadillo, & Garcia-Estrada 2022).

IEG’ler, diğer genlerin ekspresyonunu değiştiren transkripsiyon faktörlerini oluşturan hücresel uyarı üzerine hızlı ve geçici olarak aktive edilirler ve davranışsal görevlere yanıt olarak belirli beyin bölgelerinde indüklenirler (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).

Hem nöronlar hem de glialar için *C-fos* geni ve c-Fos proteini, hücresel aktivitenin belirteçleridir ve zararlı ya da zararsız çeşitli uyaranlardan sonra kolayca ifade edilirler, bu da onları çeşitli hayvan modellerinde ve diğer etiketleme teknikleriyle birlikte kullanıldıklarında işlevsel hale getirir.

Aktive olan nöronların fonksiyonel anatomik haritalanmasında, in-situ hibridizasyon tekniği ya da immünohistokimyasal teknikle mRNA seviyesinde veya protein seviyesinde belirlenebilen c-Fos ekspresyonu yaygın olarak kullanılmaktadır. *c-fos'un* bazal ekspresyonu sıçanlar, fareler, maymunlar, kediler ve insanlar dahil olmak üzere birçok türlerde incelenmiştir. mRNA'sının instabilitesi nedeniyle bazal seviyeleri nispeten düşük olsa da, ilk 5 dk içinde transkripsiyonu gerçekleşir ve 15-20 dakikaya kadar devam eder. *c-fos'un* hızlı transkripsiyonu, IEG olarak sınıflandırılmasını sağlamıştır (Morgan, & Curran, 1991; Rahmsdorf ve ark., 1987; Saha, & Dudek, 2013) c-Fos ve *c-fos'un* bazal ekspresyonunun zamanı hücre büyümesi, farklılaşma veya hayatta kalma gibi hücresel fonksiyonlara ve beyin bölgelerine (bazı bölgeler Fos ekspresyonunu yapmaz veya düşük konsantrasyonda

ekspresyon gösterir) göre değişir. Bunlara ek olarak, c-Fos ve *c-fos'un* uyaranlardan sonraki ekspresyonu türe bağlı olarak da değişebilir. *C-fos ve c-Fos'un* bazal ekspresyonuyla ilgili çalışmalar hakkında çok az bilgi olmasına rağmen, bulunan çalışmalar *c-fos* geni (mRNA) ve c-Fos proteininin ekspresyon sürelerinin benzer olduğunu ileri sürmektedir (Aparicio ve ark., 2022).

İmmunohistokimyasal çalışmalarda, deneklere bir uyaran uygulandığında, uygulama sonrası yaklaşık 1,5 saat içerisinde hücrelerde c-Fos immünoreaktivitesi belirlenebilir. Bu hücrelerin fonksiyonel olarak aktivasyonlarının temsili bir siyah nükleer etiket aracılığıyla tanımlanmasına ve ardından kantifize edilmesine olanak sağlamaktadır. *C-fos* ve c-Fos yalnızca hücre aktivasyonunu ölçmek için kullanılır, inhibe edici süreçler için kullanımı uygun değildir. Bununla birlikte, görüntüleme veya in vivo elektrofizyolojik kayıt gibi diğer tekniklerin kullanımı zaman alıcı, zorlayıcı ve pahalıdır. Bu nedenle, *c-fos* ve c-Fos'un kullanımı, in vivo hücre aktivasyonunu değerlendirmek için en yaygın kullanılan yöntemlerden biri olmaya devam etmektedir (Appleyard, 2009).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Tez çalışmasında Sprague/Dawley ırkı 2 aylık (61-62 günlük) erişkin erkek (210-240 g) sıçanlar kullanıldı. Denekler Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Birimi'nden (DENHAB) temin edildi. Deney öncesinde sıçanlar, 4'lü gruplar halinde tutuldu ve su ve yem alımları ad libitum olarak karşılandı. Sıçanların bulunduğu havalandırmalı odaların ısısı 20-24 ^{o}C olacak şekilde sabit tutuldu, aydınlık-karanlık döngüleri aşağıda açıklandığı şekilde değiştirildi. Çalışma için kullanılan yöntemler Bursa Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan etik onay alınarak gerçekleştirildi (Tarih: 07.06.2022, No: 2022-08/08). Beslenme çalışmalarında, deney hayvanları metabolik kafeslerde barındırıldı.

3.2. Deney Hayvanlarının Aydınlık-Karanlık Periyotlarının Değiştirilmesi

Besin alımı ile ilgili sunulan deney protokolünün nokturnal olan deneklerde karanlık periyotta uygulanması gerekmektedir. Bu nedenle deneylere başlamadan önce hayvanlar, Deney Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Birimi'nde aydınlık-karanlık kontrolünün sağlanabileceği düzeneğe sahip bir üniteye alındı. Deneklerin aydınlık-karanlık ritimlerinin yavaş yavaş değiştirilmesi planlandı. Her gün 2 saatlik aralıklarla bu periyotlar ötelenerek aydınlık periyot karanlık, karanlık periyotta aydınlık olacak şekilde süreç yaklaşık bir haftada tamamlandı. Bu şekilde karanlık periyot 7:00-19:00 saatlerine, aydınlık periyot ise 19:00-7:00 saatlerine çekilmiş oldu. Takiben deneklerin yaklaşık 15 gün boyunca yeni periyoda uyum sağlamaları beklendi. Enjeksiyonlar ise sabah 08:00 saatlerinde başlanacak şekilde planlandı.

3.3. Deney Grupları

Her grupta 3 hayvan olacak şekilde deney grupları aşağıdaki şekilde oluşturuldu.

3.3.1. Özgün hedef 1'nin deney grupları

Farklı glutamat reseptör agonistlerinin (Kainik asit, AMPA ve NMDA) ve bu agonistlere özgün antagonistlerin (CNQX ve MK-801) RSPO-1 veya RSPO-3

nöronlarının aktivasyonuna etkisinin gösterilmesi amacına yönelik deneyler aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

Normal beslenen denekler 3 ayrı agonistin araştırılması için her birinde 3 grup olacak şekilde 9 grup oluşturuldu ve her grup için 3 erkek deney hayvanı kullanıldı;

a. Kainik asitin nöron aktivasyonuna etkisinin araştırıldığı deney grupları:

1. Grup: Kontrol grubu: n=3 erkek
2. Grup: Kainik asit grubu: n=3 erkek
3. Grup: CNQX+Kainik asit grubu: n=3 erkek

b. AMPA'nın nöron aktivasyonuna etkisinin araştırıldığı deney grupları:

1. Grup: Kontrol grubu: n=3 erkek
2. Grup: AMPA grubu: n=3 erkek
3. Grup: CNQX+AMPA grubu: n=3 erkek

c. NMDA'nın nöron aktivasyonuna etkisinin araştırıldığı deney grupları:

1. Grup: Kontrol grubu: n=3 erkek
2. Grup: NMDA grubu: n=3 erkek
3. Grup: MK-801+NMDA grubu: n=3 erkek

Bu deney gruplarının hazırlanmasında kullanılacak glutamat agonist ve antagonistlerinin dozları, enjeksiyon miktarları ve çözücü cinsleri aşağıda verilmiştir.

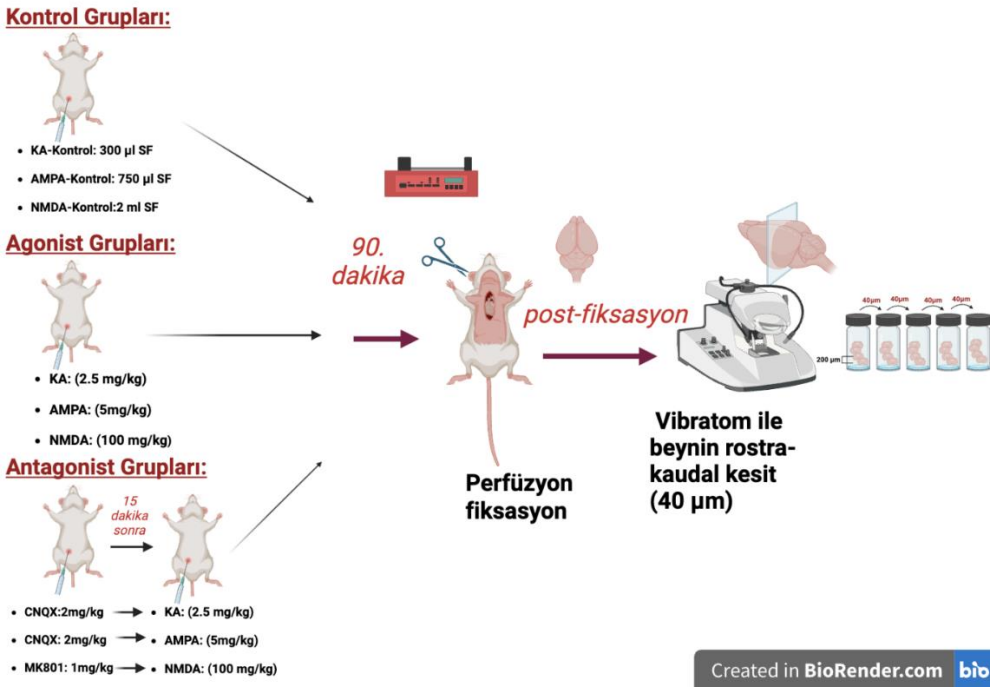
a. AMPA/kainat reseptör agonisti kainik asitin nöron aktivasyonuna etkisinin araştırılmasında kontrol grubu deneklere intraperitoneal (i.p.) fizyolojik tuzlu su enjeksiyonu yapıldı (300 µl/denek), kainik asit grubu deneklere intraperitoneal kainik asit enjekte edildi (2,5 mg/kg, 300 µl/denek), CNQX grubu deneklere ise kainik asit enjeksiyonundan 15 dk. önce AMPA-kainat reseptör antagonisti olan CNQX (2 mg/kg, i.p., 300 µl/denek) verildi.

b. AMPA reseptör agonisti AMPA'nın nöron aktivasyonuna etkisinin araştırılmasında ilk grubu kontrol grubu (intraperitoneal fizyolojik tuzlu su enjeksiyonu yapılan, 750 µl/denek), ikinci grubu AMPA grubu (intraperitoneal AMPA enjeksiyonu yapılan, 5 mg/kg, 750 µl/denek), üçüncü grubu ise CNQX grubu (AMPA enjeksiyonundan 15 dk. önce AMPA-kainat reseptör antagonisti olan CNQX, 2 mg/kg, i.p., 300 µl/denek) oluşturmuştur.

c. NMDA reseptör agonisti NMDA'nın nöron aktivasyonuna etkisinin araştırılmasında ilk grubu kontrol grubu (intraperitoneal fizyolojik tuzlu su enjeksiyonu yapılan, 2

ml/denek), ikinci grubu NMDA grubu (intraperitoneal NMDA enjeksiyonu yapılan, 100 mg/kg, 2 ml/denek), üçüncü grubu ise MK-801 grubu (NMDA enjeksiyonundan 15 dk. önce NMDA reseptör antagonisti olan MK-801, 1 mg/kg, i.p., 300 µl/denek) oluşturmuştur (Şekil 7).

Enjeksiyonlar saat 08:00-10:00 saatleri arasında yapıldı. Enjekte edilen maddelerin dozları daha önceki çalışmalarımızda belirlenen (Eyigor ve ark., 2010; Gok-Yurtseven, Kafa, Minbay, & Eyigor 2019; Yurtseven ve ark., 2020) literatürle uyumlu miktarlardır. Kontrol dahil tüm deney gruplarında yer alan deney hayvanları son enjeksiyondan 90 dakika sonra sakrifiye edildi. Beyin dokusundan kesit elde etme protokolü ve daha sonrasında yapılacak olan c-Fos ve RSPO1 / c-Fos ve RSPO3 ikili immünohistokimyasal işaretlemelerin detaylı prosedürü aşağıdaki başlıklarda belirtildi.



Şekil 8. Çalışmada oluşturulan özgün hedef-1'e ait oluşturulan deney gruplarının şematik gösterimi

3.3.2. Özgün hedef 2'nin deney grupları

RSPO1 veya RSPO3 nöronlarının fizyolojik beslenme şartlarında nöronal aktivasyon gösterip göstermeyeceğinin ve bu aktivasyonda glutamat reseptörlerinin rolünün var olup olmadığının araştırılacağı Hedef 2 için deney gruplarının hazırlanmasında kullanılacak glutamat agonist ve antagonistlerinin dozları, enjeksiyon

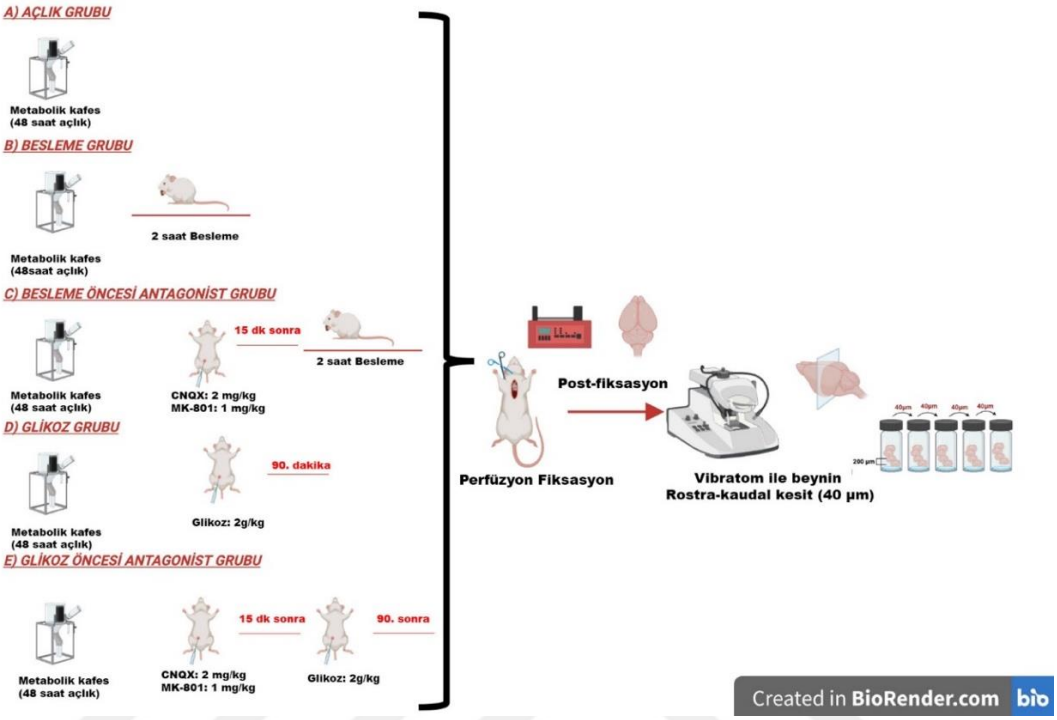
miktarları ve çözücü cinsleri aşağıda verildi;

1. Grup: 48 saat açlık sonrası Kontrol grubu: n=3 erkek
2. Grup: 48 saat açlık sonrası Beslenme grubu: n=3 erkek
3. Grup: 48 saat açlık sonrası CNQX+Beslenme grubu: n=3 erkek
4. Grup: 48 saat açlık sonrası MK-801+Beslenme grubu: n=3 erkek
5. Grup: 48 saat açlık sonrası Glikoz grubu: n=3 erkek
6. Grup: 48 saat açlık sonrası CNQX+Glikoz grubu: n=3 erkek
7. Grup: 48 saat açlık sonrası MK-801+Glikoz grubu: n=3 erkek

Hedef-2'ye yönelik deneylerde CNQX antagonisti serum fizyolojikte çözdürülerek (2 mg/kg, i.p., 300 µl/denek) beslenme ya da glikoz enjeksiyonundan 15 dakika önce deney hayvanlarına enjekte edildi. MK-801 de aynı şekilde serum fizyolojikte çözdürülerek (1 mg/kg, i.p., 300 µl/denek) beslenme ya da glikoz enjeksiyonundan 15 dakika önce deney hayvanlarına enjekte edildi. 4. grupta yer alan deneklerde MK-801 enjeksiyonu sonrası beslenme davranışı görülmediği için bu gruptaki deneylere daha düşük, farklı MK-801 dozları (0,25/ 0,5 /1 mg/kg) denenerek deneylere devam edilmeye çalışıldı. Ancak denenen tüm MK-801 dozlarında hayvanlarda beslenme davranışı gözlenmedi. Hedef-2 kapsamında planlanan çalışmalarda deneklerin enjeksiyon sonrası fizyolojik beslenme şartlarını sağlayamadığından dolayı beslenmeye bağlı c-Fos aktivasyonunun etkisi araştırılamadı. Bu sebeple 48 saat açlık sonrası MK-801+Beslenme grubu deneyden çıkarıldı.

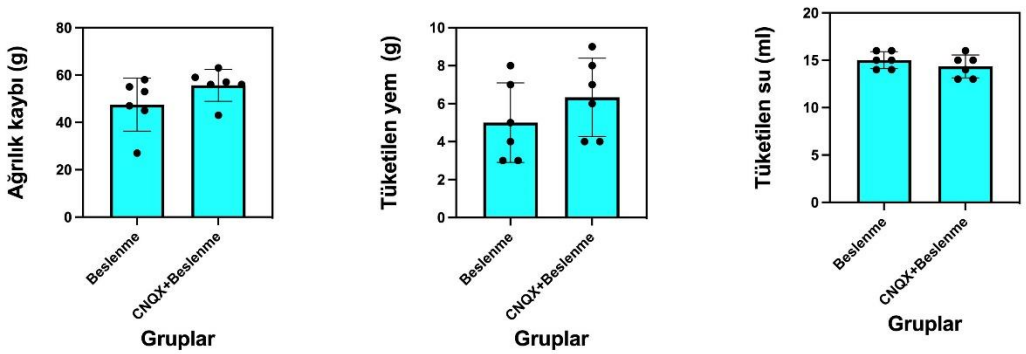
Deneylerde kullanılan glikoz, serum fizyolojik içerisinde çözdürüldü (2 g/kg glikoz, 400 µl SF) ve 48 saat açlık sonrası deney hayvanlarına intraperitoneal olarak enjekte edildi. Antagonist verilecek deney hayvanlarında glikoz enjeksiyonu antagonist enjeksiyonundan 15 dakika sonra gerçekleştirildi. Kontrol grubu denekler 48 saat açlık sonrası herhangi bir uygulamaya maruz kalmadan sakrifiye edildi. Enjekte edilen maddelerin dozları daha önce laboratuvarımızda gerçekleştirilmiş çalışma (Kocoglu ve ark., 2022) ile uyumludur. Enjeksiyonlar saat 08:00-10:00 arasında yapıldı (Şekil 9). 48 saat açlık sonrası 2. (Beslenme grubu) ve 3. (CNQX + Beslenme) grupta yer alan deney hayvanları tek tek kafeslere alındı ve sakrifikasyon işlemine kadar (90 dakika) gerçekleştirdikleri besin tüketimleri ile su alımları ölçüldü (Şekil 10). Şekil 10'da verilen ağırlık kaybı, yem tüketimi ve su tüketimi ile ilgili

grafikler her gruba ait ortalama değer olarak sunulmuştur. Grafiklerde yer alan her bir noktasal işaret bir hayvanı temsil etmektedir.



Şekil 9. Çalışmada oluşturulan özgün hedef-2'ye ait deney gruplarının şematik gösterimi

Cinsiyet	Grup	Açlık öncesi ağırlık (g)	Açlık sonrası ağırlık (g)	Ağırlık kaybı (g)	Verilen yem (g)	Kalan yem (g)	Tüketilen yem (g)	Verilen su (ml)	Kalan su (ml)	Tüketilen su (ml)
Erkek	Beslenme	252	199	53	52	47	5	100	85	15
Erkek	Beslenme	230	172	58	50	42	8	100	84	16
Erkek	Beslenme	283	236	47	43	39	4	100	86	14
Erkek	Beslenme	283	228	55	42	39	3	100	85	15
Erkek	Beslenme	275	230	45	46	43	3	100	86	14
Erkek	Beslenme	343	316	27	42	35	7	100	84	16
										0
										0
Erkek	CNQX+Beslenme	260	204	56	50	44	6	100	85	15
Erkek	CNQX+Beslenme	220	157	63	51	47	4	100	87	13
Erkek	CNQX+Beslenme	229	170	59	53	49	4	100	87	13
Erkek	CNQX+Beslenme	285	229	56	51	42	9	100	85	15
Erkek	CNQX+Beslenme	273	216	57	51	44	7	100	84	16
Erkek	CNQX+Beslenme	317	274	43	40	32	8	100	86	14



Şekil 10. Deneklerin ağırlık ve yem/su tüketim miktarları

3.3.3. Özgün hedef 3'ün deney grupları

RSPO1 ve RSPO3 nöronlarında eksprese edilen glutamat reseptör alt birimi (AMPA için GluA2; kainik asit için GluK5; NMDA için GluN1) protein ekspresyonlarının gösterilmesi amacıyla herhangi bir enjeksiyon yapılmamış normal beslenen denekler kullanılmıştır. 10 erkek hayvan perfüzyon fikasyonu yöntemi kullanılarak sakrifiye edilmiştir. Deneklere ait beyinlerden vibratom cihazı ile 40 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Alınan kesitler, 0.05 M pH 7,6 Tris–HCl tamponu ile yıkanarak ilgili fiksatiften arındırıldıktan sonra kriyoprotektan içinde kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

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

3.4.1. Perfüzyon fiksasyonu ile dokuların eldesi

Çalışmada kullanılacak hayvanlara, perfüzyon fiksasyon işlemi enjeksiyon gruplarında son enjeksiyonu takip eden 90. dakika sonunda, yeniden besleme gruplarında ise 120. dakika sonunda uygulandı. Sıçanların derin anestezisi sonrası toraksları açılarak kalbin sağ atriyumundan kan alındı ve daha sonra aortaya kateter yerleştirildi. Önce serum fizyolojik (%0,09 NaCl) perfüzyon pompası yardımıyla damar sistemine gönderilerek kanın sistemden temizlenmesi sağlandı. Sonraki aşamada ise her denek için 300 ml olacak şekilde 0.13 M Sorenson'un fosfat tamponu ile hazırlanmış %4'lük paraformaldehit solüsyonu fiksatif olarak deneklere verildi. Hayvanlardan alınan beyin dokuları %4'lük paraformaldehit solüsyonunun içinde +4 ºC'de tüm gece post-fiksasyona tabi tutuldu.

Ertesi gün beyinlerden vibratom ile beynin rostra-kaudal ekseninin tamamını içerecek şekilde 5 seri halinde ve 40 µm kalınlığında alınan kesitler, 0,05 M pH 7,6 Tris–HCl tamponu ile yıkanarak ilgili fiksatiften arındırıldıktan sonra kriyoprotektan içinde -20 °C'de saklandı.

3.4.2. İmmünohistokimyasal yöntemlerde uygulanan genel kurallar ve antikor optimizasyonu

Primer antikorların optimum çalışma şartlarını belirlemek amacı ile indirekt immünoperoksidaz yöntemi ile immünohistokimyasal işaretlemeler yapılmıştır. İşlemlerin tümü cam sintilasyon vialleri içinde bulunan yüzen kesitlere uygulanmıştır.

Kesitlerin inkübasyon ve yıkama işlemleri, orbital sallayıcı yardımı ile gerçekleştirilmiştir. Protokoldeki temel basamaklardan olan non-spesifik bağlanmayı bloklama işlemi ile primer antikor inkübasyonu arası hariç, diğer tüm basamaklarda ilgili kesitler 0,05 M'lık pH:7,6 olan Tris-HCl tamponu ile yıkanmıştır. Non-spesifik bağlanmayı bloklamak ve tüm antikorları (primer ve sekonder) dilüe etmek için bloklayıcı tampon olarak Tris-HCI tamponunda hazırlanan %10'luk normal at serumu kullanılmıştır. İmmünohistokimyasal işlemlerde kullanılan solüsyonların içeriği ve hazırlanışı Tablo 2'de verilmiştir.

Çalışmada kullanılan primer antikorların (Tablo 3) immünohistokimyasal işaretlemeleri yapılmadan önce; bu antikorlarla ilgili dilüsyon, inkübasyon süresi ve sıcaklığı belirleme işlemleri gerçekleştirilerek optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu primer antikorlarla yapılan deneme boyamalarında antikor dilüsyonu, inkübasyon süresi ve sıcaklığı açısından değişen miktar ve süreler ile sıcaklıklar uygulanmış ve en optimum boyanma kombinasyonları belirlenmiştir. Optimizasyon sonucu elde edilen optimum değerler Tablo 4'te özetlenmiştir. Kullanılan sekonder antikorlar ve biyotin işaretleyiciler ile ilgili ayrıntılar Tablo 5 ve Tablo 6'da verilmiştir. İndirekt immünoperoksidaz tekniği ile işaretlenen kesitlerin kapatılmasında DPX (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) kullanılmıştır. Optimize edilen primer antikorlarla gerçekleştirilen boyamalara örnek mikrograflar Şekil 11'de verilmiştir.

Tablo 2. İmmünohistokimyasal işlemlerde kullanılan solüsyonların içeriği ve hazırlanışı.

SOLÜSYON ADI	İÇERİK	HAZIRLANIŞI
0,13 M Sorenson'un Fosfat Tamponu	Solüsyon A, 46,54 gr/lt. [Na2HPO412H2O (0,13 M), (Merck)] Solüsyon B, 17,68 gr/lt. [KH2PO4 (0,13 M), (Merck)]	Solüsyon A hazırlanır Solüsyon A üzerine Solüsyon B pH7,4 olana kadar 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	Paraformaldehit ve distile su ve 58ºC'ye kadar manyetik karıştırıcıda ısıtılır. 1 N. NaOH ısıtılan solüsyona berraklaşana kadar yavaşça eklenir. Filtre kağıdından süzülen solüsyon fosfat tampon ile l 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	Trisma base ile distile su manyetik karıştırıcıda karıştırılır ve konsantre hidroklorik asit/HCL 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)	Tris, sükroz ve polivinilprolidon manyetik karışıtırıcıda karıştırılır. Eridikten sonra etilen glikol eklenir.Filtre kağıdı ile 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	%10 Normal at serumu, triton-X 100, sodyum azid, belirtilen oranlarda karıştırılır. Tris/HCl tamponu ile 1000 ml tamamlanır. Filtre kağıdı ile süzülür.
1 mM EDTA Tamponu	Etilendiamin tetra asetik asit disodyum 2 sulu, 0,372 gr/lt.	EDTA ile distile su manyetik karıştırıcıda karıştırılır. pH8'e ayarlanır.

Tablo 3. Kullanılan primer antikorlar

Antikor	Üretici Firma	Katolog no
Mouse anti- RSPO1	Origene	TA804626
Mouse anti- RSPO3	Origene	TA804635
Rabbit anti-c-Fos	Millipore	ABE457
Keçi anti-GluR2	Novusbio	NBP1-46490
Keçi anti-NMDAR1	Novusbio	NB100-41105
Tavşan anti-GluK5	Jenens ve Eyigör tarafından üretilmiştir.	R52-4

Tablo 4. Çalışmada kullanılacak antikorların optimize edilen dilüsyonları, inkübasyon süreleri ile sıcaklıkları

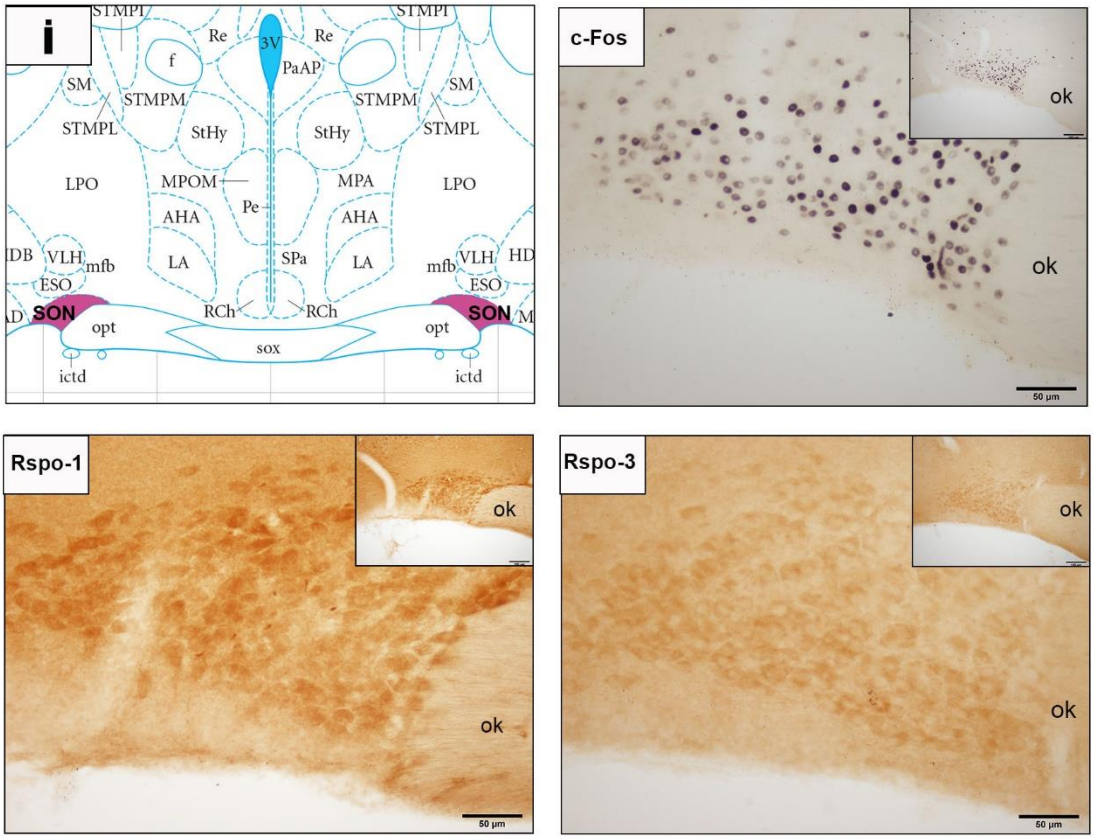
Kullanılan Antikor	Dilüsyon	İnkübasyon Süresi	İnkübasyon ºC	Antijen Retrieval
Mouse anti- RSPO1	1:3000	1 gece	Oda Sıcaklığı	–
Mouse anti- RSPO3	1:5000	2 gece	Oda Sıcaklığı	+
Rabbit anti-c-Fos	1:20 000	1 gece	Oda Sıcaklığı	–
Keçi anti-GluR2	1:500	2 gece	Oda Sıcaklığı	+
Keçi anti-NMDAR1	1:500	2 gece	Oda Sıcaklığı	+
Tavşan anti-GluK5	1:1000	2 gece	Oda Sıcaklığı	+

Tablo 5. Kullanılan sekonder antikorlar

Üretici Firma	Kullanılan Sekonder Antikorlar
Jackson immunoresearch	Biyotin konjuge eşek anti-rabbit IgG (H+L) (711-065-152) Biyotin konjuge eşek anti-mouse IgG (H+L) (715-065-151) FITC konjuge eşek anti-fare IgG (H+L) (715-095-151) Texas Red konjuge eşek anti-tavşan IgG (H+L) (711-073-152) Cy 5 konjuge eşek anti-keçi IgG (H+L) (705-176-147)

Tablo 6. Kullanılan biyotin bağlayıcılar

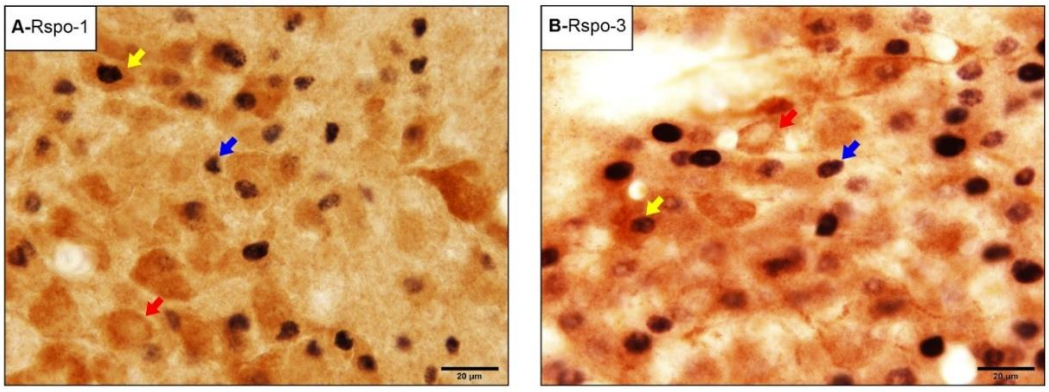
Üretici Firma	Kullanılan biyotin bağlayıcılar
Jackson immunoresearch	Peroxidase–conjugated streptavidin (016-030-084)
Vectastain	Avidin Biyotin Kompleksi (ZJ0909)



Şekil 11. *Paxinos ve Watson* sıçan atlasına göre SON'in lokalizasyonu (i). Çalışmada kullanılacak olan c-Fos, RSPO1 ve RSPO3 primer antikorların hipotalamik supraoptik çekirdek (SON) bölgesinde dağılımı

3.4.3. RSPO1 ve RSPO3 nöronlarında ortaya çıkan nöronal aktivasyonun belirlenmesi

Deney gruplarına uygulanan ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemiyle, RSPO-1 ve RSPO-3'ü eksprese eden hücrelerdeki nöronal aktivasyon *c*-Fos varlığı ile ortaya çıkarıldı. İkili immünohistokimyasal işaretleme protokolü kullanılarak, c-Fos/RSPO1 ve c-Fos/RSPO3 proteinlerine ait ikili işaretlemeler optimize edildi. c-Fos/RSPO1 ve c-Fos/RSPO3 ikili işaretlemelerine ait örnek mikrograf Şekil 12'de sunulmuştur.



Şekil 12. A) c-Fos/RSPO1 ikili işaretlemesi. Sarı ok c-Fos pozitif RSPO1 nöronlarını, mavi ok yalnızca c-Fos'u eksprese eden pozitif nöronları, kırmızı ok ise yalnızca aktive olan RSPO1 nöronlarını temsil eder**.** B) c-Fos/RSPO3 ikili işaretlemesi. Sarı ok c-Fos pozitif RSPO3 nöronlarını, mavi ok yalnızca c-Fos pozitif nöronları, kırmızı ok ise yalnızca aktive olan RSPO3 nöronlarını temsil eder (Magnifikasyon: x100).

3.4.3.1. RSPO1/c-fos ikili immünohistokimyasal işaretleme yöntemi

- Sintilasyon viyallerinde kriyoprotektan madde içindeki kesitler -20 °C'de dondurucudan çıkarıldı. İmmünohistokimyasal boyama için oda sıcaklığında yaklaşık 30 dk. bekletildi.
- Vial içindeki kesitler kriyoprotektanın uzaklaştırılması için 0,05 M pH 7,6 Tris/HCl tamponu ile 3x10 dk. yıkandı.
- Non-spesifik bağlanmayı baskılamak amacıyla kesitler %10'luk normal at serumu ile hazırlanmış bloklayıcı serum içinde oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi.
- Kesitler bloklayıcı serum içinde 1:20.000 oranında dilüe edilmiş anti c-Fos tavşan poliklonal primer antikor ile oda sıcaklığında 1 gece inkübe edildi.
- Kesitler 0,05 M pH 7,6 Tris/HCl tamponu ile 3x10 dk. yıkandı.
- Bloklayıcı serum içinde 1:300 oranında dilüe biyotin işaretli eşek anti-tavşan sekonder antikoru ile oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi.
- Kesitler 0,05 M pH 7,6 Tris/HCl tamponu ile 3x10 dk. yıkandı.
- Avidin biyotin kompleksi (ABC) solüsyonu (10 µl A ve 10 µl B solüsyonu karışımı 1 ml 0,05 M'lık Tris-HCl içinde hazırlanmıştır) ile 1 saat inkübe edildi.
- Kesitler 0,05 M pH 7,6 Tris/HCl tamponu ile 3x10 dk. yıkandı.
- İmmünohistokimyasal reaksiyonu çekirdekte görünür hale getirmek için substrat kromojen solüsyonu Nikel-DAB (50 ml 0,05 M pH 7,6 Tris-HCl tamponunda 2 g Nikel + 12,5 mg DAB + 1,3 µl H_2O_2 karışımı hazırlanmıştır) 20 dk. uygulandı.
- Kesitler 0,05 M pH 7,6 Tris/HCl tamponu ile 3x10 dk. yıkandı.
- Non-spesifik bağlanmayı baskılamak amacıyla kesitler %10'luk normal at serumu ile hazırlanmış bloklayıcı serum içinde oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi
- Kesitler bloklayıcı serum içinde 1:3000 oranında dilüe edilmiş anti-RSPO1 fare poliklonal primer antikor ile oda sıcaklığında 1 gece inkübe edildi.
- Kesitler 0,05 M pH 7,6 Tris/HCl tamponu ile 3x10 dk. yıkandı.
- Bloklayıcı serum içinde 1:300 oranında dilüe edilmiş biyotin işaretli eşek anti-fare sekonder antikoru ile oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi.

- Kesitler 0,05 M pH 7,6 Tris/HCl tamponu ile 3x10 dk. yıkandı.
- Avidin biyotin kompleksi (ABC) solüsyonu (10 µl A ve 10 µl B solüsyonu/1ml 0,05 M Tris-HCl) ile 1 saat inkübe edildi
- Kesitler 0,05 M pH 7,6 Tris/HCl tamponu ile 3x10 dk. yıkandı.
- 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 pH 7,6 Tris-HCl) 15 dk. uygulandı

3.4.3.2. RSPO3/c-fos ikili immünohistokimyasal işaretleme yöntemi

- Sintilasyon viyallerinde kriyoprotektan madde içindeki kesitler -20 °C'de dondurucudan çıkarıldı. İmmünohistokimyasal boyama için oda sıcaklığında yaklaşık 30 dk. bekletildi.
- Vial içindeki kesitler kriyoprotektanın uzaklaştırılması için 0,05 M pH 7,6 Tris/HCl tamponu ile 3x10 dk. yıkandı.
- Antijenitenin geri kazandırılması için 85 ºC'de 1 mM EDTA'da (pH 8,0) 20 dk., takiben oda sıcaklığında aynı solüsyon içerisinde 10 dk. daha bekletildi.
- Kesitler 0,05 M pH 7,6 Tris/HCl tamponu ile 1x10 dk. yıkandı.
- Non-spesifik bağlanmayı baskılamak amacıyla kesitler %10'luk normal at serumu ile hazırlanmış bloklayıcı serum içinde oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi.
- Kesitler bloklayıcı serum içinde 1:20.000 oranında dilüe edilmiş anti c-Fos tavşan poliklonal primer antikor ile oda sıcaklığında 1 gece inkübe edildi.
- Kesitler 0,05 M pH 7,6 Tris/HCl tamponu ile 3x10 dk. yıkandı.
- Bloklayıcı serum içinde 1:300 oranında dilüe biyotin işaretli eşek anti-tavşan sekonder antikoru ile oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi.
- Kesitler 0,05 M pH 7,6 Tris/HCl tamponu ile 3x10 dk. yıkandı.
- Streptavidin solüsyonunda 1:1000 dilüsyonunda oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübe edildi.
- Kesitler 0,05 M pH 7,6 Tris/HCl tamponu ile 3x10 dk. yıkandı.
- İmmünohistokimyasal reaksiyonu çekirdekte görünür hale getirmek için substrat kromojen solüsyonu Nikel-DAB (2 g Nikel + 12,5 mg DAB + 1,3 µL H_2O_2 / 50 ml, 0,05 M Tris-HCl) 20 dk. uygulandı.
- Kesitler 0,05 M pH 7,6 Tris/HCl tamponu ile 3x10 dk. yıkandı.

- Non-spesifik bağlanmayı baskılamak amacıyla kesitler %10'luk normal at serumu ile hazırlanmış bloklayıcı serum içinde oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi
- Kesitler bloklayıcı serum içinde 1:5000 oranında dilüe edilmiş anti-RSPO3 fare poliklonal primer antikor ile oda sıcaklığında 2 gece inkübe edildi.
- Kesitler 0,05 M pH 7,6 Tris/HCl tamponu ile 3x10 dk. yıkandı.
- Bloklayıcı serum içinde 1:300 oranında dilüe edilmiş biyotin işaretli eşek anti-fare sekonder antikoru ile oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi.
- Kesitler 0,05 M pH 7,6 Tris/HCl tamponu ile 3x10 dk. yıkandı.
- Streptavidin solüsyonunda 1:1000 dilüsyonunda oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübe edildi.
- Kesitler 0,05 M pH 7,6 Tris/HCl tamponu ile 3x10 dk. yıkandı.
- 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 pH 7,6 Tris-HCl) 7 dk. uygulandı.

3.4.3. RSPO1 ve RSPO3 nöronlarında eksprese edilen glutamat reseptör alt birim protein ekspresyonlarının gösterilmesi (Kainat için GLUK5; AMPA için GluA2; NMDA için GluN1)

RSPO1 ve RSPO3 nöronlarında eksprese edilen glutamat reseptör alt birimi (AMPA için GluA2; kainik asit için GluK5; NMDA için GluN1) protein ekspresyonlarının gösterilmesi amacıyla herhangi bir enjeksiyon yapılmamış normal beslenen denekler kullanılmıştır. Sakrifiye edilen deneklere ait bu beyinlerden vibratom ile 40 µm kalınlığında kesitler alınarak, RSPO1 veya RSPO3 peptitlerini içeren nöronlarda AMPA, kainat ve NMDA reseptör alt birimi proteinlerinin belirlemek amacıyla bu kesitlere aşağıda ana basamakları verilen ikili immünofloresans işaretleme protokolü uygulanmıştır. Elde edilen verilerle Rspo nöronlarının glutamaterjik iletiyi algılayabilecekleri fonksiyonel glutamat reseptörleri ile ko-lokolize olup olmadığı belirlenmiştir.

3.4.3.1. RSPO1/Glutamat reseptör alt birim reseptörü immünofloresans işaretleme yöntemi

- Sintilasyon viyallerinde kriyoprotektan madde içindeki kesitler -20 °C'de dondurucudan çıkarıldı. İmmünohistokimyasal boyama için oda sıcaklığında yaklaşık 30 dk. bekletildi.
- Vial içindeki kesitler kriyoprotektanın uzaklaştırılması için 0,05 M pH 7,6 Tris/HCl tamponu ile 3x10 dk. yıkandı.
- Antijenitenin geri kazandırılması için 85 ºC'de 1 mM EDTA'da (pH 8,0) 20 dk., takiben oda sıcaklığında aynı solüsyon içerisinde 10 dk. daha bekletildi.
- Kesitler 0,05 M pH 7,6 Tris/HCl tamponu ile 1x10 dk. yıkandı.
- Non-spesifik bağlanmayı baskılamak amacıyla kesitler %10'luk normal at serumu ile hazırlanmış bloklayıcı serum içinde oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi.
- Kesitler bloklayıcı serum içinde hazırlanmış primer antikor karışımında [fare anti-RSPO1 (1:3000) ile glutamat reseptör alt birim proteinlerinden birine karşı geliştirilmiş antikorların karışımını içeren solüsyon] 48 saat inkübe edildi. Karışımda kullanılan antikorların dilüsyon oranları ile inkübasyon süreleri tablo 4'te ayrıntılarıyla verildi.
- Kesitler 0,05 M pH 7,6 Tris/HCl tamponu ile 3x10 dk. yıkandı.
- Sekonder antikor ile inkübasyon aşamasında ise sekonder antikor ve/veya sekonder antikor karışımı ile inkübasyon gerçekleştirildi. Fare anti-RSPO1 için; FITC konjuge eşek anti-fare (1:500), keçi anti-NMDAR1 ve keçi anti-GluR2 için; Cy 5 konjuge eşek anti-keçi (1:500), tavşan anti-GluK5 için; Texas Red konjuge eşek anti-tavşan (1:500) antikorları ile 2 saatlik inkübasyon yapıldı.
- Tüm kesitler, Tris-HCI tampon ile 3x10 dk. yıkandı ve sonrasında lamlara alınıp kurutuldu.
- Mikroskopik değerlendirme ve fotoğraflama öncesinde kesitler Prolong® Antifade ile kapatıldı.
- Elde edilen kesitler konfokal mikroskopta değerlendirildi.

3.4.3.2. RSPO3/Glutamat reseptör alt birim reseptörü immünofloresans işaretleme yöntemi

- Sintilasyon viyallerinde kriyoprotektan madde içindeki kesitler -20 °C'de dondurucudan çıkarıldı. İmmünohistokimyasal boyama için oda sıcaklığında yaklaşık 30 dk. bekletildi.
- Vial içindeki kesitler kriyoprotektanın uzaklaştırılması için 0,05 M pH 7,6 Tris/HCl tamponu ile 3x10 dk. yıkandı.
- Antijenitenin geri kazandırılması için 85 ºC'de 1 mM EDTA'da (pH 8,0) 20 dk., takiben oda sıcaklığında aynı solüsyon içerisinde 10 dk. daha bekletildi.
- Kesitler 0,05 M pH 7,6 Tris/HCl tamponu ile 1x10 dk. yıkandı.
- Non-spesifik bağlanmayı baskılamak amacıyla kesitler %10'luk normal at serumu ile hazırlanmış bloklayıcı serum içinde oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi.
- Kesitler bloklayıcı serum içinde hazırlanmış primer antikor karışımında [fare anti-RSPO3 (1:5000) ile glutamat reseptör alt birim proteinlerinden birine karşı geliştirilmiş antikorların karışımını içeren solüsyon] 48 saat inkübe edildi. Karışımda kullanılan antikorların dilüsyon oranları ile inkübasyon süreleri tablo 4'te ayrıntılarıyla verildi.
- Kesitler 0,05 M pH 7,6 Tris/HCl tamponu ile 3x10 dk. yıkandı.
- Sekonder antikor uygulaması aşamasında ise sekonder antikor ve/veya sekonder antikor karışımı ile inkübasyon gerçekleştirildi. Fare anti-RSPO3 için; FITC konjuge eşek anti-fare (1:500), keçi anti-NMDAR1 ve keçi anti-GluR2 için; Cy 5 konjuge eşek anti-keçi (1:500), tavşan anti-GluK5 için; Texas Red konjuge eşek anti-tavşan (1:500) antikorları ile 2 saatlik inkübasyon yapıldı.
- Tüm kesitler, Tris-HCI tampon ile 3x10 dk. yıkandı ve sonrasında lamlara alınıp kurutuldu.
- Mikroskopik değerlendirme ve fotoğraflama öncesinde kesitler Prolong® Antifade ile kapatıldı.
- Elde edilen kesitler konfokal mikroskopta değerlendirildi.

3.5. Preparatların İncelenmesi ve İstatistiksel Analiz

İkili immunoperoksidaz boyaması sonrası kesitlerin incelemesi Olympus BX–50 fotomikroskopta 40X objektif kullanılarak dijital kamera (Olympus DP71 CCD color camera, 1,5 million pixel) ile bilgisayar ekranına alınan görüntüler üzerinde gerçekleştirilmiştir. İkili immünofloresans yöntemi kullanılarak işaretlenen kesitlerin incelemesi ise, lazer taramalı konfokal mikroskop (LSM 900 WITH AIRYSCAN 2) ile gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışması kapsamında yapılan tekli ve ikili işaretlemeler için sıçan beyin atlasına (Paxinos ve Watson, 2007) göre belirlenen koordinatlar arasında yer alan ve RSPO nöronlarının bulunduğu supraoptik çekirdek (SON) ve paraventriküler çekirdek (PVN) alanlarını içeren kesitler kullanılmıştır (SON için bregma –0.48 mm ile –1.44 mm, PVN için bregma –1.32 mm ile –1.92 mm). Ventromedial çekirdekte (VMH) yer alan nöronlardan elde edilen histolojik görüntülerde sayılabilir nitelikte nöron soması gözlenmediği için bu alan deney dışı bırakılmıştır.

Hücre sayımı için rostrokaudal düzlemde birbirine eşit uzaklıkta 5 farklı seviyeden alınan kesitler kullanılmış ve her denek için kesitlerin aynı koordinatta olmasına dikkat edilmiştir. Her vialdeki 250 μm aralıklarla alınan ≅ 30 seri kesitten tümü lamlara alındıktan sonra yukarıda belirtilen koordinatlar arasındaki SON ve PVN'de lokalize ilgili RSPO1 ya da RSPO3 nöronları, çekirdeklerin tamamında (rastgele örnekleme yapılmaksızın) sayılmıştır.

İkili immünoperoksidaz yöntemi ile işaretlenen kesitlerde RSPO1 ya da RSPO3 peptiti için immünopozitif olan tüm nöronlar sayılmış, c-Fos immünoreaktif olanlarının (ikili işaretlenenler) sayıları da belirlenmiştir. Sonrasında her denek için; ikili işaretlenen nöronların ilgili peptite ait antikor ile işaretli tüm nöronlara (hem ikili hem de sadece peptit işaretli nöronların toplamı) oranı hesaplanmıştır. Her bir denek için elde edilen yüzdelerin grup içi ortalama ve standart hataları belirlenmiştir. Elde edilen verilerin deney grupları arası varyans analizi ANOVA ile istatistiki anlamlılık karşılaştırması ise Student t-testi veya Tukey testi ile değerlendirilmiştir. İstatistiki anlamlılık sınır değeri olarak $p<0,05$ alınmıştır.

4. BULGULAR

4.1. RSPO1 Nöronlarının Aktivasyonunda Glutamat Reseptör Agonist ve Antagonistlerinin Etkisi

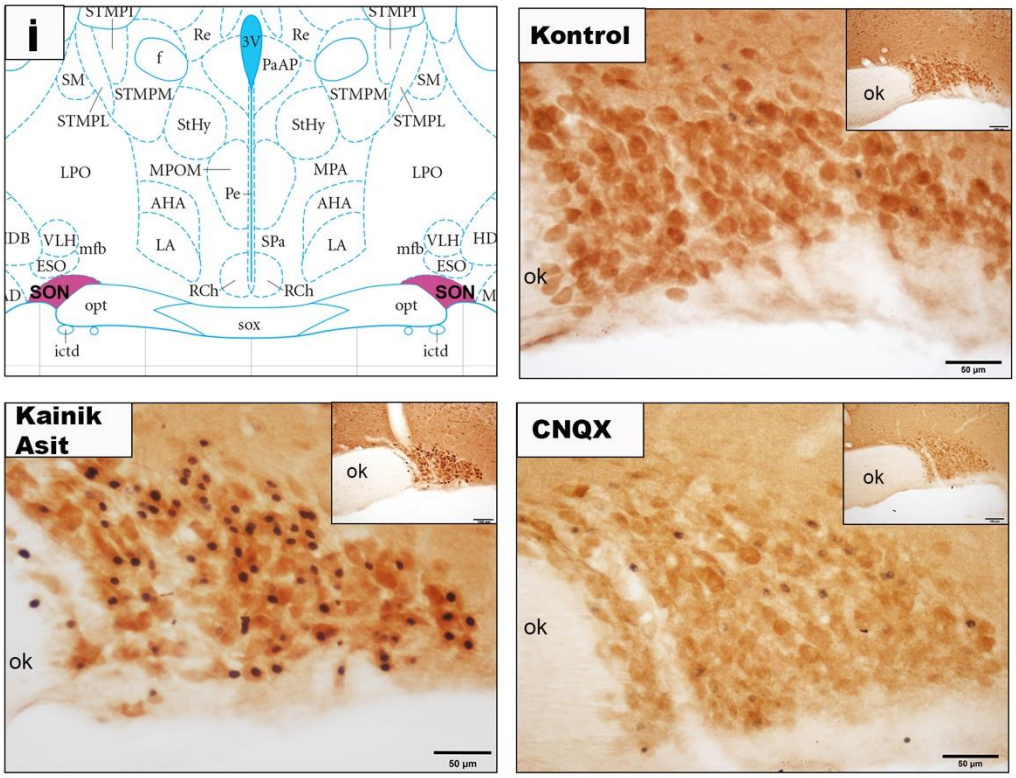
4.1.1. Supraoptik ve paraventriküler çekirdekte yerleşik RSPO1 nöronlarının aktivasyonunda kainik Asit ve CNQX'in etkisi

Glutamat agonisti kainik asit uygulamasının supraoptik çekirdekte yerleşik RSPO1 nöronları üzerindeki etkisini incelemek amacıyla kesitler, RSPO1 ve c-Fos proteinleri için ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi ile boyandı (Şekil 13). Yapılan sayımlar sonucunda SON'de c-Fos-pozitif RSPO1 nöronlarının yüzdesi kontrol grubunda %1±0,04; kainik asit grubunda %68,11±6,62; CNQX grubunda %13,30±3,36 olarak bulundu (Şekil 13, Şekil 14).

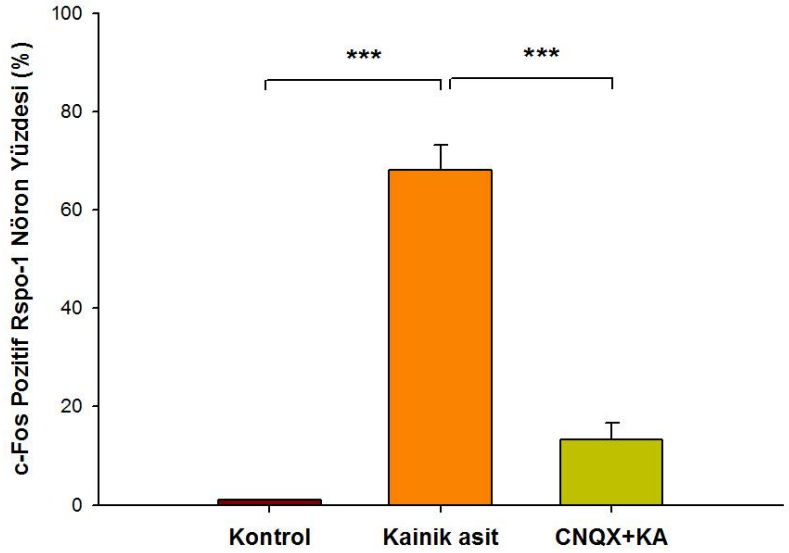
İstatistiksel analiz sonucunda kainik asit enjeksiyonundan sonra SON'de yerleşik RSPO1 nöron sayısında anlamlı olarak artış gözlendi ($p<0,001$). Kainik asit enjeksiyonundan önce özgün antagonist (CNQX) uygulamasının aktive olan RSPO1 nöron sayısında azalmaya yol açtığı belirlendi. ($p<0,001$). Supraoptik çekirdekte kontrol grubu ve özgün antagonist (CNQX) grubu arasında aktive olan nöron yüzdesi açısından anlamlı fark olmadığı istatistiksel olarak gösterildi ($p=0,089$) (Şekil 14).

Paraventriküler çekirdekte glutamat agonisti kainik asit uygulamasının RSPO1 nöronları üzerine etkisini incelemek amacıyla ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi ile boyamalar yapıldı (Şekil 15). Sayımlar sonucunda, PVN'de c-Fos-pozitif RSPO1 nöronlarının oranı kontrol grubunda %1,2±0,18; kainik asit grubunda %81,92±4,71; CNQX grubunda %28,25±7,33 olarak bulundu (Şekil 15, Şekil 16).

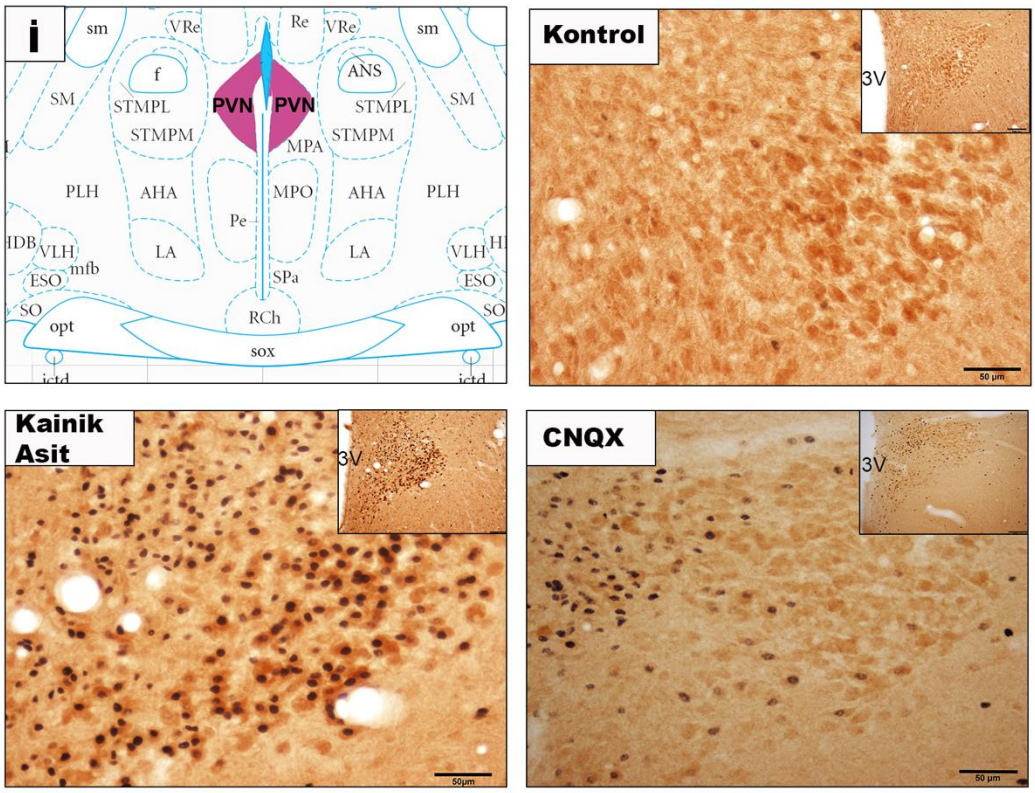
İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde kainik asit enjeksiyonundan sonra PVN'de yerleşik RSPO1 nöron sayısında anlamlı olarak artış gözlendi ($p<0,001$). Kainik asit enjeksiyonundan önce özgün antagonist (CNQX) uygulamasının aktive olan RSPO1 nöron sayısında azalmaya yol açtığı belirlendi ($p<0,001$). Paraventriküler çekirdekte kontrol grubu ve özgün antagonist (CNQX) grubu arasında aktive olan nöron yüzdesi açısından karşılaştırıldığında antagonist grubunda aktive olan nöron sayısının kontrol grubunda fazla olduğu istatistiksel olarak gösterildi ($p=0,019$) (Şekil 15, Şekil 16).



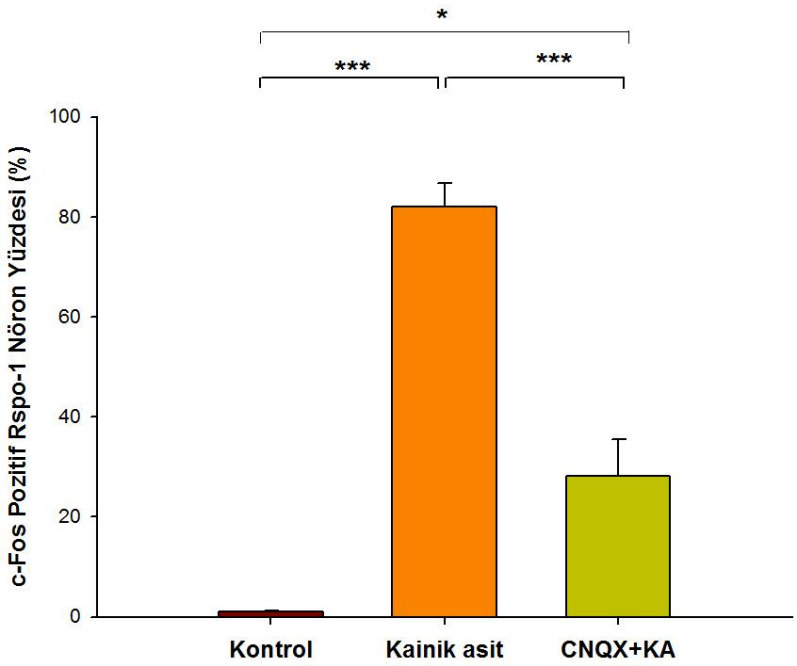
Şekil 13. Kainik asit ve CNQX gruplarında ikili indirekt immünoperoksidaz işaretleme tekniği ile SON'deki RSPO1 nöronlarında c-Fos ekspresyonu. (**i**) Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre SON'nun lokalizasyonu. 40X, 20X (küçük resimler). ok: optik kiyazma.



Şekil 14. Kainik asit ve CNQX gruplarında SON yerleşik aktive olan RSPO1 nöron yüzdelerinin karşılaştırması (***p<0,001).



Şekil 15. Kainik asit ve CNQX gruplarında ikili indirekt immünoperoksidaz işaretleme tekniği ile PVN'deki RSPO1 nöronlarında c-Fos ekspresyonu. (i) Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre PVN'nin lokalizasyonu. 40X, 20X (küçük resimler). 3v: 3. ventrikül



Şekil 16. Kainik asit ve CNQX gruplarında PVN'de yerleşik aktive olan RSPO1 nöron yüzdelerinin karşılaştırması (*p<0,05; ***p<0,001).

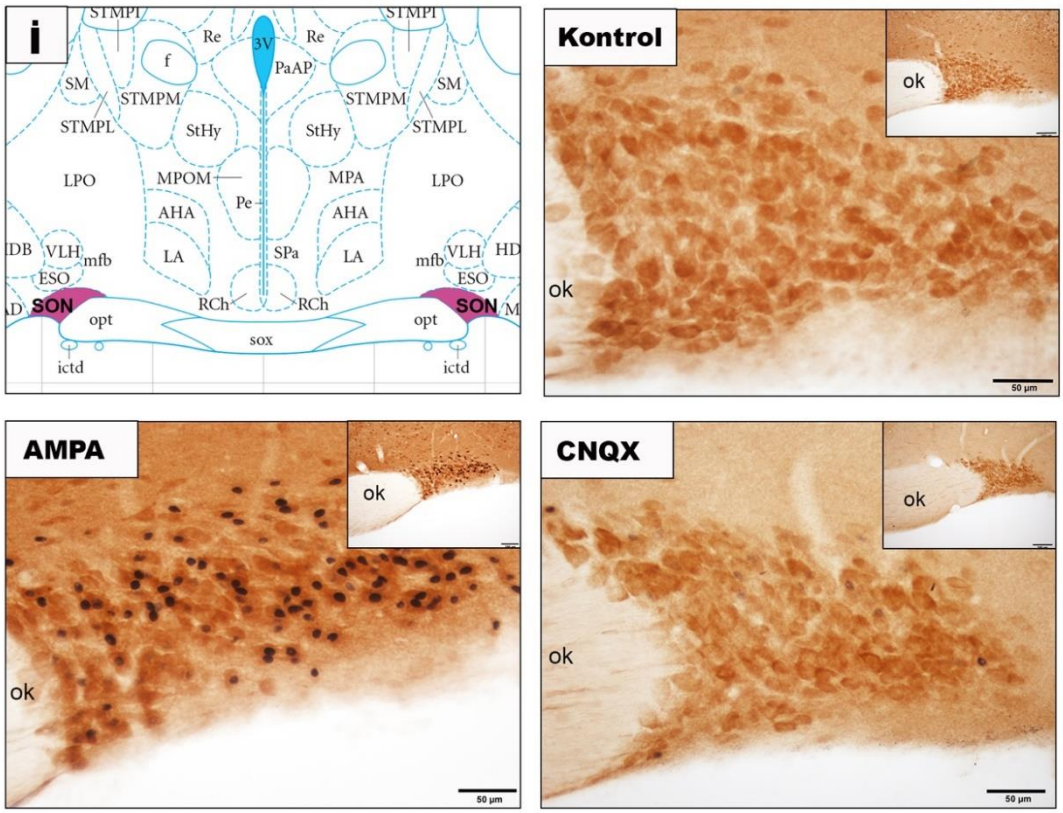
4.1.2. Supraoptik ve paraventriküler çekirdekte yerleşik RSPO1 nöronlarının aktivasyonunda AMPA ve CNQX'in etkisi

Glutamat agonisti AMPA uygulamasının supraoptik çekirdekte yerleşik RSPO1 nöronları üzerindeki etkisini incelemek amacıyla kesitler, RSPO1 ve c-Fos proteinleri için ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi ile boyandı (Şekil 17). Yapılan sayımlar sonucunda SON'de aktive olan RSPO1 nöronlarının yüzdesi kontrol grubunda %1,76±1,7; AMPA grubunda %79,60±9,2; CNQX grubunda %27,41±11,46 olarak bulundu (Şekil 17, Şekil 18).

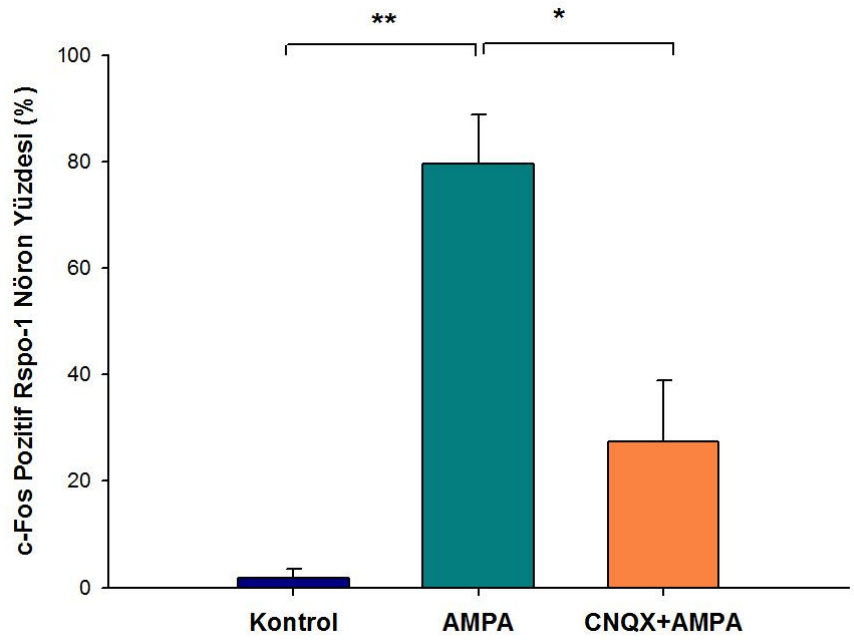
AMPA enjeksiyonundan sonra SON'de yerleşik RSPO1 nöron sayısında kontrol grubuna göre anlamlı olarak artış gözlendi (p=0,002). AMPA enjeksiyonundan önce özgün antagonist (CNQX) uygulamasının aktive olan RSPO1 nöron sayısında azalmaya yol açtığı belirlendi (p=0,012). Supraoptik çekirdekte kontrol grubu ve özgün antagonist (CNQX) grubu arasında aktive olan nöron yüzdesi açısından anlamlı fark olmadığı istatistiksel olarak gösterildi (p=0,166) (Şekil 18).

Paraventriküler çekirdekte glutamat agonisti AMPA uygulamasının RSPO1 nöronları üzerine etkisini incelemek amacıyla ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi ile boyamalar yapıldı (Şekil 19). Sayımlar sonucunda, PVN'de c-Fos-pozitif RSPO1 nöronlarının oranı kontrol grubunda %0,8±0,18; AMPA grubunda %69,96±7,5; CNQX grubunda %29,27±4,76 olarak bulundu (Şekil 19, Şekil 20).

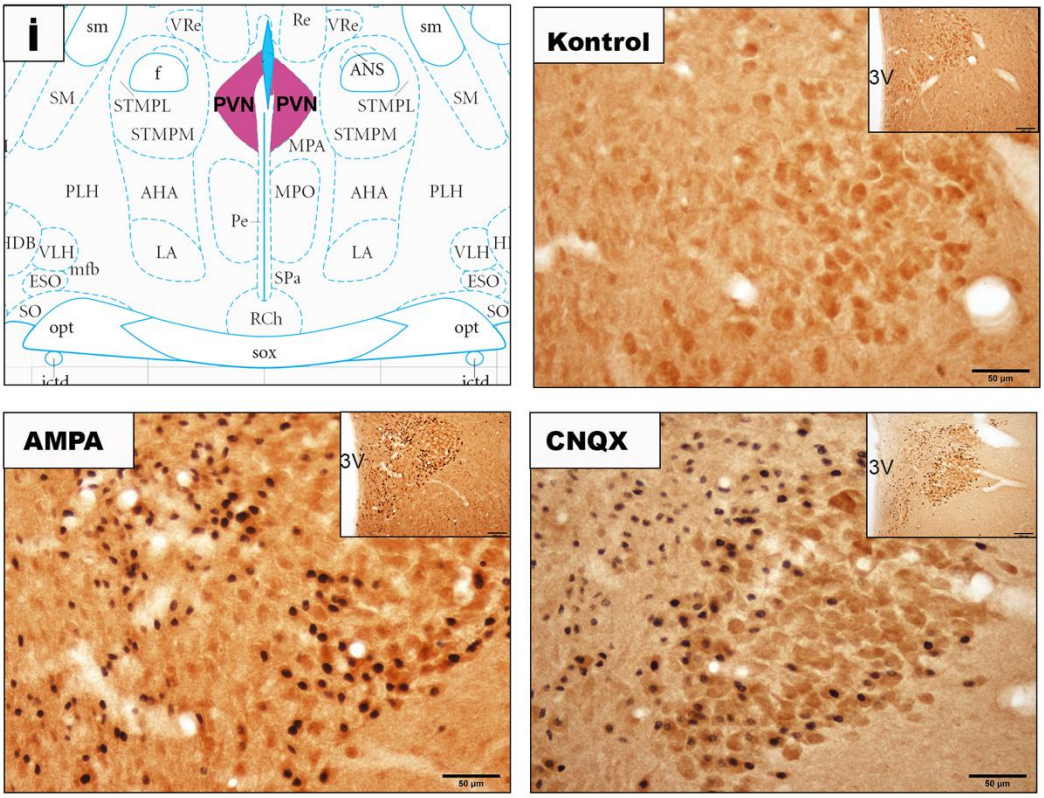
İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde AMPA enjeksiyonundan sonra PVN'de yerleşik RSPO1 nöron sayısı kontrol grubuna göre anlamlı arttığı bulundu (p<0,001). Kainik asit enjeksiyonundan önce özgün antagonist (CNQX) uygulamasının aktive olan RSPO1 nöron sayısında azalmaya yol açtığı belirlendi. (p=0,003) (Şekil 20). Paraventriküler çekirdekte kontrol grubu ve özgün antagonist (CNQX) grubu arasında aktive olan nöron yüzdesi açısından karşılaştırıldığında antagonist grubunda aktive olan nöron sayısının kontrol grubunda fazla olduğu istatistiksel olarak gösterildi (p=0,017) (Şekil 19, Şekil 20).



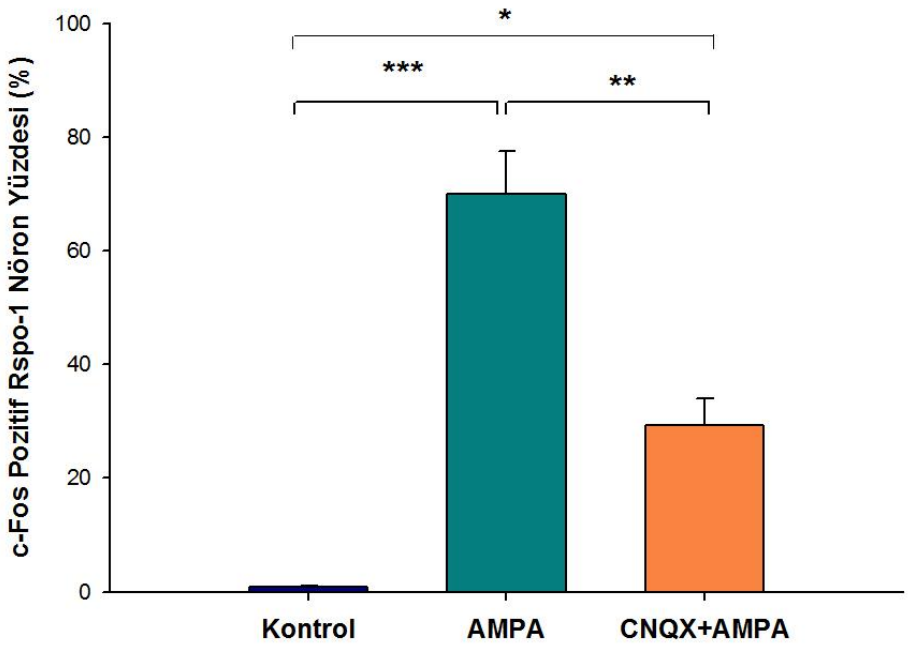
Şekil 17. AMPA ve CNQX gruplarında ikili indirekt immünoperoksidaz işaretleme tekniği ile SON'deki RSPO1 nöronlarında c-Fos ekspresyonu. (**i**) Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre SON'nun lokalizasyonu. 40X, 20X (küçük resimler). ok: optik kiyazma.



Şekil 18. AMPA ve CNQX gruplarında SON'de yerleşik aktive olan RSPO1 nöron yüzdelerinin karşılaştırılması (*p<0,05; **p<0,01).



Şekil 19. AMPA ve CNQX gruplarında ikili indirekt immünoperoksidaz işaretleme tekniği ile PVN'deki RSPO1 nöronlarında c-Fos ekspresyonu. (i) Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre PVN'nin lokalizasyonu. 40X, 20X (küçük resimler). 3v: 3. ventrikül



Şekil 20. AMPA ve CNQX gruplarında PVN'de yerleşik aktive olan RSPO1 nöron yüzdelerinin karşılaştırılması (*p<0,05; **p<0,01***p<0,001).

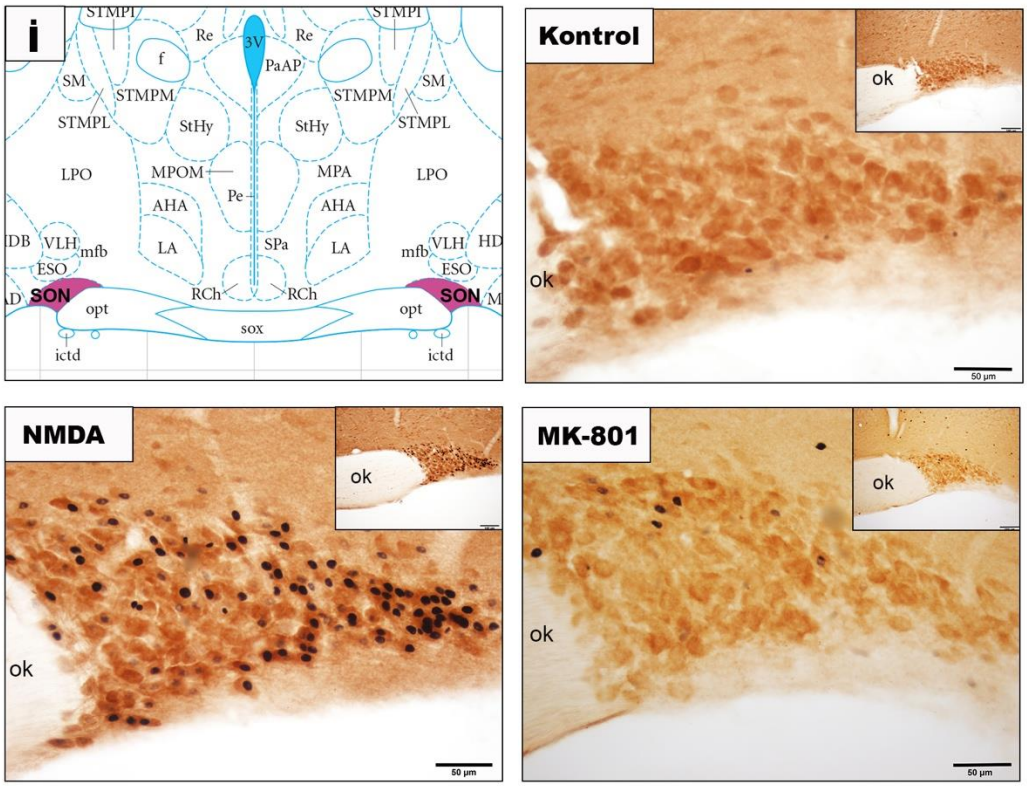
4.1.3. Supraoptik ve paraventriküler çekirdekte yerleşik RSPO1 nöronlarının aktivasyonunda NMDA ve MK-801'in etkisi

Glutamat agonisti NMDA uygulamasının supraoptik çekirdekte yerleşik RSPO1 nöronları üzerindeki etkisini incelemek amacıyla kesitler, RSPO1 ve c-Fos proteinleri için ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi ile boyandı (Şekil 21). Yapılan sayımlar sonucunda SON'de aktive olan RSPO1 nöronlarının yüzdesi kontrol grubunda %0,9±0,001; NMDA grubunda %76,98±2,19 MK-801 grubunda %5,07±1,52 olarak bulundu (Şekil 21, Şekil 22).

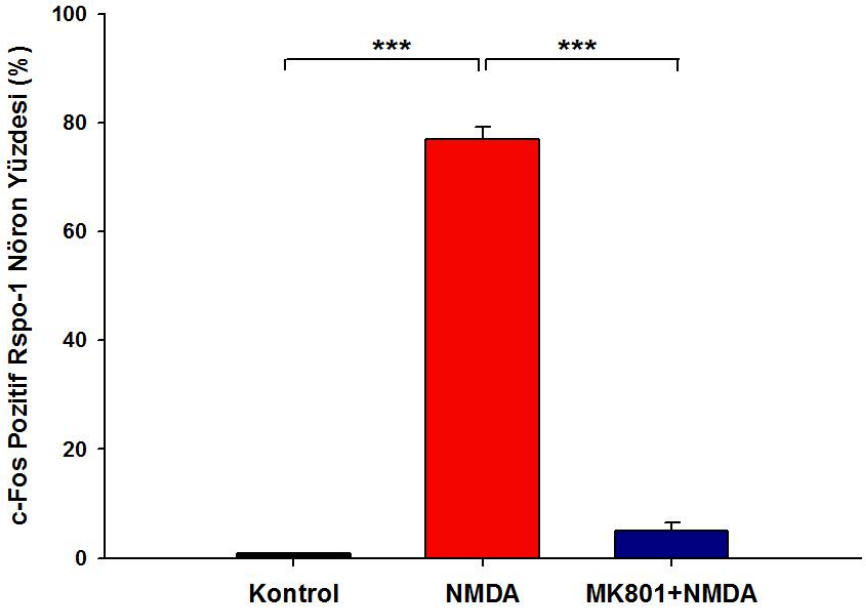
İstatistiksel analiz sonucunda NMDA enjeksiyonundan sonra SON'de yerleşik RSPO1 nöron sayısında anlamlı olarak artış gözlendi ($p<0,001$). NMDA enjeksiyonundan önce özgün antagonist (MK-801) uygulamasının aktive olan RSPO1 nöron sayısında azalmaya yol açtığı belirlendi. ($p<0,001$). Supraoptik çekirdekte kontrol grubu ve özgün antagonist (MK-801) grubu arasında aktive olan nöron yüzdesi açısından anlamlı fark olmadığı istatistiksel olarak gösterildi ($p=0,127$) (Şekil 22).

Paraventriküler çekirdekte glutamat agonisti NMDA uygulamasının RSPO1 nöronları üzerine etkisini incelemek amacıyla ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi ile boyamalar yapıldı (Şekil 23). Sayımlar sonucunda, PVN'de c-Fos-pozitif RSPO1 nöronlarının oranı kontrol grubunda %2,32±1,42; NMDA grubunda %76,97±0,48; MK-801 grubunda %20,73±9,33 olarak bulundu (Şekil 23, Şekil 24).

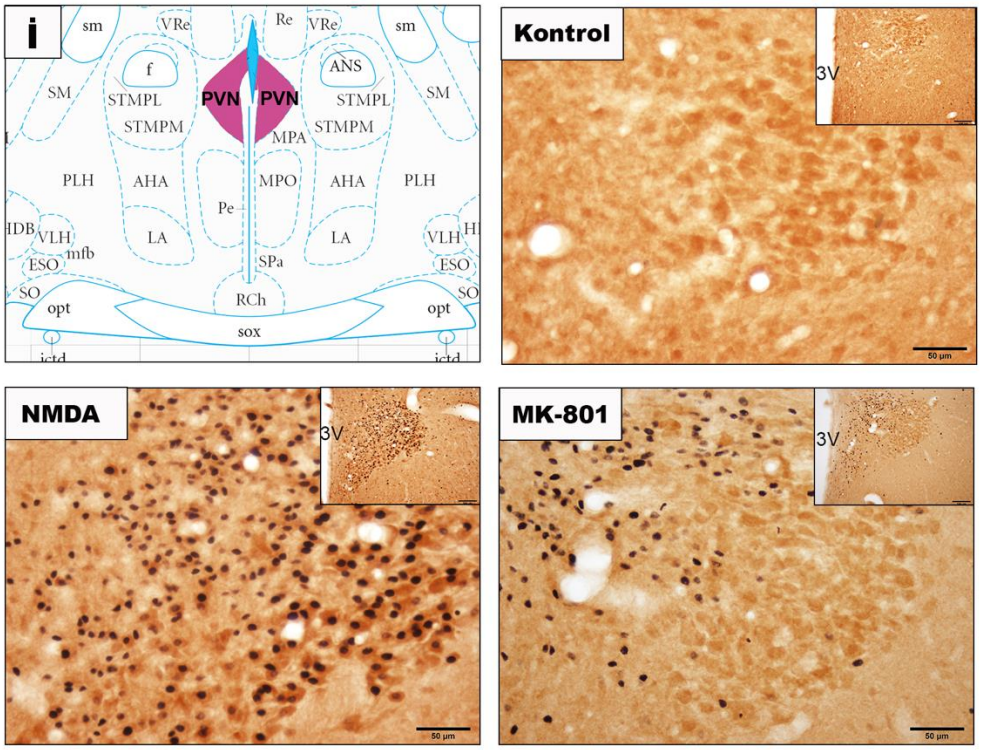
İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde NMDA enjeksiyonundan sonra PVN'de yerleşik RSPO1 nöron sayısında göre anlamlı olarak artış gözlendi ($p<0,001$). NMDA enjeksiyonundan önce özgün antagonist (MK-801) uygulamasının aktive olan RSPO1 nöron sayısında azalmaya yol açtığı belirlendi ($p<0,001$). Paraventriküler çekirdekte kontrol grubu ve özgün antagonist (MK-801) grubu arasında aktive olan nöron yüzdesi açısından anlamlı fark olmadığı istatistiksel olarak gösterildi ($p=0,118$) (Şekil 24).



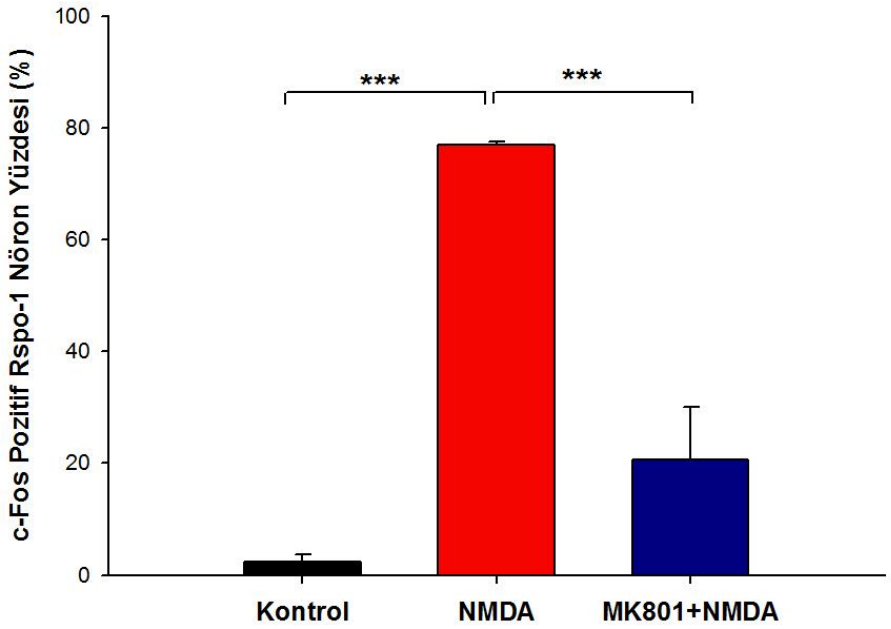
Şekil 21. NMDA ve MK-801 gruplarında ikili indirekt immünoperoksidaz işaretleme tekniği ile SON'deki RSPO1 nöronlarında c-Fos ekspresyonu. (i) Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre SON'nin lokalizasyonu. 40X, 20X (küçük resimler). ok: optik kiyazma.



Şekil 22. NMDA ve MK801gruplarında SON'de yerleşik aktive olan RSPO1 nöron yüzdelerinin karşılaştırılması (***p<0,001).



Şekil 23. NMDA ve MK-801 gruplarında ikili indirekt immünoperoksidaz işaretleme tekniği ile PVN'deki RSPO1 nöronlarında c-Fos ekspresyonu. (i) Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre PVN'nin lokalizasyonu. 40X, 20X (küçük resimler). 3v:3. ventrikül



Şekil 24. NMDA ve MK801gruplarında PVN'de yerleşik aktive olan RSPO1 nöron yüzdelerinin karşılaştırılması (***p<0,001).

4.2. Rspo-1 Nöronlarının Besin ve/veya Glikoz Verilerek Uyarılması ve Bu Uyarımda Glutamat Antagonistlerinin Etkinliğinin Araştırılması

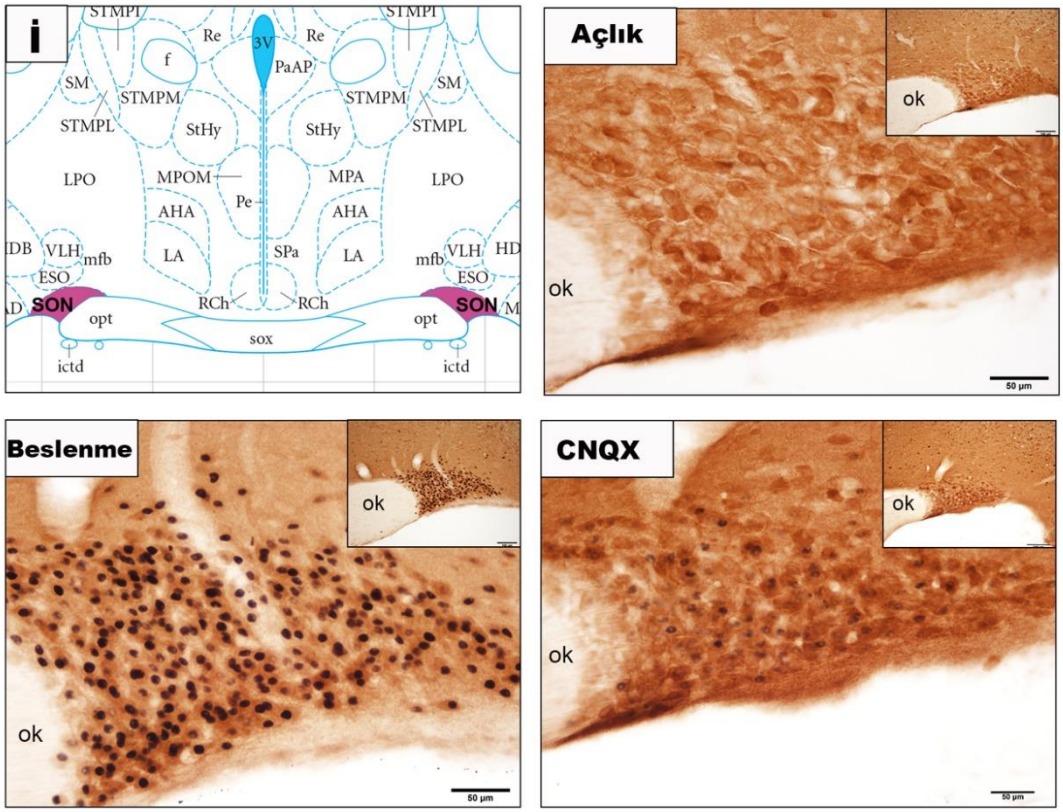
4.2.1. Supraoptik ve paraventriküler çekirdekte yerleşik RSPO1 nöronlarının aktivasyonunda beslenme ve CNQX'in etkisi

Beslenmenin ve beslenmeden önce CNQX uygulamasının supraoptik çekirdekte yerleşik RSPO1 nöronları üzerindeki etkisini incelemek amacıyla kesitler, RSPO1 ve c-Fos proteinleri için ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi ile boyandı (Şekil 25). Yapılan sayımlar sonucunda SON'de aktive olan RSPO1 nöronlarının yüzdesi açlık grubunda %4,61±2,22; beslenme grubunda %93,71±3,27 CNQX grubunda %28,02±16,04 olarak bulundu (Şekil 25, Şekil 26).

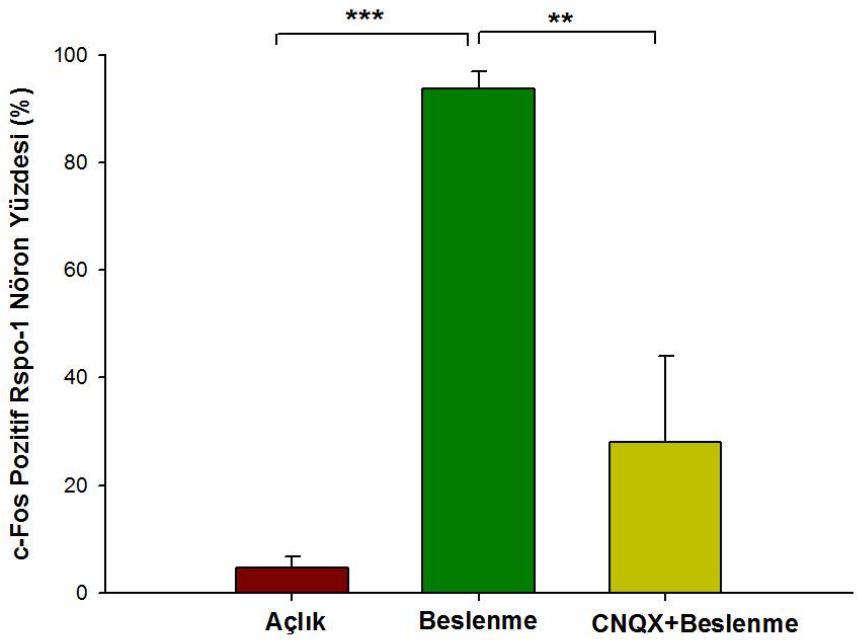
İstatistiksel analiz sonucunda açlık sonrası beslenme grubunda SON'de yerleşik RSPO1 nöron sayısında anlamlı olarak artış gözlendi (p=0,001). Beslenmeden önce CNQX uygulamasının aktive olan RSPO1 nöron sayısında azalmaya yol açtığı belirlendi. (p=0,007). Supraoptik çekirdekte açlık grubu ve CNQX grubu arasında aktive olan nöron yüzdesi açısından anlamlı fark olmadığı istatistiksel olarak gösterildi (p=0,268) (Şekil 26).

Paraventriküler çekirdekte beslenmenin ve beslenmeden önce CNQX uygulamasının RSPO1 nöronları üzerindeki etkisini incelemek amacıyla kesitler, RSPO1 ve c-Fos proteinleri için ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi ile boyandı (Şekil 27). Yapılan sayımlar sonucunda PVN'de aktive olan RSPO1 nöronlarının yüzdesi açlık grubunda %15,76±4,46; beslenme grubunda %84,21±6,68 CNQX grubunda %10,62±5,43 olarak bulundu (Şekil 27, Şekil 28).

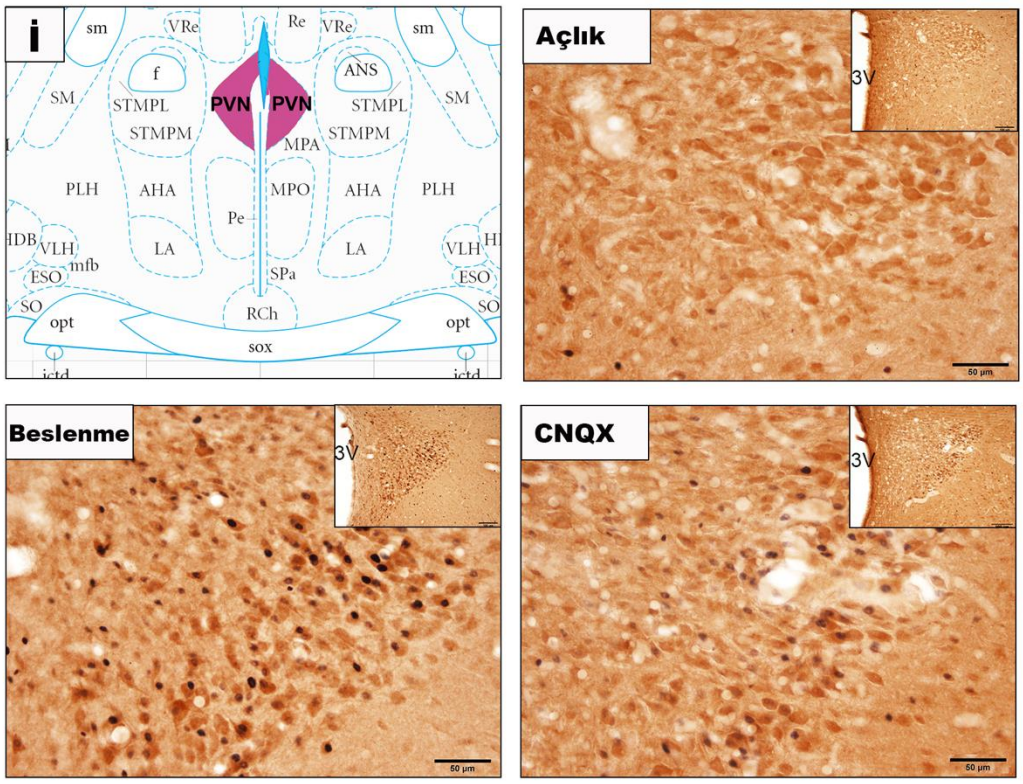
PVN' de açlık sonrası beslenme grubunda RSPO1 nöron sayısında anlamlı olarak artış gözlendi (p<0,001). Beslenmeden önce CNQX uygulamasının aktive olan RSPO1 nöron sayısında azalmaya yol açtığı belirlendi (p<0,001). PVN'de açlık grubu ve CNQX grubu arasında aktive olan nöron yüzdesi açısından anlamlı fark olmadığı istatistiksel olarak gösterildi (p=0,800) (Şekil 26).



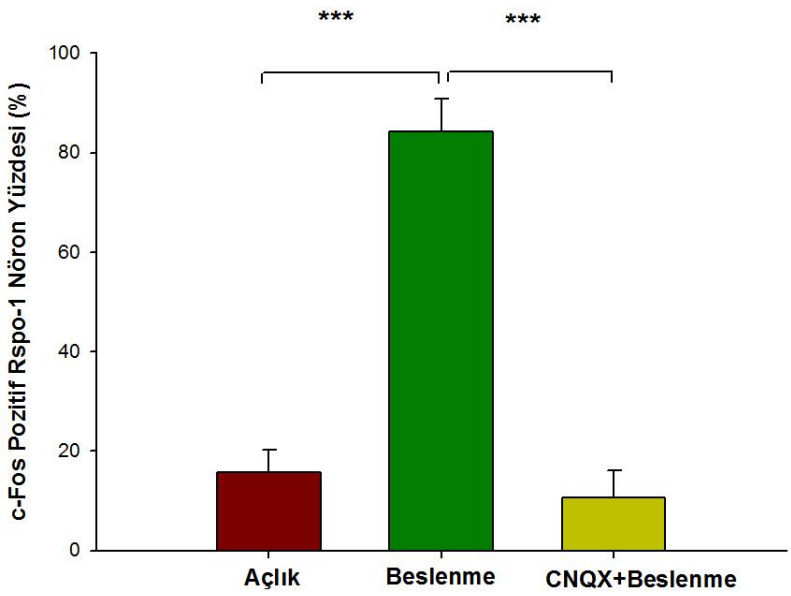
Şekil 25. Beslenme ve CNQX gruplarında ikili indirekt immünoperoksidaz işaretleme tekniği ile SON'deki RSPO1 nöronlarında c-Fos ekspresyonu. (i) Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre SON'nun lokalizasyonu. 40X, 20X (küçük resimler). ok: optik kiyazma.



Şekil 26. Beslenme ve CNQX gruplarında SON'de yerleşik aktive olan RSPO1 nöron yüzdelerinin karşılaştırılması (**p<0,01; ***p<0,001).



Şekil 27. Beslenme ve CNQX gruplarında ikili indirekt immünoperoksidaz işaretleme tekniği ile PVN'deki RSPO1 nöronlarında c-Fos ekspresyonu. (i) Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre PVN'nin lokalizasyonu. 40X, 20X (küçük resimler). 3v:3. ventrikül



Şekil 28. Beslenme ve CNQX gruplarında PVN'de yerleşik aktive olan RSPO1 nöron yüzdelerinin karşılaştırılması (***p<0,001).

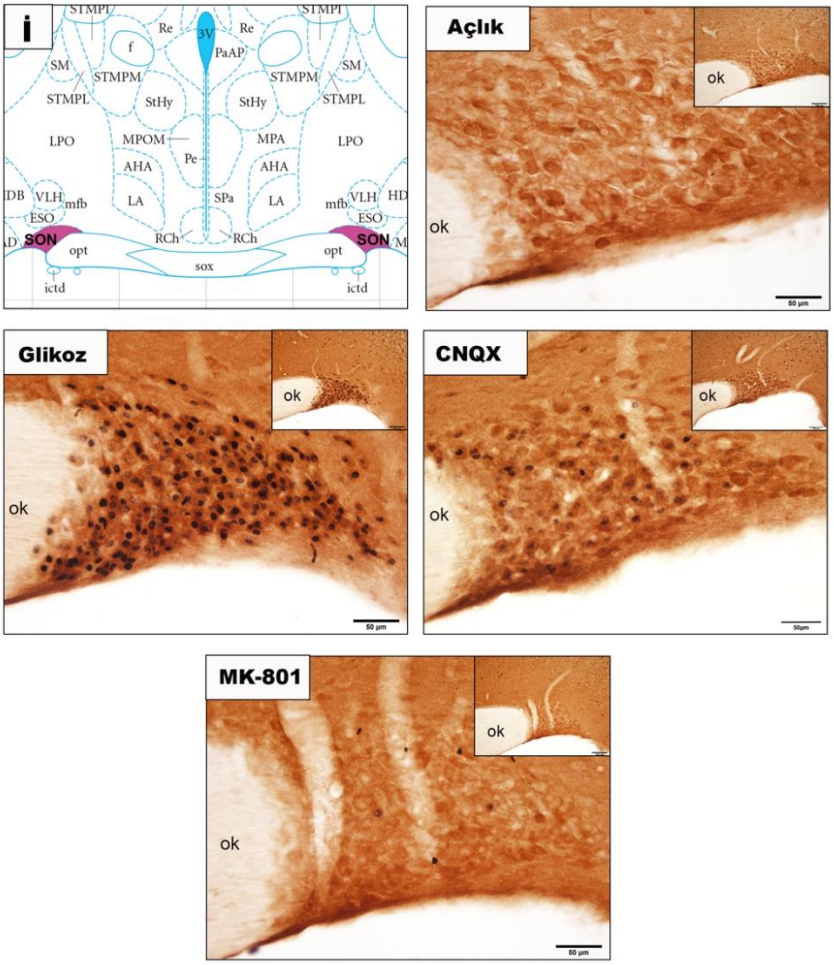
4.2.2. Supraoptik ve paraventriküler çekirdekte yerleşik RSPO1 nöronlarının aktivasyonunda glikoz enjeksiyonunun ve CNQX veya MK-801'in etkileri

Glikoz ve glikozdan önce glutamat reseptör antagonistleri olan CNQX ve MK-801 uygulamasının supraoptik çekirdekte yerleşik RSPO1 nöronları üzerindeki etkisini incelemek amacıyla kesitler, RSPO1 ve c-Fos proteinleri için ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi ile boyandı (Şekil 29). Yapılan sayımlar sonucunda SON'de aktive olan RSPO1 nöronlarının yüzdesi açlık grubunda %4,61±2,22; glikoz grubunda %79,63±9,56 CNQX grubunda %11,16±4,85 ve MK-801 grubunda 1,74±0,72 olarak bulundu (Şekil 29, Şekil 30).

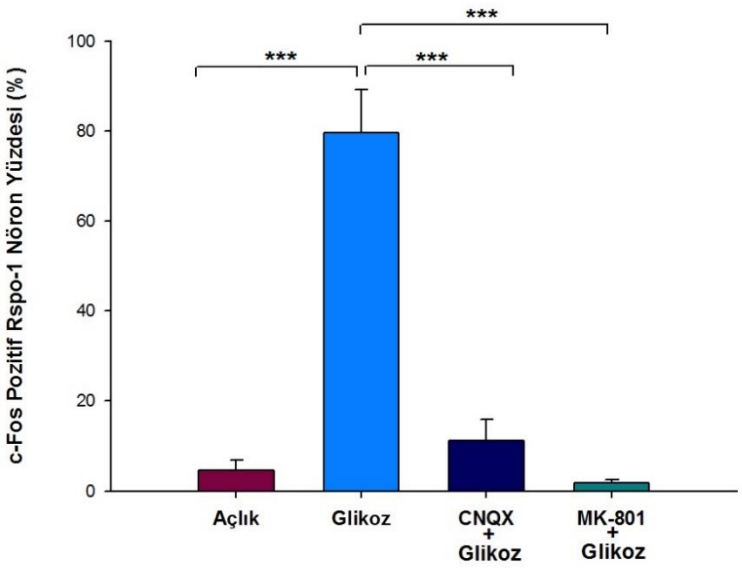
İstatistiksel analiz sonucunda açlık sonrası glikoz grubunda SON'de yerleşik RSPO1 nöron sayısında anlamlı olarak artış gözlendi ($p<0,001$). Glikoz enjeksiyonundan önce antagonist CNQX veya MK-801 uygulamasının aktive olan RSPO1 nöron sayısında azalmaya yol açtığı belirlendi. ($p<0,001$). Supraoptik çekirdekte açlık grubu ve glutamat reseptör antagonistleri olan hem CNQX hem de MK-801 grubu arasında aktive olan nöron yüzdesi açısından anlamlı fark olmadığı istatistiksel olarak gösterildi (sırasıyla $p=833$; $p=982$) (Şekil 30).

Paraventriküler çekirdekte glikoz ve glikozdan önce özgün glutamat reseptör antagonistleri olan CNQX ve MK-801 RSPO1 nöronları üzerindeki etkisini incelemek amacıyla kesitler, RSPO1 ve c-Fos proteinleri için ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi ile boyandı (Şekil 31). Yapılan sayımlar sonucunda PVN'de aktive olan RSPO1 nöronlarının yüzdesi açlık grubunda %15,76±4,46; glikoz grubunda %80,05±5,02, CNQX+glikoz grubunda %13,52±7,45 ve MK-801+glikoz grubunda %13,58±1,50 olarak bulundu (Şekil 31, Şekil 32).

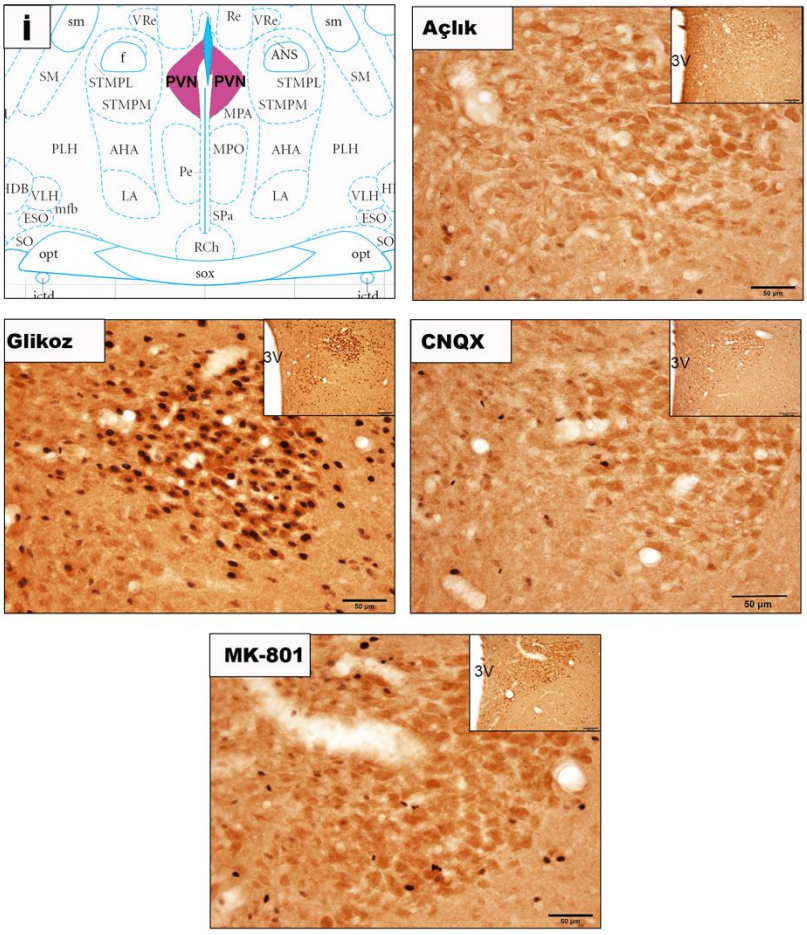
İstatistiksel analiz sonucunda açlık sonrası glikoz grubunda PVN'de yerleşik RSPO1 nöron sayısında anlamlı olarak artış gözlendi ($p<0,001$). Glikoz uygulamasından önce antagonist CNQX veya MK-801 uygulamasının aktive olan RSPO1 nöron sayısında azalmaya yol açtığı belirlendi ($p<0,001$). Paraventriküler çekirdekte açlık grubu ve glutamat reseptör antagonistleri olan hem CNQX hem de MK-801 grubu arasında aktive olan nöron yüzdesi açısından anlamlı fark olmadığı istatistiksel olarak gösterildi (sırasıyla $p=0,986$; $p=0,989$) (Şekil 32).



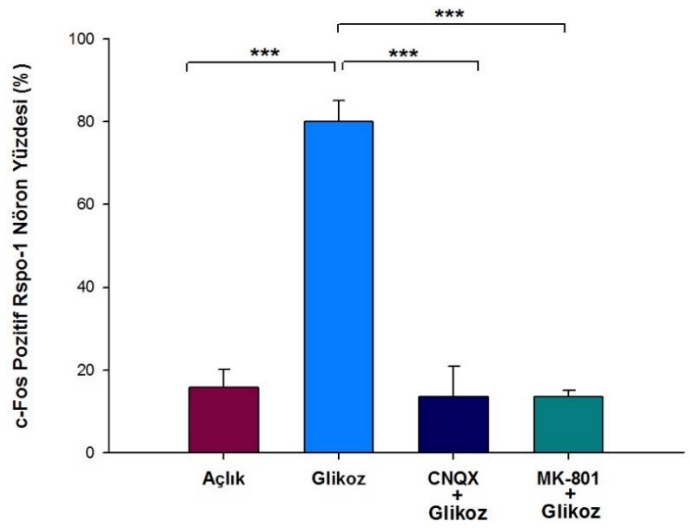
Şekil 29. Beslenme, CNQX ve MK-801 gruplarında ikili indirekt immünoperoksidaz işaretleme tekniği ile SON'deki RSPO1 nöronlarında c-Fos ekspresyonu. (i) Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre SON'nun lokalizasyonu. 40X, 20X (küçük resimler). ok: optik kiyazma.



Şekil 30. Beslenme, CNQX ve MK-801 gruplarında SON'de yerleşik aktive olan RSPO1 nöron yüzdelerinin karşılaştırılması (***p<0,001).



Şekil 31. Beslenme, CNQX ve MK-801 gruplarında ikili indirekt immünoperoksidaz işaretleme tekniği ile PVN'deki RSPO1 nöronlarında c-Fos ekspresyonu. (i) Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre PVN'nin lokalizasyonu. 40X, 20X (küçük resimler). 3v:3. ventrikül



Şekil 32. Beslenme, CNQX ve MK-801 gruplarında PVN'de yerleşik aktive olan RSPO1 nöron yüzdelerinin karşılaştırılması (***p<0,001).

4.3. RSPO3 Nöronlarının Aktivasyonunda Glutamat Reseptör Agonist ve Antagonistlerinin Etkisi

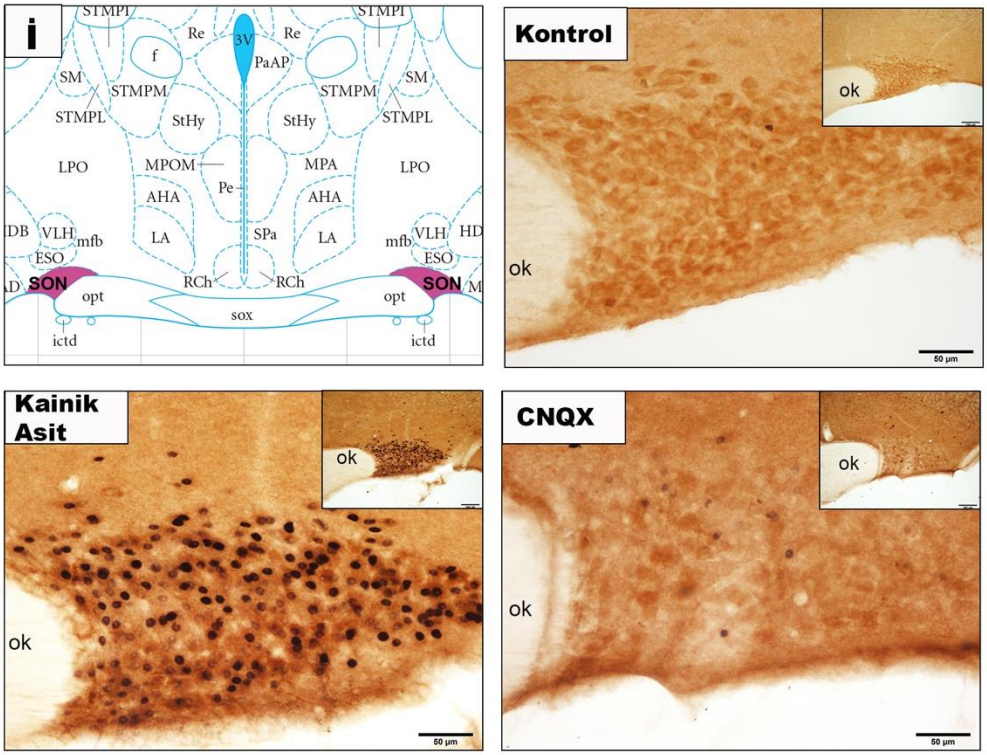
4.3.1. Supraoptik ve paraventriküler çekirdekte yerleşik RSPO3 nöronlarının aktivasyonunda kainik asit ve CNQX'in etkisi

Glutamat agonisti kainik asit uygulamasının supraoptik çekirdekte yerleşik RSPO3 nöronları üzerindeki etkisini incelemek amacıyla kesitler, RSPO3 ve c-Fos proteinleri için ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi ile boyandı (Şekil 33). Yapılan sayımlar sonucunda SON'de c-Fos-pozitif RSPO3 nöronlarının yüzdesi kontrol grubunda %0,8±0,65; kainik asit grubunda %81,42±7,06; CNQX grubunda %11,31±3,86 olarak bulundu (Şekil 33, Şekil 34).

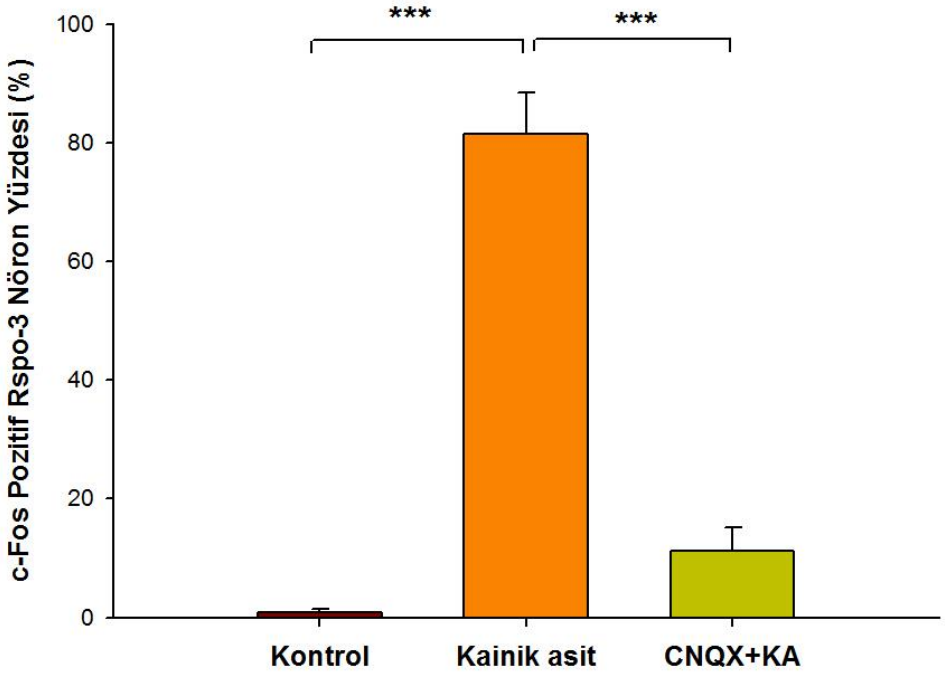
İstatistiksel analiz sonucunda kainik asit enjeksiyonundan sonra SON'de yerleşik RSPO3 nöron sayısında anlamlı olarak artış gözlendi ($p<0,001$). Kainik asit enjeksiyonundan önce özgün antagonist (CNQX) uygulamasının aktive olan RSPO3 nöron sayısında azalmaya yol açtığı belirlendi ($p<0,001$). Supraoptik çekirdekte kontrol grubu ve özgün antagonist (CNQX) grubu arasında aktive olan nöron yüzdesi açısından anlamlı fark olmadığı istatistiksel olarak gösterildi ($p=0,319$) (Şekil 34).

Paraventriküler çekirdekte glutamat agonisti kainik asit uygulamasının RSPO3 nöronları üzerine etkisini incelemek amacıyla ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi ile boyamalar yapıldı (Şekil 35). Sayımlar sonucunda, PVN'de c-Fos-pozitif RSPO3 nöronlarının oranı kontrol grubunda %1,26±0,03; kainik asit grubunda %81,66±4,71; CNQX grubunda %44,53±4,81 olarak bulundu (Şekil 35, Şekil 36).

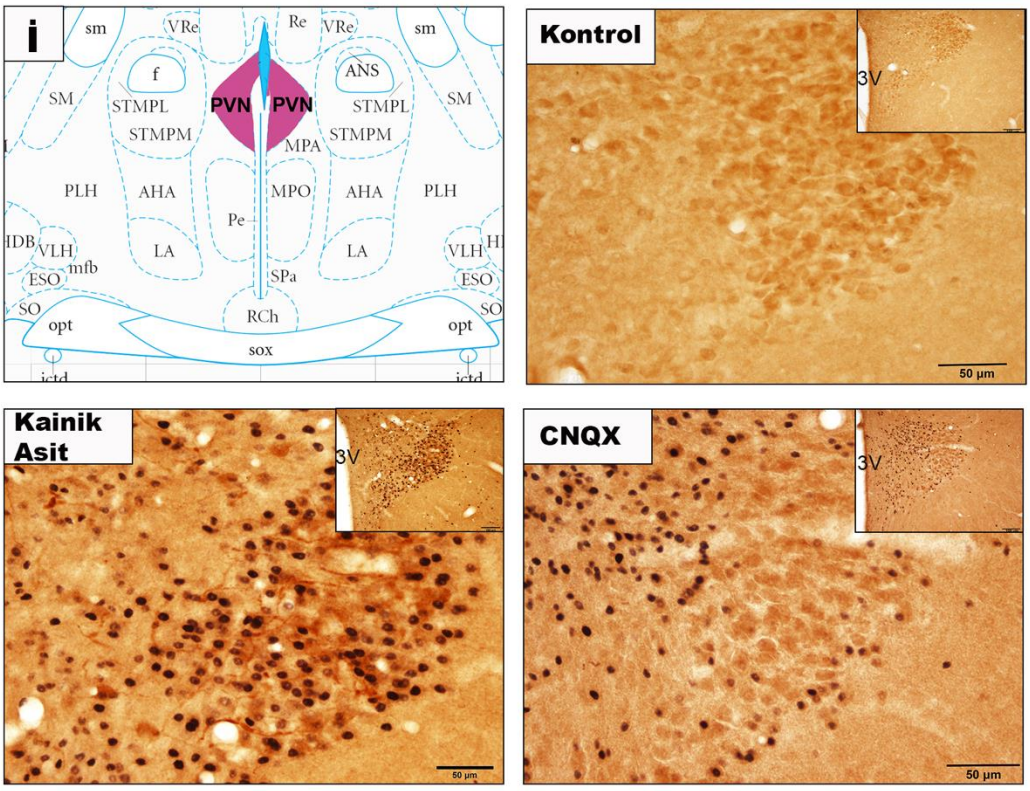
İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde kainik asit enjeksiyonundan sonra PVN'de yerleşik RSPO3 nöron sayısında göre anlamlı olarak artış gözlendi ($p<0,001$). Kainik asit enjeksiyonundan önce özgün antagonist (CNQX) uygulamasının aktive olan RSPO3 nöron sayısında azalmaya yol açtığı belirlendi ($p<0,001$). Paraventriküler çekirdekte kontrol grubu ve özgün antagonist (CNQX) grubu arasında aktive olan nöron yüzdesi açısından karşılaştırıldığında antagonist grubunda aktive olan nöron sayısının kontrol grubunda fazla olduğu istatistiksel olarak gösterildi ($p<0,001$) (Şekil 35, Şekil 36).



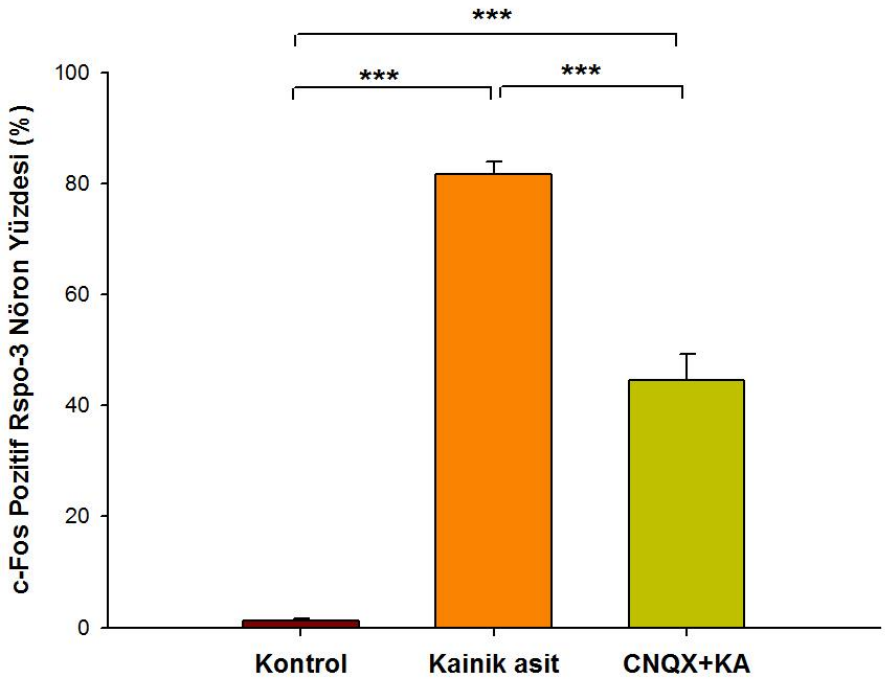
Şekil 33. Kainik asit ve CNQX gruplarında ikili indirekt immünoperoksidaz işaretleme tekniği ile SON'deki RSPO3 nöronlarında c-Fos ekspresyonu. (**i**) Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre SON'nun lokalizasyonu. 40X, 20X (küçük resimler). ok: optik kiyazma.



Şekil 34. Kainik asit ve CNQX gruplarında SON'de yerleşik aktive olan RSPO3 nöron yüzdelerinin karşılaştırılması (***p<0,001).



Şekil 35. Kainik asit ve CNQX gruplarında ikili indirekt immünoperoksidaz işaretleme tekniği ile PVN'deki RSPO3 nöronlarında c-Fos ekspresyonu. (**i**) Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre PVN'nin lokalizasyonu. 40X, 20X (küçük resimler). 3v: 3. Ventrikül



Şekil 36. Kainik asit ve CNQX gruplarında PVN'de yerleşik aktive olan RSPO3 nöron yüzdelerinin karşılaştırılması (***p<0,001).

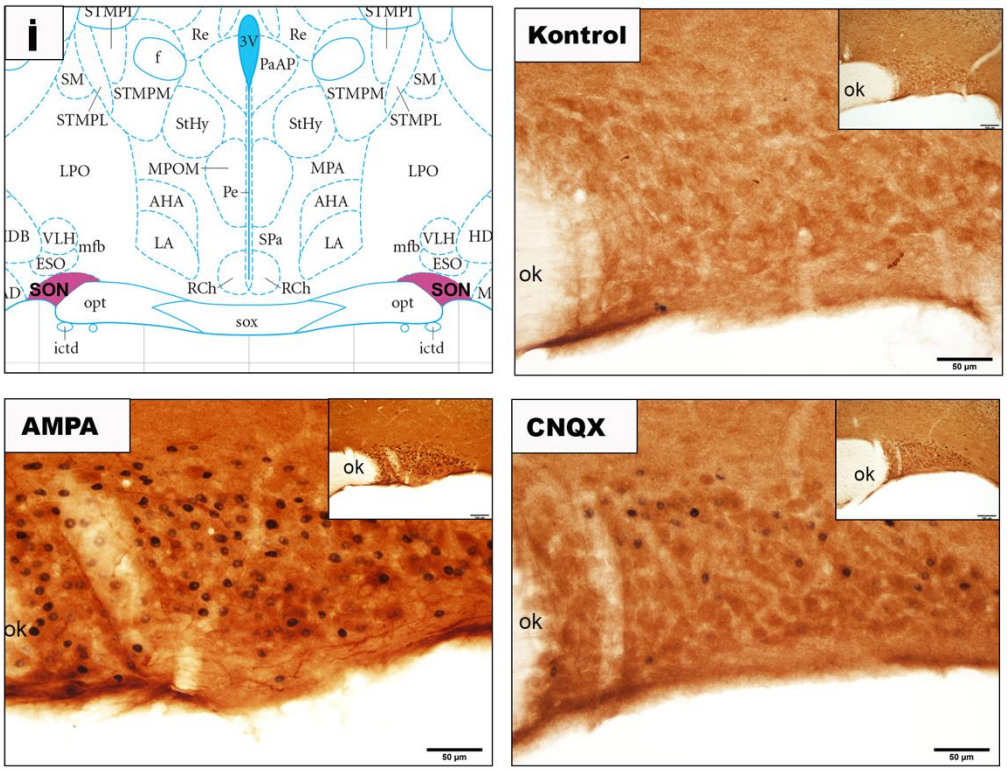
4.3.2. Supraoptik ve paraventriküler çekirdekte yerleşik RSPO3 nöronlarının aktivasyonunda AMPA ve CNQX'in etkisi

Glutamat agonisti AMPA uygulamasının supraoptik çekirdekte yerleşik RSPO3 nöronları üzerindeki etkisini incelemek amacıyla kesitler, RSPO3 ve c-Fos proteinleri için ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi ile boyandı (Şekil 37). Yapılan sayımlar sonucunda SON'de aktive olan RSPO3 nöronlarının yüzdesi kontrol grubunda %0,63±0,32; AMPA grubunda %85,87±6,18; CNQX grubunda %37,06±14,75 olarak bulundu (Şekil 37, Şekil 38).

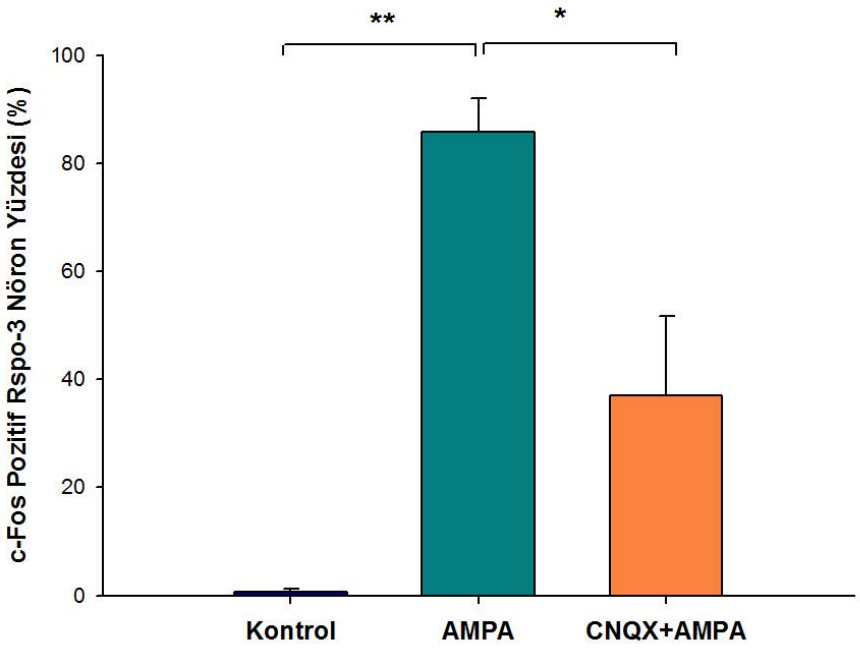
AMPA enjeksiyonundan sonra SON'de yerleşik RSPO3 nöron sayısında kontrol grubuna göre anlamlı olarak artış gözlendi (p=0,002). AMPA enjeksiyonundan önce özgün antagonist (CNQX) uygulamasının aktive olan RSPO3 nöron sayısında azalmaya yol açtığı belirlendi. (p=0,023). Supraoptik çekirdekte kontrol grubu ve özgün antagonist (CNQX) grubu arasında aktive olan nöron yüzdesi açısından anlamlı fark olmadığı istatistiksel olarak gösterildi (p=0,071) (Şekil 38).

Paraventriküler çekirdekte glutamat agonisti AMPA uygulamasının RSPO3 nöronları üzerine etkisini incelemek amacıyla ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi ile boyamalar yapıldı (Şekil 19). Sayımlar sonucunda, PVN'de c-Fos-pozitif RSPO3 nöronlarının oranı kontrol grubunda %2,15±12; AMPA grubunda %81,03±5,11; CNQX grubunda %38,41±13,04 olarak bulundu (Şekil 39, Şekil 40).

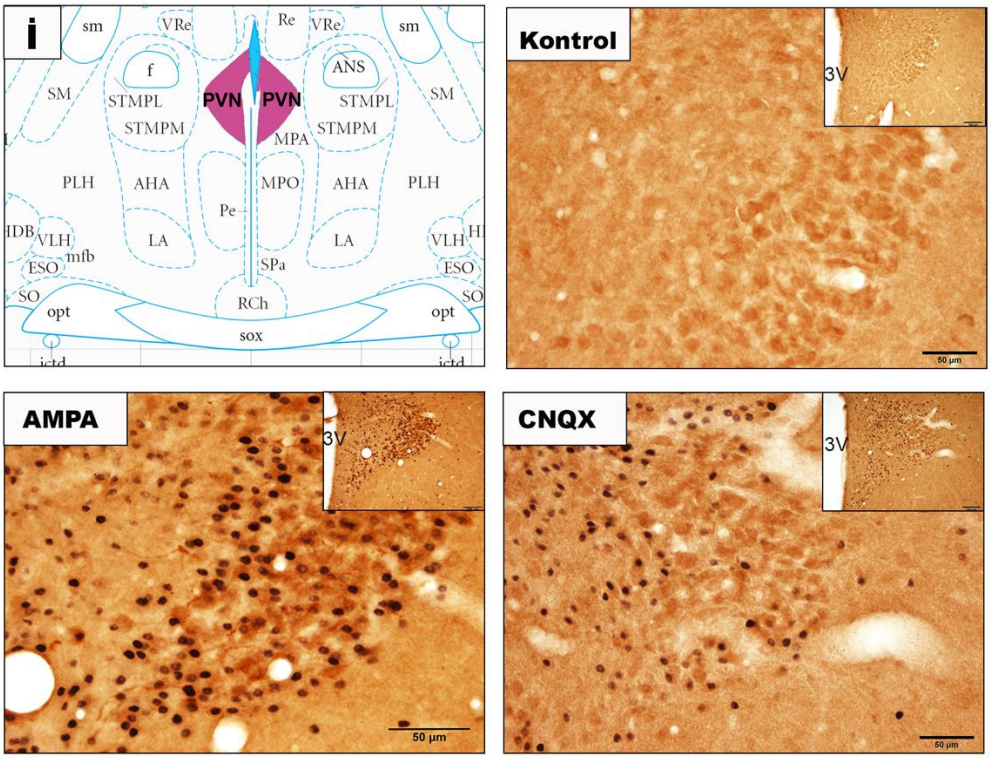
İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde AMPA enjeksiyonundan sonra PVN'de yerleşik RSPO3 nöron sayısının kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı bulundu (p=0,001). Kainik asit enjeksiyonundan önce özgün antagonist (CNQX) uygulamasının aktive olan RSPO3 nöron sayısında azalmaya yol açtığı belirlendi. (p=0,024) (Şekil 20). Paraventriküler çekirdekte kontrol grubu ve özgün antagonist (CNQX) grubu arasında aktive olan nöron yüzdesi açısından karşılaştırıldığında, antagonist grubunda aktive olan nöron sayısının kontrol grubundan fazla olduğu istatistiksel olarak gösterildi (p=0,046) (Şekil 39, Şekil 40).



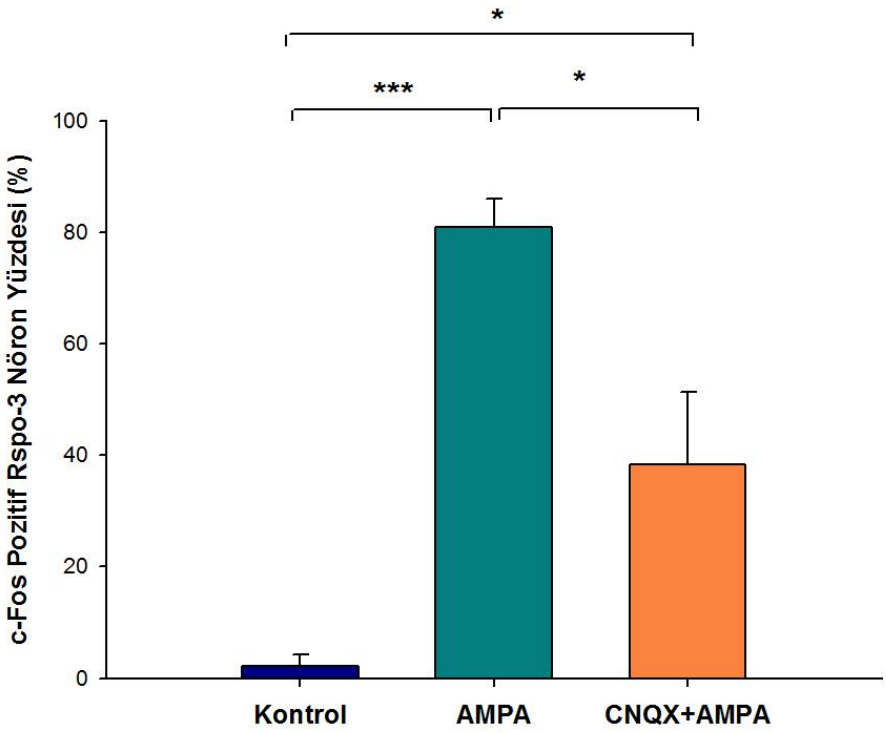
Şekil 37. AMPA ve CNQX gruplarında ikili indirekt immünoperoksidaz işaretleme tekniği ile SON'deki RSPO3 nöronlarında c-Fos ekspresyonu. (i) Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre SON'nun lokalizasyonu. 40X, 20X (küçük resimler). ok: optik kiyazma.



Şekil 38. AMPA ve CNQX gruplarında SON'de yerleşik aktive olan RSPO3 nöron yüzdelerinin karşılaştırılması (*p<0,05; ***p<0,001).



Şekil 39. AMPA ve CNQX gruplarında ikili indirekt immünoperoksidaz işaretleme tekniği ile PVN'deki RSPO3 nöronlarında c-Fos ekspresyonu. (i) Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre PVN'nin lokalizasyonu. 40X, 20X (küçük resimler). 3v: 3. ventrikül



Şekil 40. AMPA ve CNQX gruplarında PVN'de yerleşik aktive olan RSPO3 nöron yüzdelerinin karşılaştırılması (*p<0,05; ***p<0,001).

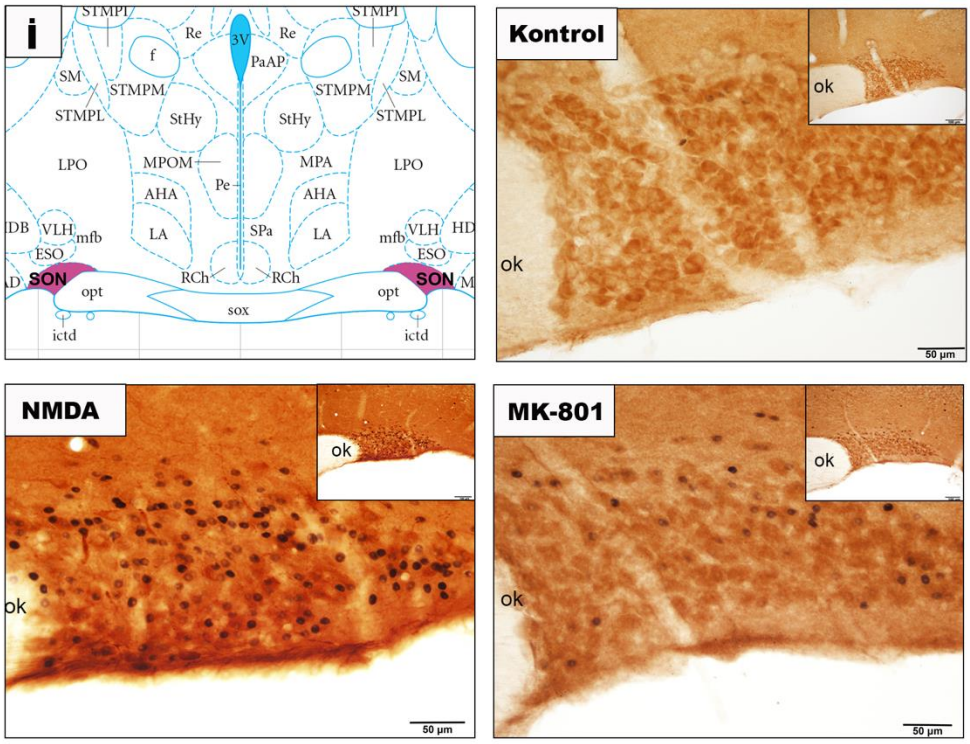
4.3.3. Supraoptik ve paraventriküler çekirdekte yerleşik RSPO3 nöronlarının aktivasyonunda NMDA ve MK-801'in etkisi

Glutamat agonisti NMDA uygulamasının supraoptik çekirdekte yerleşik RSPO3 nöronları üzerindeki etkisini incelemek amacıyla kesitler, RSPO3 ve c-Fos proteinleri için ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi ile boyandı (Şekil 41). Yapılan sayımlar sonucunda SON'de aktive olan RSPO3 nöronlarının yüzdesi kontrol grubunda %0,56±0,41; NMDA grubunda %75,1±6,58 MK-801 grubunda %13,91±0,72 olarak bulundu (Şekil 41, Şekil 42).

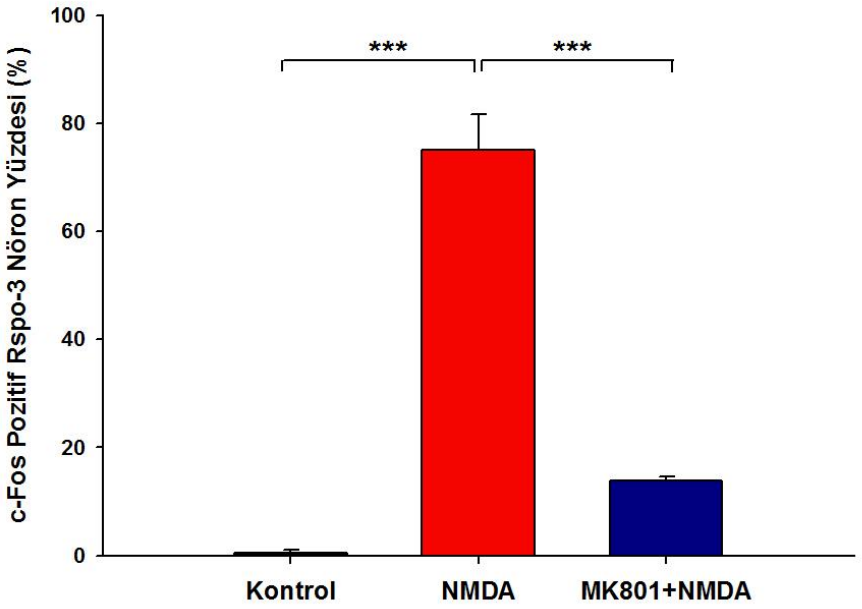
İstatistiksel analiz sonucunda NMDA enjeksiyonundan sonra SON'de yerleşik RSPO3 nöron sayısında anlamlı olarak artış gözlendi ($p<0,001$). NMDA enjeksiyonundan önce özgün antagonist (MK-801) uygulamasının aktive olan RSPO3 nöron sayısında azalmaya yol açtığı belirlendi ($p<0,001$). Supraoptik çekirdekte kontrol grubu ve özgün antagonist (MK-801) grubu arasında aktive olan nöron yüzdesi açısından anlamlı fark olmadığı istatistiksel olarak gösterildi ($p=0,107$) (Şekil 42).

Paraventriküler çekirdekte glutamat agonisti NMDA uygulamasının RSPO3 nöronları üzerine etkisini incelemek amacıyla ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi ile boyamalar yapıldı (Şekil 43). Sayımlar sonucunda, PVN'de c-Fos-pozitif RSPO3 nöronlarının oranı kontrol grubunda %2,96±1,73; NMDA grubunda %79,42±4,95; MK-801 grubunda %24,63±3,63 olarak bulundu (Şekil 43, Şekil 44).

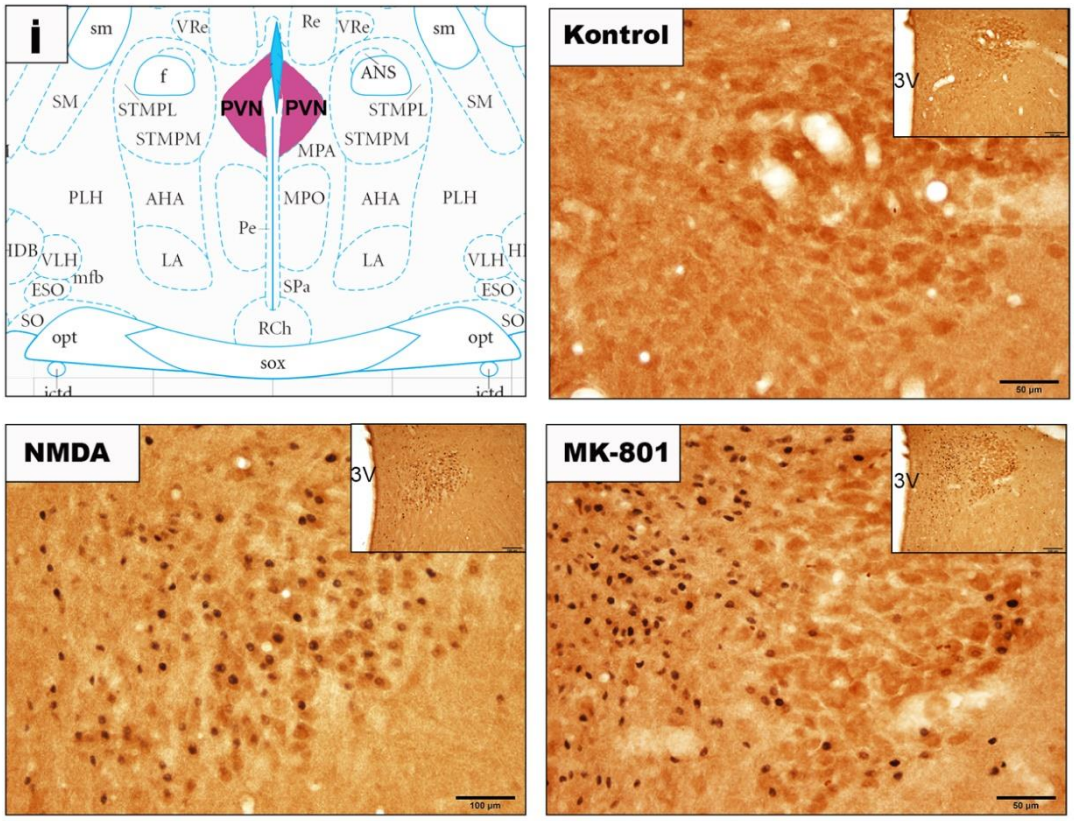
İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde NMDA enjeksiyonundan sonra PVN'de yerleşik RSPO3 nöron sayısında göre anlamlı olarak artış gözlendi ($p<0,001$). NMDA enjeksiyonundan önce özgün antagonist (MK-801) uygulamasının aktive olan RSPO3 nöron sayısında azalmaya yol açtığı belirlendi ($p<0,001$). Paraventriküler çekirdekte kontrol grubu ve özgün antagonist (MK-801) grubu arasında aktive olan nöron yüzdesi açısından karşılaştırıldığında antagonist grubunda aktive olan nöron sayısının kontrol grubunda fazla olduğu istatistiksel olarak gösterildi ($p=0,014$) (Şekil 43, Şekil 44).



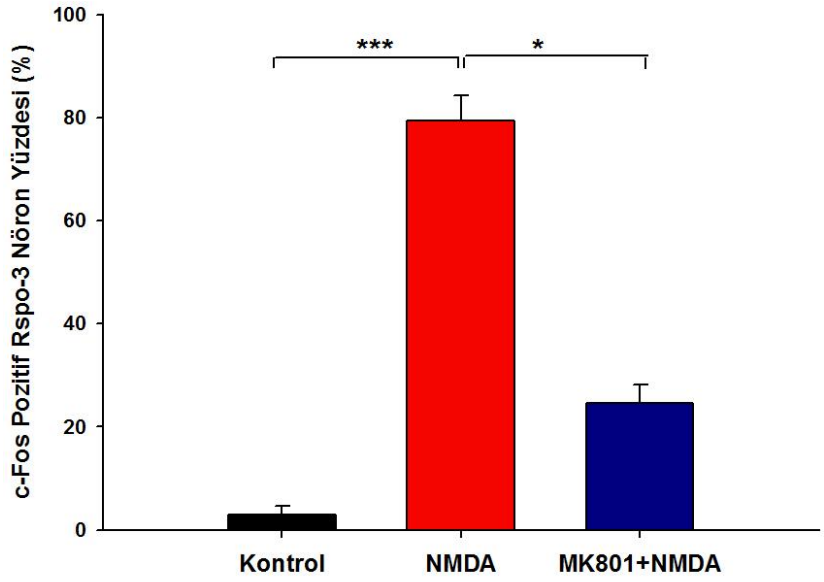
Şekil 41. NMDA ve MK-801 gruplarında ikili indirekt immünoperoksidaz işaretleme tekniği ile SON'deki RSPO3 nöronlarında c-Fos ekspresyonu. (i) Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre PVN'nin lokalizasyonu. 40X, 20X (küçük resimler ok: optik kiyazma



Şekil 42. NMDA ve MK-801 gruplarında SON'de yerleşik aktive olan RSPO3 nöron yüzdelerinin karşılaştırılması (***p<0,001).



Şekil 43. NMDA ve MK-801 gruplarında ikili indirekt immünoperoksidaz işaretleme tekniği ile PVN'deki RSPO3 nöronlarında c-Fos ekspresyonu. (**i**) Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre PVN'nin lokalizasyonu. 40X, 20X (küçük resimler). 3v: 3. ventrikül



Şekil 44. NMDA ve MK-801 gruplarında PVN'de yerleşik aktive olan RSPO3 nöron yüzdelerinin karşılaştırılması (***p<0,001).

4.4. RSPO3 Nöronlarının Besin ve/veya Glikoz Verilerek Uyarılması ve Bu Uyarılmada Glutamat Antagonistlerinin Etkinliğinin Araştırılması

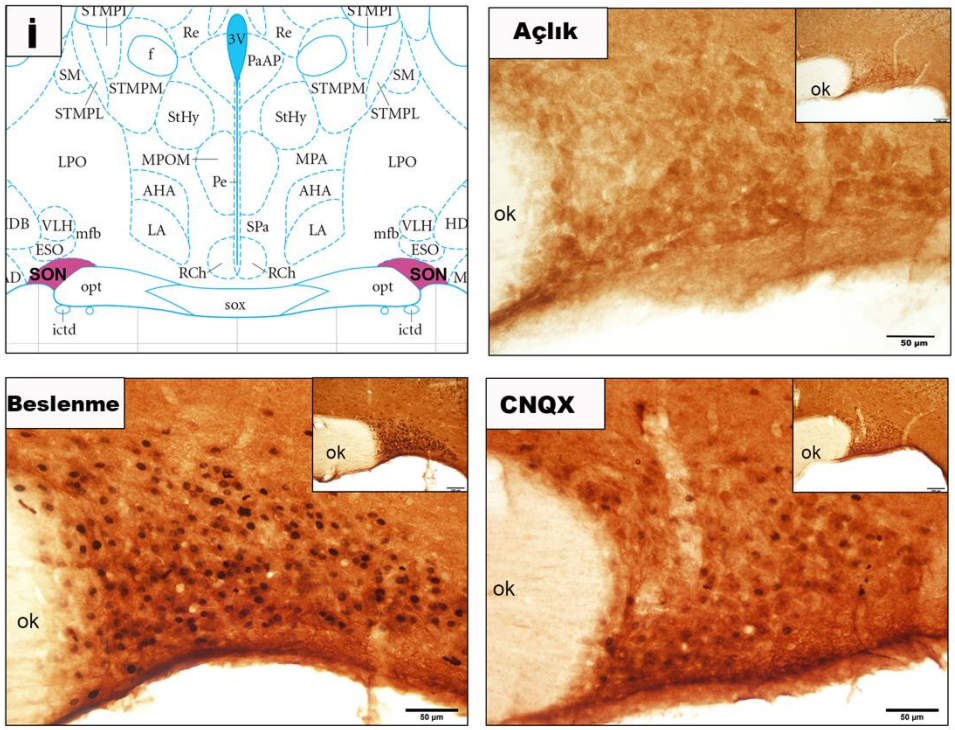
4.4.1. Supraoptik ve paraventriküler çekirdekte yerleşik RSPO3 nöronlarının aktivasyonunda beslenme ve CNQX'in etkisi

Beslenmenin ve beslenmeden önce CNQX uygulamasının supraoptik çekirdekte yerleşik RSPO3 nöronları üzerindeki etkisini incelemek amacıyla kesitler, RSPO3 ve c-Fos proteinleri için ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi ile boyandı (Şekil 45). Yapılan sayımlar sonucunda SON'de aktive olan RSPO3 nöronlarının yüzdesi açlık grubunda %1,53±1,08; beslenme grubunda %93,67±1,71 CNQX grubunda %9,24±5,89 olarak bulundu (Şekil 45, Şekil 46).

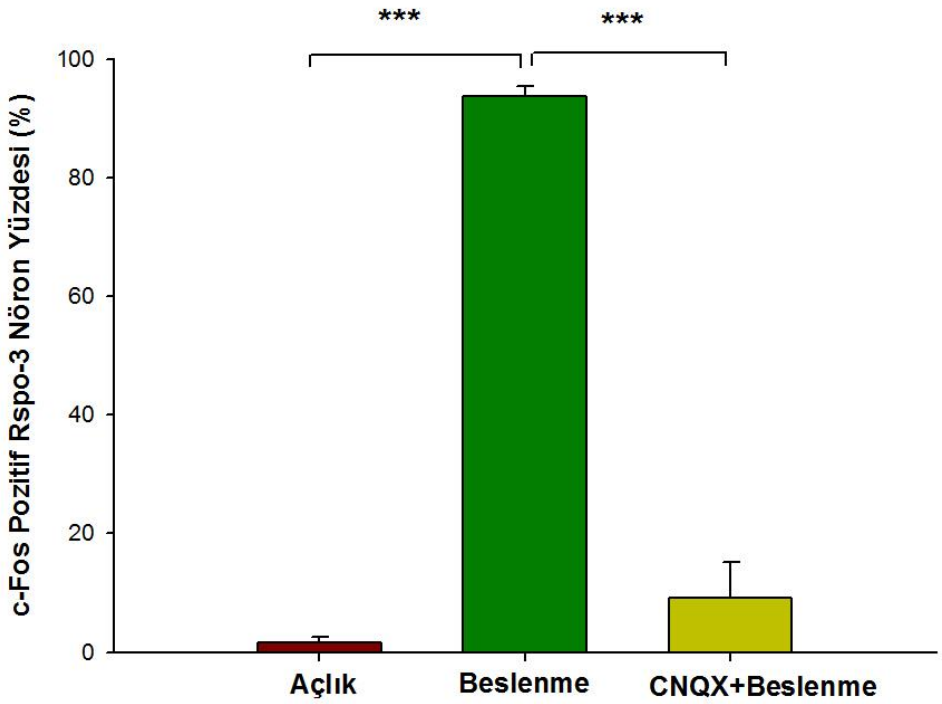
İstatistiksel analiz sonucunda açlık sonrası beslenme grubunda SON'de yerleşik RSPO3 nöron sayısında anlamlı olarak artış gözlendi ($p<0,001$). Beslenmeden önce CNQX uygulamasının aktive olan RSPO3 nöron sayısında azalmaya yol açtığı belirlendi. ($p<0,001$). Supraoptik çekirdekte açlık grubu ve CNQX grubu arasında aktive olan nöron yüzdesi açısından anlamlı fark olmadığı istatistiksel olarak gösterildi ($p=0,350$) (Şekil 46).

Paraventriküler çekirdekte beslenmenin ve beslenmeden önce CNQX uygulamasının RSPO3 nöronları üzerindeki etkisini incelemek amacıyla kesitler, RSPO3 ve c-Fos proteinleri için ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi ile boyandı (Şekil 47). Yapılan sayımlar sonucunda PVN'de aktive olan RSPO3 nöronlarının yüzdesi açlık grubunda %6,54±2,19; beslenme grubunda %75,72±4,18; CNQX grubunda %9,34±1,35 olarak bulundu (Şekil 47, Şekil 48).

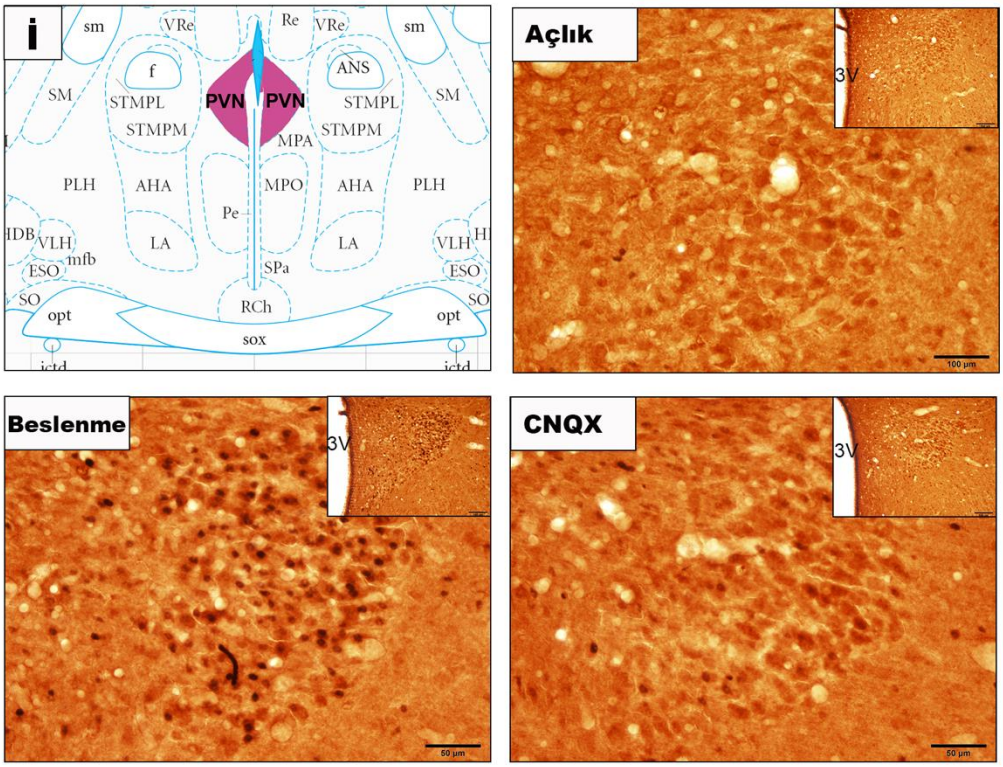
PVN' de açlık sonrası beslenme grubunda RSPO3 nöron sayısında anlamlı olarak artış gözlendi ($p<0,001$). Beslenmeden önce CNQX uygulamasının aktive olan RSPO3 nöron sayısında azalmaya yol açtığı belirlendi ($p<0,001$). PVN'de açlık grubu ve CNQX grubu arasında aktive olan nöron yüzdesi açısından anlamlı fark olmadığı istatistiksel olarak gösterildi ($p=0,772$) (Şekil 48).



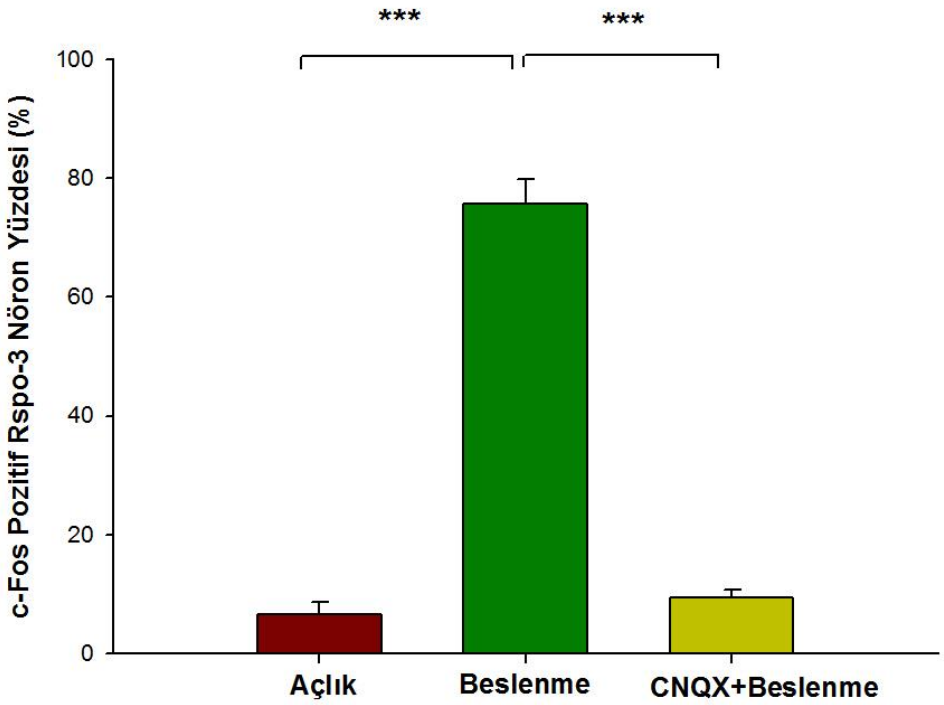
Şekil 45. Beslenme ve CNQX gruplarında ikili indirekt immünoperoksidaz işaretleme tekniği ile SON'deki RSPO3 nöronlarında c-Fos ekspresyonu. (i) Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre SON'nun lokalizasyonu. 40X, 20X (küçük resimler). ok: optik kiyazma.



Şekil 46. Beslenme ve CNQX gruplarında SON'de yerleşik aktive olan RSPO3 nöron yüzdelerinin karşılaştırılması (***p<0,001).



Şekil 47. Beslenme ve CNQX gruplarında ikili indirekt immünoperoksidaz işaretleme tekniği ile PVN'deki RSPO3 nöronlarında c-Fos ekspresyonu. (i) Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre PVN'nin lokalizasyonu. 40X, 20X (küçük resimler) 3v: 3. ventrikül



Şekil 48. Beslenme ve CNQX gruplarında PVN'de yerleşik aktive olan RSPO3 nöron yüzdelerinin karşılaştırılması (***p<0,001).

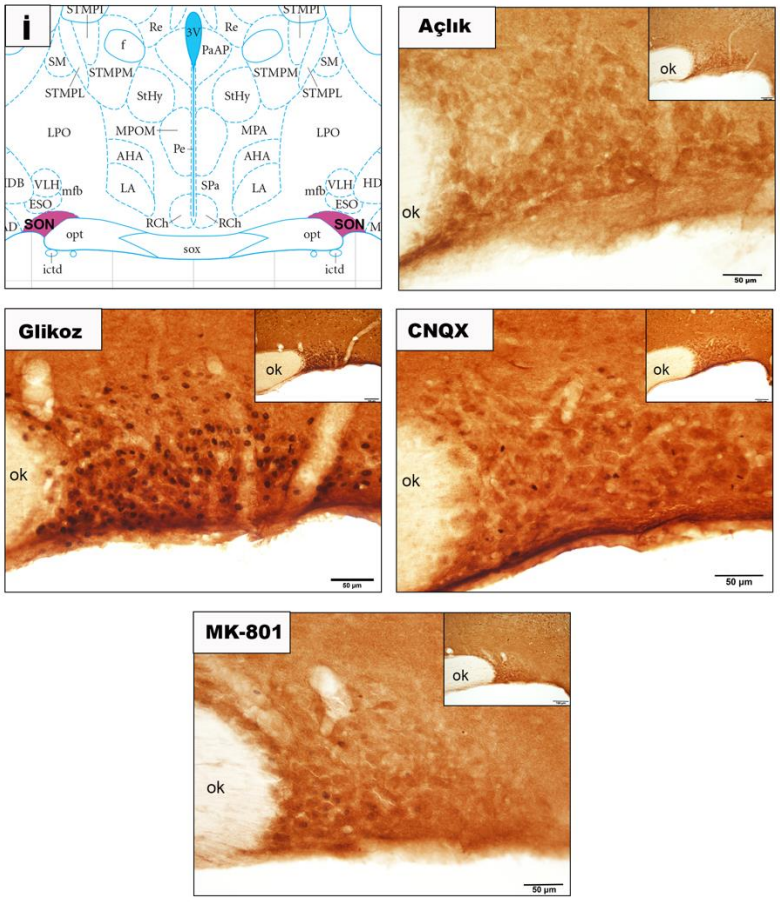
4.4.2. Supraoptik ve paraventriküler çekirdekte yerleşik RSPO3 nöronlarının aktivasyonunda glikoz enjeksiyonunun ve CNQX veya MK-801'in etkileri

Glikoz ve glikozdan önce glutamat reseptör antagonistleri olan CNQX ve MK-801 uygulamasının supraoptik çekirdekte yerleşik RSPO3 nöronları üzerindeki etkisini incelemek amacıyla kesitler, RSPO3 ve c-Fos proteinleri için ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi ile boyandı (Şekil 49). Yapılan sayımlar sonucunda SON'de aktive olan RSPO3 nöronlarının yüzdesi açlık grubunda %1,53±1,08; glikoz grubunda %83,12±6,30 CNQX grubunda %17,32±4,36 ve MK-801 grubunda 1,43±0,25 olarak bulundu (Şekil 49, Şekil 50).

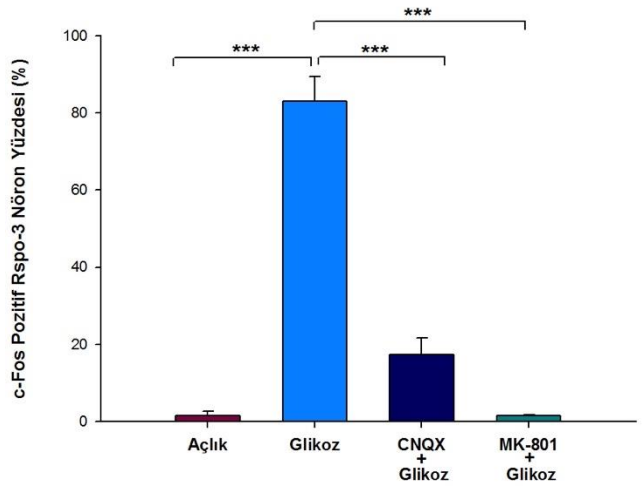
İstatistiksel analiz sonucunda açlık sonrası glikoz grubunda SON'de yerleşik RSPO3 nöron sayısında anlamlı olarak artış gözlendi ($p<0,001$). Glikoz enjeksiyonundan önce antagonist CNQX veya MK-801 uygulamasının aktive olan RSPO3 nöron sayısında azalmaya yol açtığı belirlendi. ($p<0,001$). Supraoptik çekirdekte açlık grubu ve glutamat reseptör anatgonistleri olan hem CNQX hem de MK-801 grubu arasında aktive olan nöron yüzdesi açısından anlamlı fark olmadığı istatistiksel olarak gösterildi (sırasıyla $p=0,078$; $p=0,76$) (Şekil 50).

Paraventriküler çekirdekte glikoz ve glikozdan önce glutamat reseptör antagonistleri olan CNQX ve MK-801 RSPO3 nöronları üzerindeki etkisini incelemek amacıyla kesitler, RSPO3 ve c-Fos proteinleri için ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi ile boyandı (Şekil 51). Yapılan sayımlar sonucunda PVN'de aktive olan RSPO3 nöronlarının yüzdesi açlık grubunda %6,54±2,19; glikoz grubunda %73,38±2,85 CNQX grubunda %10,02±2,60 ve MK-801 grubunda %11,84±1,41 olarak bulundu (Şekil 51, Şekil 52).

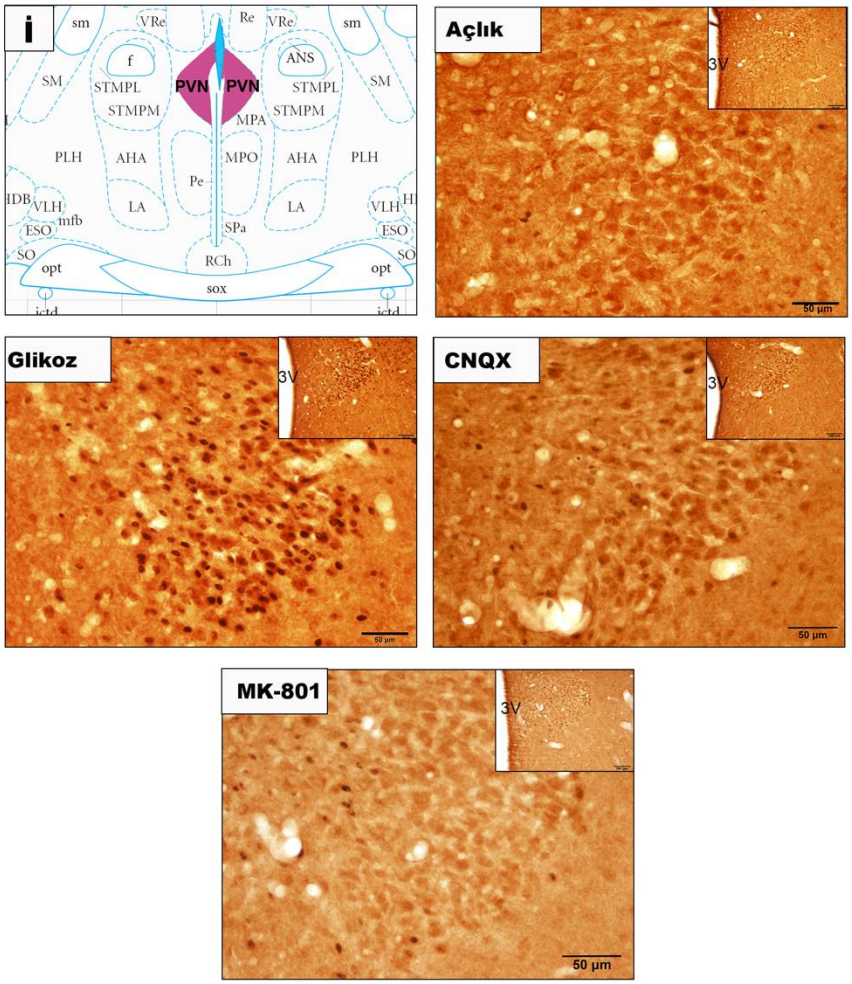
İstatistiksel analiz sonucunda açlık sonrası glikoz grubunda PVN'de yerleşik RSPO3 nöron sayısında anlamlı olarak artış gözlendi ($p<0,001$). Glikoz enjeksiyonundan önce antagonist CNQX veya MK-801 uygulamasının aktive olan RSPO3 nöron sayısında azalmaya yol açtığı belirlendi ($p<0,001$). Paraventriküler çekirdekte açlık grubu ve glutamat reseptör anatgonistleri olan hem CNQX hem de MK-801 grubu arasında aktive olan nöron yüzdesi açısından anlamlı fark olmadığı istatistiksel olarak bulundu (sırasıyla $p=724$; $p=0,426$) (Şekil 52).



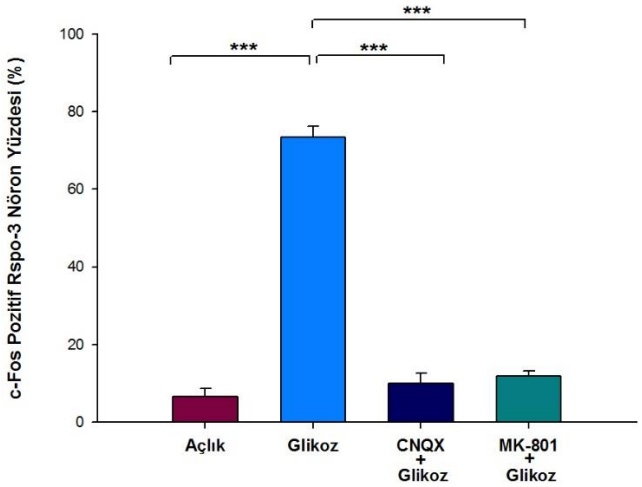
Şekil 49. Glikoz, CNQX ve MK-801 gruplarında ikili indirekt immünoperoksidaz işaretleme tekniği ile SON'deki RSPO3 nöronlarında c-Fos ekspresyonu. (i) Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre SON'nun lokalizasyonu. 40X, 20X (küçük resimler). ok: optik kiyazma.



Şekil 50. Glikoz, CNQX ve MK-801 gruplarında SON'de yerleşik aktive olan RSPO3 nöron yüzdelerinin karşılaştırılması (***p<0,001).



Şekil 51. Glikoz, CNQX ve MK-801 gruplarında ikili indirekt immünoperoksidaz işaretleme tekniği ile PVN'deki RSPO3 nöronlarında c-Fos ekspresyonu. (**i**) Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre PVN'nin lokalizasyonu. 40X, 20X (küçük resimler). 3v:3. Ventrikül



Şekil 52. Glikoz, CNQX ve MK-801 gruplarında PVN'de yerleşik aktive olan RSPO3 nöron yüzdelerinin karşılaştırılması (***p<0,001).

Yukarıda sonuçları verilen çalışmaların istatistiki değerlendirmesinde kullanılan ve sayılan tüm nöronlara ait işlenmemiş verileri içeren bilgiler aşağıda Tablo 6-13 arasında verilmiştir.

Tablo 6. Deneklerin supraoptik çekirdeklerinde lokalize olan RSPO1 nöronlarındaki c-Fos ekspresyonu

Glutamat Agonist Grupları		RSPO1 Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos'u Eksprese Eden RSPO1 Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos'u Eksprese Eden RSPO1 Nöronlarının Ortalama Yüzdeleri
KAİNİK ASİT	Kontrol	1230.67±334.13	12.04±0.33	1±0.04
	Enjeksiyon	933.33±97.50	645.67±119.17	68.12±5.15
	Antagonist (CNQX)	1163.33±29.73	158.00±42.15	13.50±3.54
AMPA	Kontrol	990.33±91.76	18.33±17.84	1,76±1,7
	Enjeksiyon	1264.33±217.70	1042.33±267.49	79.61±9.23
	Antagonist (CNQX)	1019.33±117.80	259.67±108.24	27.42±11.46
NMDA	Kontrol	1068.00±322.23	11.02±0.33	0.9±0.001
	Enjeksiyon	1354.00±176.77	1035.00±107.79	76.99±2.19
	Antagonist (MK-801)	1009.33±123.16	55.00±22.50	5.08±1.52

Tablo 7. Deneklerin paraventriküler çekirdeklerinde lokalize olan RSPO1 nöronlarındaki c-Fos ekspresyonu

Glutamat Agonist Grupları		RSPO1 Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos'u Eksprese Eden RSPO1 Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos'u Eksprese Eden RSPO1 Nöronlarının Ortalama Yüzdeleri
KAİNİK ASİT	Kontrol	1174.33±210.30	5.33±2.73	1,2±0.18
	Enjeksiyon	1516.67±343.53	1273.00±347.94	81.93±4.71
	Antagonist (CNQX)	1084.00±441.65	280.33±97.28	28.25±7.39
AMPA	Kontrol	1615.67±35.10	4.33±2.96	0.8±0.18
	Enjeksiyon	1114.33±281.31	786.00±227.01	69.97±7.59
	Antagonist (CNQX)	1912.67±688.19	592.00±266.24	29.27±4.76
NMDA	Kontrol	1198.33±189.29	23.33±11.29	2.32±1.42
	Enjeksiyon	1488.67±320.30	1145.67±247.68	76.97±0.48
	Antagonist (MK-801)	1036.33±82.50	199.67±86.64	20.74±9.34

Tablo 8. Deneklerin supraoptik çekirdeklerinde lokalize olan RSPO3 nöronlarındaki c-Fos ekspresyonu

Glutamat Agonist Grupları		RSPO3 Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos'u Eksprese Eden RSPO3 Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos u Eksprese Eden RSPO3 Nöronlarının Ortalama Yüzdeleri
KAİNİK ASİT	Kontrol	875.33±83.11	8.00±6.51	0.83±0.64
	Enjeksiyon	916.667±257.184	782.000±281.624	81.430±7.070
	Antagonist (CNQX)	507.67±111.05	52.67±19.34	11.32±3.87
AMPA	Kontrol	946.00±117.53	0.67±0.33	0.063±0.032
	Enjeksiyon	1035.333±104.394	892.667±129.749	85.874±6.188
	Antagonist (CNQX)	894.00±54.00	347.33±159.91	37.07±14.76
NMDA	Kontrol	668.33±87.67	21.33±14.38	0,56±0.41
	Enjeksiyon	603.33±46.94	460.00±74.75	75.32±6.42
	Antagonist (MK-801)	856.00±43.14	119.67±11.78	13.92±0.72

Tablo 9. Deneklerin paraventriküler çekirdeklerinde lokalize olan RSPO3 nöronlarındaki c-Fos ekspresyonu

Glutamat Agonist Grupları		RSPO3 Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos'u Eksprese Eden RSPO3 Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos'u Eksprese Eden RSPO3 Nöronlarının Ortalama Yüzdeleri
KAİNİK ASİT	Kontrol	540.00±55.77	4.67±0.33	1.26±0.034
	Enjeksiyon	390.33±75.50	318.33±60.67	81.67±2.37
	Antagonist (CNQX)	818.00±34.00	364.00±39.11	44.54±4.81
AMPA	Kontrol	459.33±35.69	8.33±7.84	2.15±2.02
	Enjeksiyon	839.67±190.86	696.33±182.03	81.04±5.11
	Antagonist (CNQX)	844.50±4.50	345.00±51.00	40.82±5.82
NMDA	Kontrol	471.33±128.14	10.00±3.51	2.96±1.74
	Enjeksiyon	848.67±169.08	662.00±113.58	79.41±4.96
	Antagonist (MK-801)	579.00±2.52	142.67±21.11	24.64±3.64

Tablo 10. Deneklerin supraoptik çekirdeklerinde lokalize olan RSPO1 nöronlarındaki c-Fos ekspresyonu

Beslenme /Glikoz Grupları		RSPO1 Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos'u Eksprese Eden RSPO1 Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos'u Eksprese Eden RSPO1 Nöronlarının Ortalama Yüzdeleri
BESLENME	Açlık	740.33±64.86	37.00±18.08	4.62±2.23
	Beslenme	1536.67±352.48	1462.67±377.61	93.71±3.28
	Antagonist (CNQX)	887.33±176.52	299.33±210.76	28.03±16.04
GLİKOZ	Glikoz	968.67±218.44	805.67±247.10	79.64±9.57
	Antagonist (CNQX)	1093.00±149.87	121.67±47.96	11.17±4.86
	Antagonist (MK-801)	853.67±194.69	13.67±6.69	1.75±0.73

Tablo 11. Deneklerin paraventriküler çekirdeklerinde lokalize olan RSPO1 nöronlarındaki c-Fos ekspresyonu

Beslenme /Glikoz Grupları		RSPO1 Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos'u Eksprese Eden RSPO1 Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos'u Eksprese Eden RSPO1 Nöronlarının Ortalama Yüzdeleri
BESLENME	Açlık	985.00±11.06	156.33±45.21	15.77±4.47
	Beslenme	600.33±104.81	501.67±91.08	84.22±6.68
	Antagonist (CNQX)	1016.33±314.55	138.67±102.67	10.63±5.43
GLİKOZ	Glikoz	739.00±233.33	615.00±234.97	80.06±5.03
	Antagonist (CNQX)	661.67±31.33	94.00±54.99	13.53±7.46
	Antagonist (MK-801)	1335.33±47.75	180.00±14.00	13.58±1.51

Tablo 12. Deneklerin supraoptik çekirdeklerinde lokalize olan RSPO3 nöronlarındaki c-Fos ekspresyonu

Beslenme /Glikoz Grupları		RSPO3 Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos'u Eksprese Eden RSPO3 Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos'u Eksprese Eden RSPO3 Nöronlarının Ortalama Yüzdeleri
BESLENME	Açlık	514.00±153.69	5.00±2.08	1.54±1.09
	Beslenme	791.33±82.57	738.33±65.20	93.62±1.69
	Antagonist (CNQX)	678.67±25.30	65.67±43.50	9.24±5.89
GLİKOZ	Glikoz	673.00±31.01	556.67±29.42	83.13±6.30
	Antagonist (CNQX)	630.67±110.18	118.67±42.01	17.33±4.36
	Antagonist (MK-801)	680.00±50.74	10.00±2.52	1.44±0.25

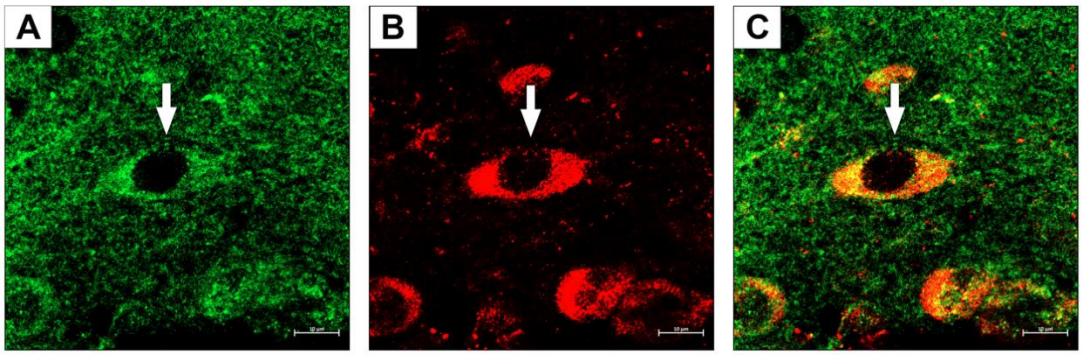
Tablo 13. Deneklerin paraventriküler çekirdeklerinde lokalize olan RSPO3 nöronlarındaki c-Fos ekspresyonu

Beslenme /Glikoz Grupları		RSPO3 Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos'u Eksprese Eden RSPO3 Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos'u Eksprese Eden RSPO3 Nöronlarının Ortalama Yüzdeleri
BESLENME	Açlık	600.67±28.87	38.33±11.14	6.55±2.19
	Beslenme	436.33±85.74	325.33±49.88	75.73±4.18
	Antagonist (CNQX)	726.67±25.96	68.67±11.92	9.35±1.35
GLİKOZ	Glikoz	598.67±80.86	435.00±43.82	73.39±2.86
	Antagonist (CNQX)	625.67±72.67	59.00±11.06	10.03±2.61
	Antagonist (MK-801)	546.00±40.61	64.33±7.45	11.85±1.41

4.5. RSPO1 Nöronlarında Glutamat Altbirim Reseptörleri Ekspresyonunun Araştırılması

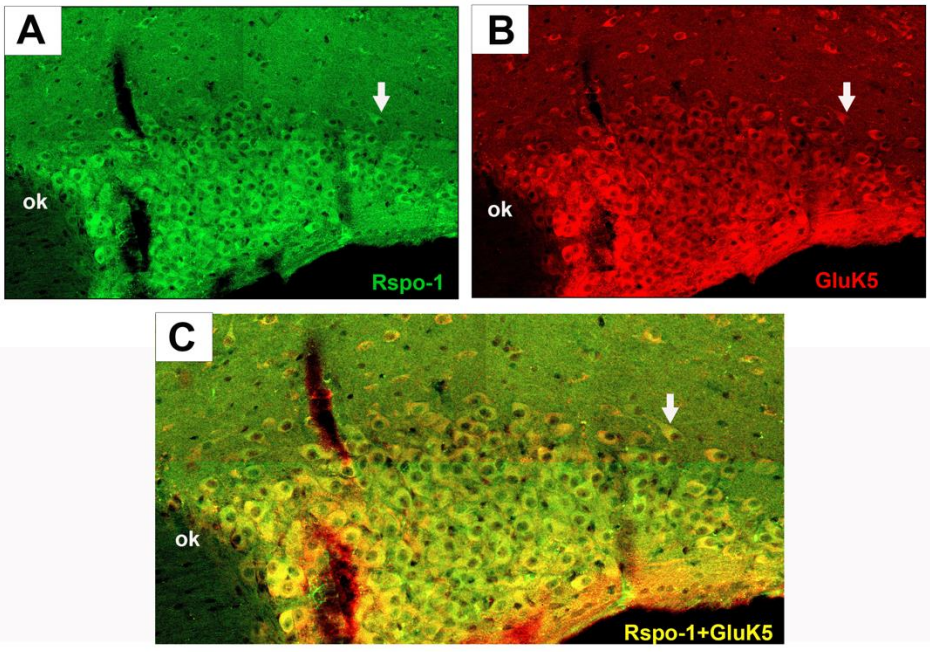
4.5.1. RSPO1 nöronlarında kainat altbirim reseptörü GluK5 ekspresyonunun araştırılması

İkili immünofloresan işaretleme tekniği ile RSPO1 nöronlarının kainat altbirim reseptörü, GluK5 reseptör proteinini eksprese ettiği gösterildi (Şekil 51).

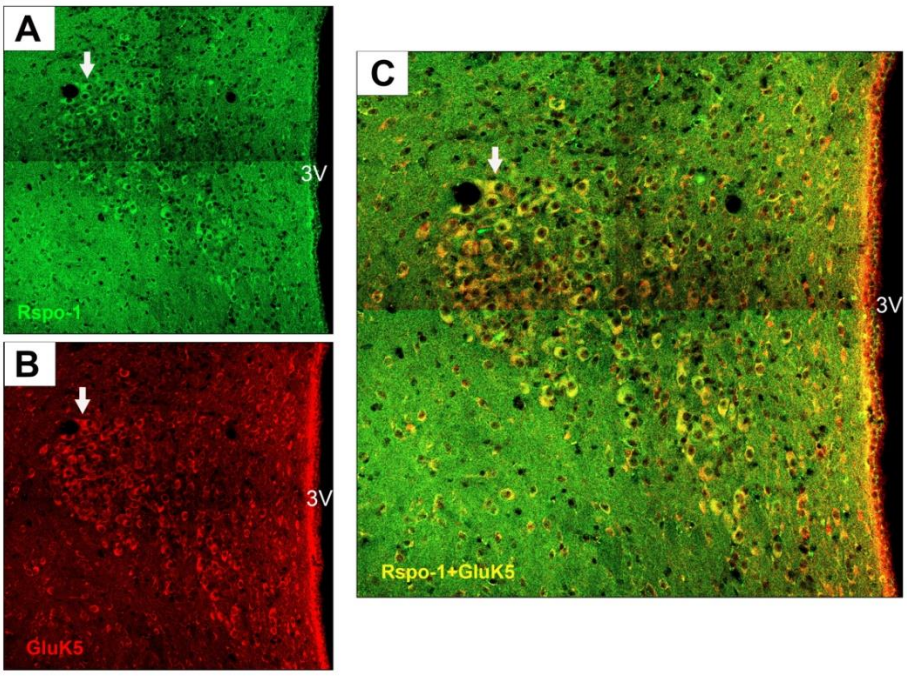


Şekil 51. RSPO1 nöronlarında GluK5 ekspresyonu 63X. (A) FITC ile işaretli ile RSPO1 nöronları yeşil, (B) Texas red ile işaretli Gluk5 eksprese eden nöronlar ise kımızı renkte görülmektedir. (C) Gluk5 reseptör proteinini eksprese eden RSPO1 nöronları sarı renkte izlenmektedir.

Supraoptik çekirdek ve paraventriküler çekirdekte kainat altbirim reseptörü GluK5 antikoru ile yapılan boyamalar, RSPO1 nöronlarında bu proteinin eksprese edildiğini gösterdi (Şekil 52, Şekil 53).



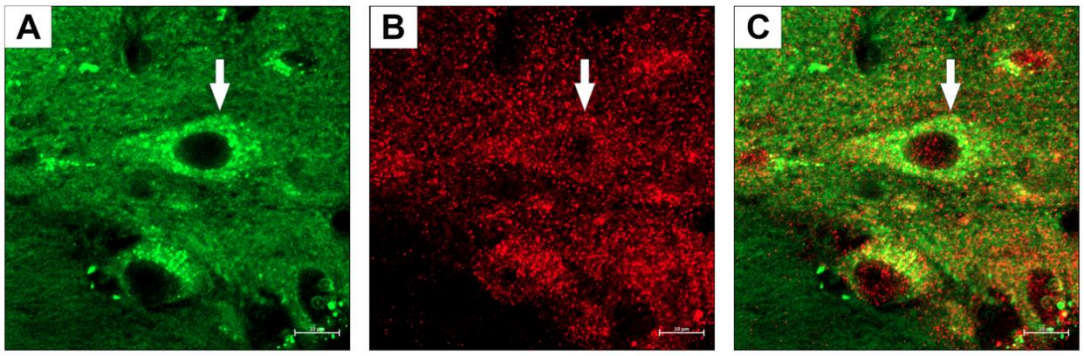
Şekil 52. SON'de yerleşik RSPO1 nöronlarında GluK5 ekspresyonu 20X. (A) FITC ile işaretli ile RSPO1 nöronları yeşil, (B) Texas red ile işaretli Gluk5 eksprese eden nöronlar ise kımızı renkte görülmektedir. (C) Gluk5 reseptör proteinini eksprese eden RSPO1 nöronları sarı renkte izlenmektedir. ok: optik kiyazma



Şekil 53. PVN'de yerleşik RSPO1 nöronlarında GluK5 ekspresyonu 20X. (A) FITC ile işaretli ile RSPO1 nöronları yeşil, (B) Texas red ile işaretli Gluk5 eksprese eden nöronlar ise kımızı renkte görülmektedir. (C) Gluk5 reseptör proteinini eksprese eden RSPO1 nöronları sarı renkte izlenmektedir. 3V: 3. ventrikül

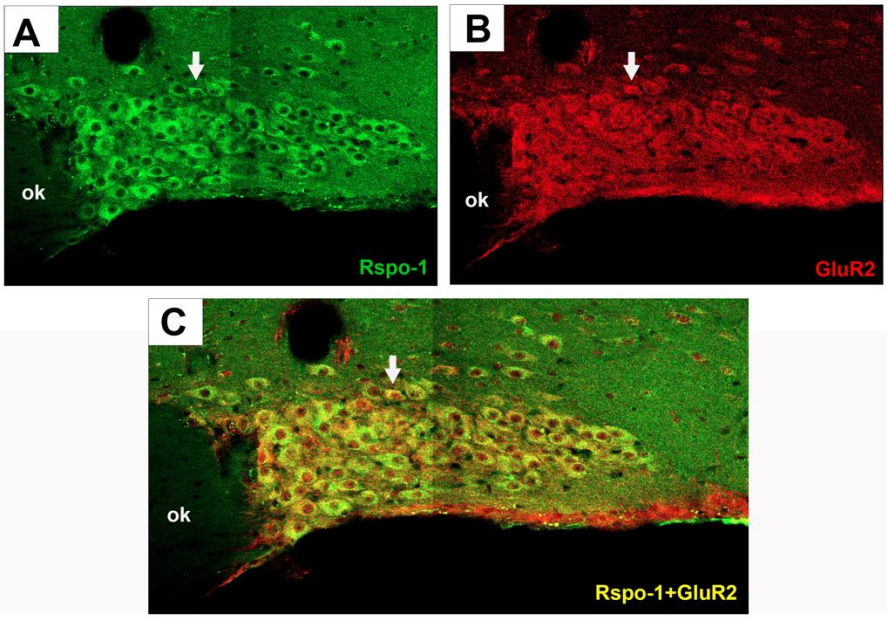
4.5.2. RSPO1 nöronlarında AMPA altbirim reseptörü GluR2 ekspresyonunun araştırılması

İkili immünofloresan işaretleme tekniği ile RSPO1 nöronlarının AMPA altbirim reseptörü, GluR2 reseptör proteinini eksprese ettiği gösterildi (Şekil 54).

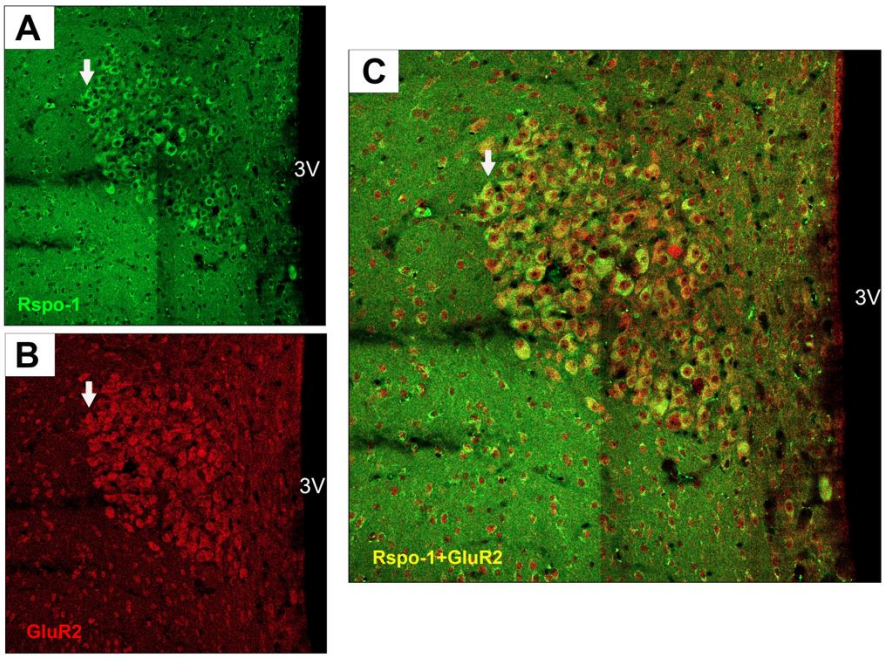


Şekil 54. RSPO1 nöronlarında GluR2 ekspresyonu 63X. (A) FITC ile işaretli ile RSPO1 nöronları yeşil, (B) Cy5 ile işaretli GluR2 eksprese eden nöronlar ise kımızı renkte görülmektedir. (C) GluR2 reseptör proteinini eksprese eden RSPO1 nöronları sarı renkte izlenmektedir.

Supraoptik çekirdek ve paraventriküler çekirdekte AMPA altbirim reseptörü GluR2 antikoru ile yapılan boyamalar, RSPO1 nöronlarında bu proteinin eksprese edildiğini gösterdi (Şekil 55, Şekil 56).



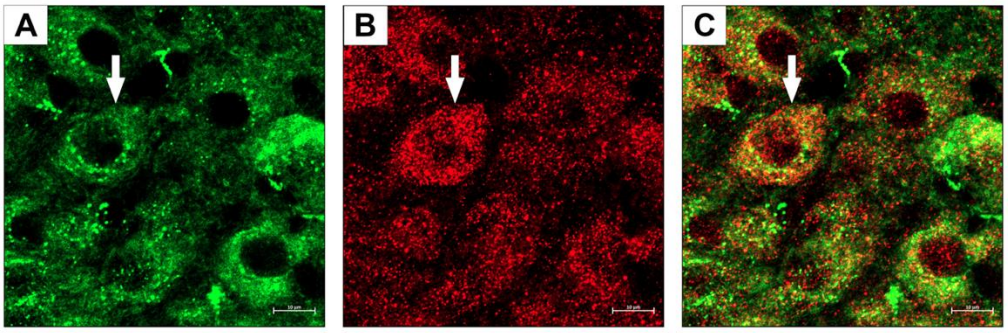
Şekil 55. SON'de yerleşik RSPO1 nöronlarında GluR2 ekspresyonu 20X. (A) FITC ile işaretli ile RSPO1 nöronları yeşil, (B) Cy5 ile işaretli GluR2 eksprese eden nöronlar ise kımızı renkte görülmektedir. (C) GluR2 reseptör proteinini eksprese eden RSPO1 nöronları sarı renkte izlenmektedir. ok: optik kiyazma



Şekil 56. PVN'de yerleşik RSPO1 nöronlarında GluR2 ekspresyonu 20X. (A) FITC ile işaretli ile RSPO1 nöronları yeşil, (B) Cy5 ile işaretli GluR2 eksprese eden nöronlar ise kımızı renkte görülmektedir. (C) GluR2 reseptör proteinini eksprese eden RSPO1 nöronları sarı renkte izlenmektedir. 3V: 3. ventrikül

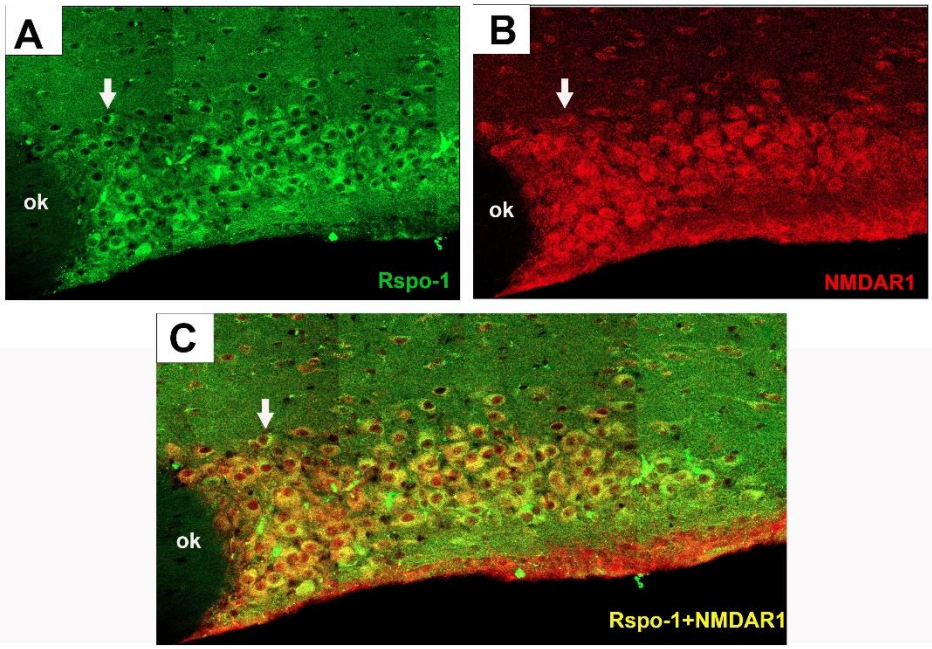
4.5.2. RSPO1 nöronlarında NMDA altbirim reseptörü NMDAR1 ekspresyonunun araştırılması

İkili immünofloresan işaretleme tekniği ile RSPO1 nöronlarının NMDA altbirim reseptörü, NMDAR1 reseptör proteinini eksprese ettiği gösterildi (Şekil 57).

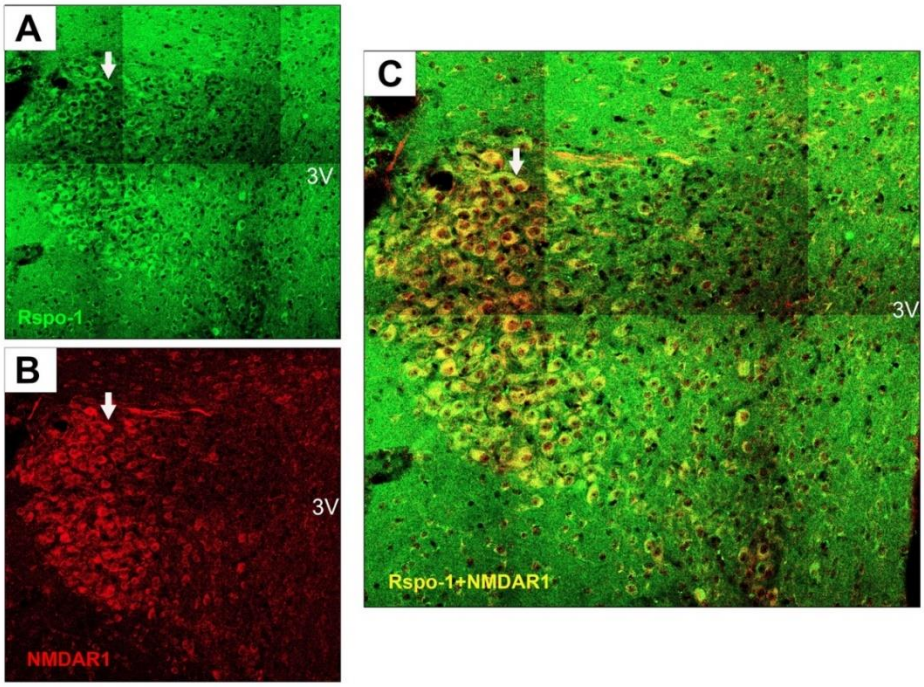


Şekil 57. RSPO1 nöronlarında NMDAR1 ekspresyonu 63X. (A) FITC ile işaretli ile RSPO1 nöronları yeşil, (B) Cy5 ile işaretli NMDAR1 eksprese eden nöronlar ise kımızı renkte görülmektedir. (C) NMDAR1 reseptör proteinini eksprese eden RSPO1 nöronları sarı renkte izlenmektedir.

Supraoptik çekirdek ve paraventriküler çekirdekte NMDA altbirim reseptörü NMDAR1 antikoru ile yapılan boyamalar, RSPO1 nöronlarında bu proteinin eksprese edildiğini gösterdi (Şekil 58, Şekil 59).



Şekil 58. SON'de yerleşik RSPO1 nöronlarında NMDAR1ekspresyonu 20X. (A) FITC ile işaretli ile RSPO1 nöronları yeşil, (B) Cy5 ile işaretli NMDAR1 eksprese eden nöronlar ise kımızı renkte görülmektedir. (C) NMDAR1 reseptör proteinini eksprese eden RSPO1 nöronları sarı renkte izlenmektedir. ok: optik kiyazma

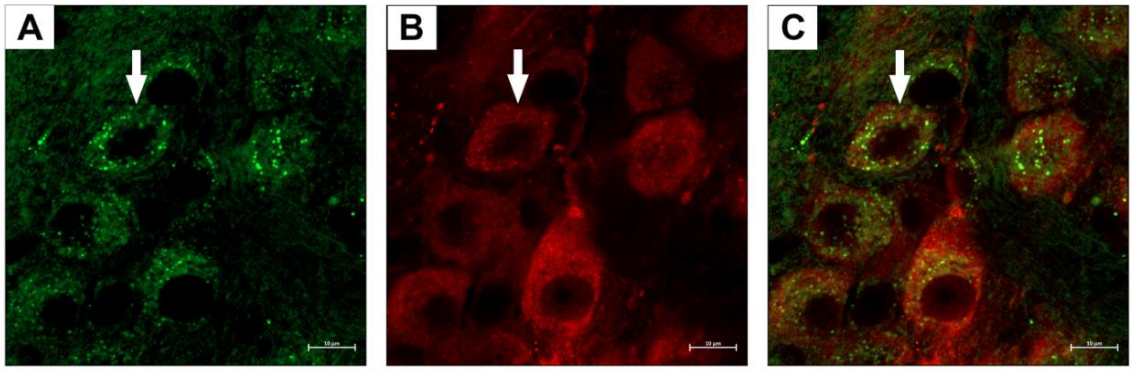


Şekil 59. PVN'de yerleşik RSPO1 nöronlarında NMDAR1 ekspresyonu 20X. (A) FITC ile işaretli ile RSPO1 nöronları yeşil, (B) Cy5 ile işaretli NMDAR1 eksprese eden nöronlar ise kımızı renkte görülmektedir. (C) NMDAR1 reseptör proteinini eksprese eden RSPO1 nöronları sarı renkte izlenmektedir. 3V: 3. ventrikül

4.6. RSPO3 Nöronlarında Glutamat Altbirim Reseptörleri Ekspresyonunun Araştırılması

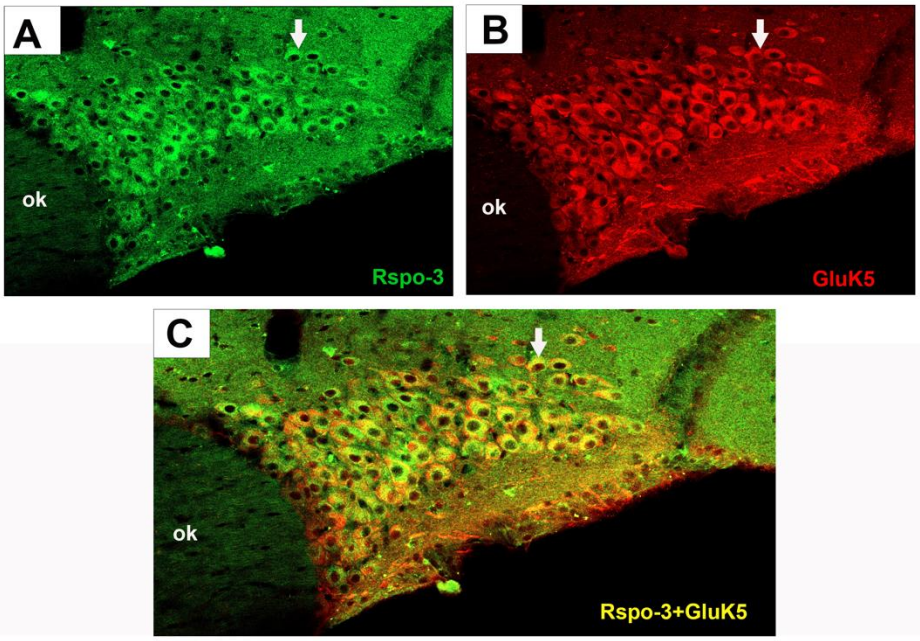
4.6.1. RSPO3 nöronlarında kainat altbirim reseptörü GluK5 ekspresyonunun araştırılması

İkili immünofloresan işaretleme tekniği ile RSPO3 nöronlarının kainat altbirim reseptörü, GluK5 reseptör proteinini eksprese ettiği gösterildi (Şekil 60).

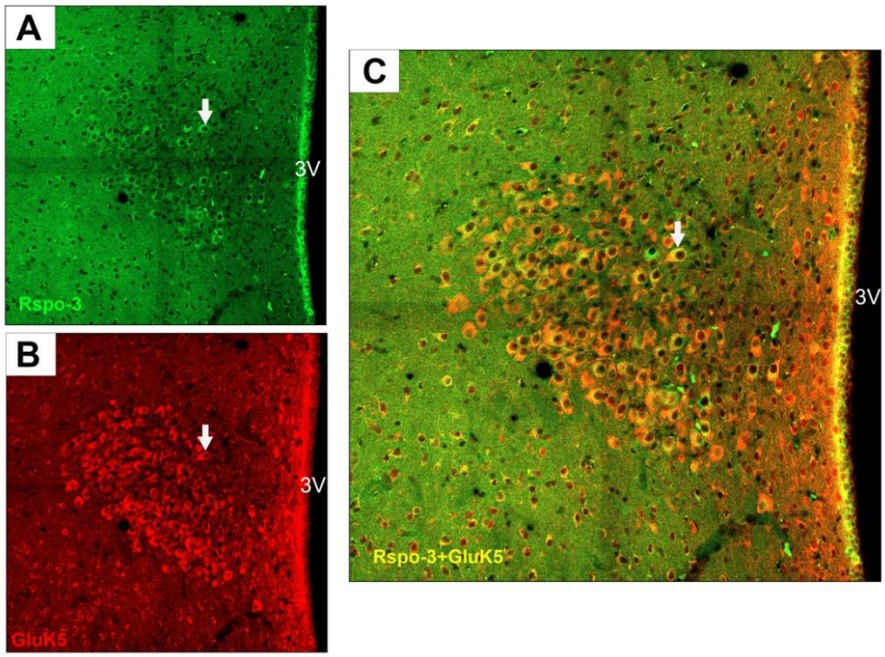


Şekil 60. RSPO3 nöronlarında GluK5 ekspresyonu 63X. (A) FITC ile işaretli ile RSPO3 nöronları yeşil, (B) Texas red ile işaretli Gluk5 eksprese eden nöronlar ise kımızı renkte görülmektedir. (C) Gluk5 reseptör proteinini eksprese eden RSPO3 nöronları sarı renkte izlenmektedir.

Supraoptik çekirdek ve paraventriküler çekirdekte kainat altbirim reseptörü GluK5 antikoru ile yapılan boyamalar, RSPO3 nöronlarında bu proteinin eksprese edildiğini gösterdi (Şekil 61, Şekil 62).



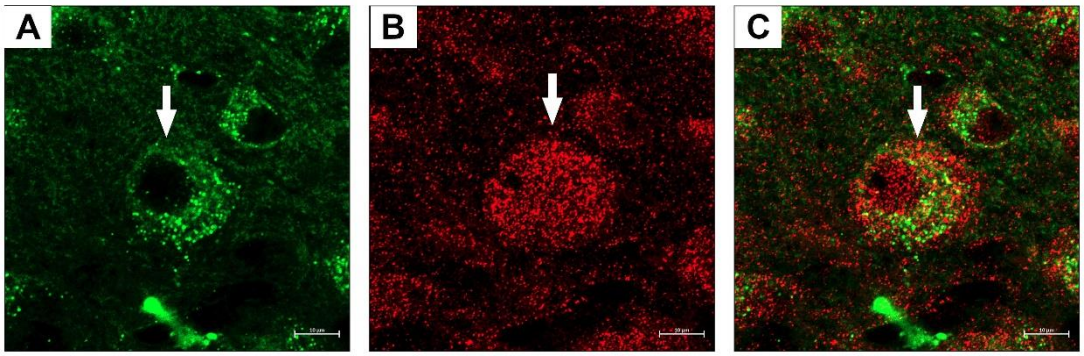
Şekil 61. SON'de yerleşik RSPO3 nöronlarında GluK5 ekspresyonu 20X. (A) FITC ile işaretli ile RSPO3 nöronları yeşil, (B) Texas red ile işaretli Gluk5 eksprese eden nöronlar ise kımızı renkte görülmektedir. (C) Gluk5 reseptör proteinini eksprese eden RSPO3 nöronları sarı renkte izlenmektedir. ok: optik kiyazma



Şekil 62. PVN'de yerleşik RSPO3 nöronlarında GluK5 ekspresyonu 20X. (A) FITC ile işaretli ile RSPO3 nöronları yeşil, (B) Texas red ile işaretli Gluk5 eksprese eden nöronlar ise kımızı renkte görülmektedir. (C) Gluk5 reseptör proteinini eksprese eden RSPO3 nöronları sarı renkte izlenmektedir. 3V: 3. ventrikül

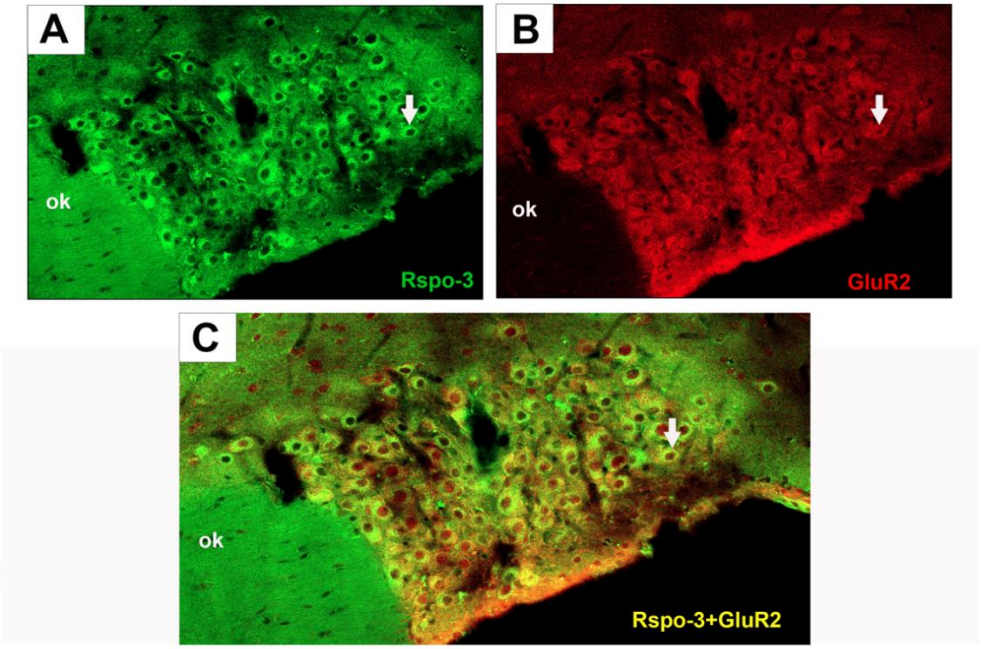
4.6.2. RSPO3 nöronlarında AMPA altbirim reseptörü GluR2 ekspresyonunun araştırılması

İkili immünofloresan işaretleme tekniği ile RSPO3 nöronlarının AMPA altbirim reseptörü GluR2 reseptör proteinini eksprese ettiği gösterildi (Şekil 62).

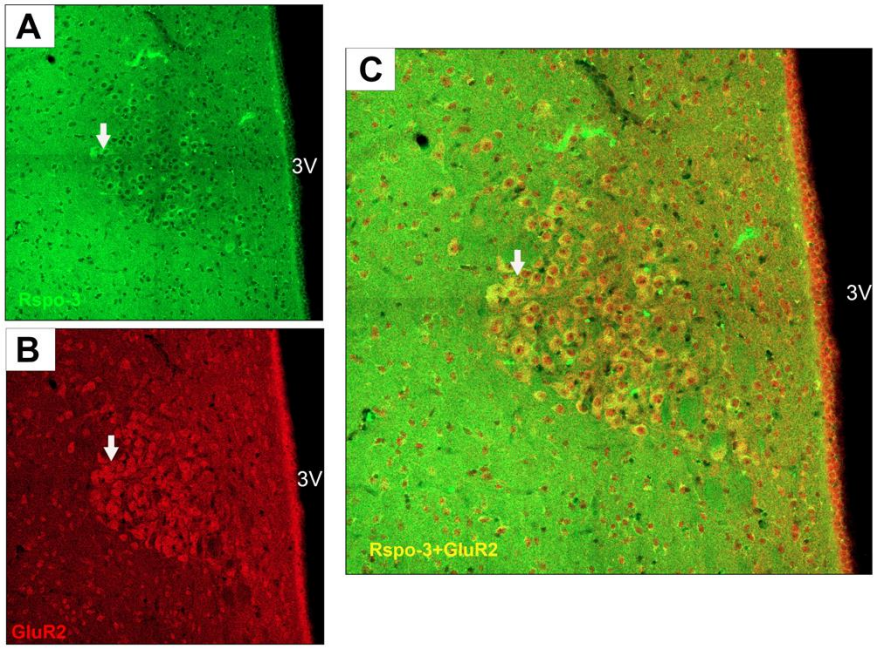


Şekil 62. RSPO3 nöronlarında GluR2 ekspresyonu 63X. (A) FITC ile işaretli ile RSPO3 nöronları yeşil, (B) Cy5 ile işaretli GluR2 eksprese eden nöronlar ise kımızı renkte görülmektedir. (C) GluR2 reseptör proteinini eksprese eden RSPO3 nöronları sarı renkte izlenmektedir.

Supraoptik çekirdek ve paraventriküler çekirdekte AMPA altbirim reseptörü GluR2 antikoru ile yapılan boyamalar, RSPO3 nöronlarında bu proteinin eksprese edildiğini gösterdi (Şekil 63, Şekil 64).



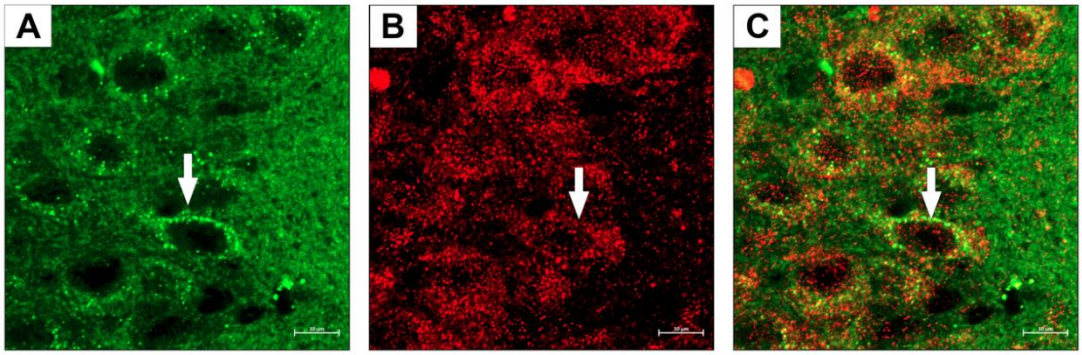
Şekil 63. SON'de yerleşik RSPO3 nöronlarında GluR2 ekspresyonu 20X. (A) FITC ile işaretli ile RSPO3 nöronları yeşil, (B) Cy5 ile işaretli GluR2 eksprese eden nöronlar ise kımızı renkte görülmektedir. (C) GluR2 reseptör proteinini eksprese eden RSPO3 nöronları sarı renkte izlenmektedir. ok: optik kiyazma



Şekil 64. PVN'de yerleşik RSPO3 nöronlarında GluR2 ekspresyonu 20X. (A) FITC ile işaretli ile RSPO3 nöronları yeşil, (B) Cy5 ile işaretli GluR2 eksprese eden nöronlar ise kımızı renkte görülmektedir. (C) GluR2 reseptör proteinini eksprese eden RSPO3 nöronları sarı renkte izlenmektedir. 3V: 3. ventrikül

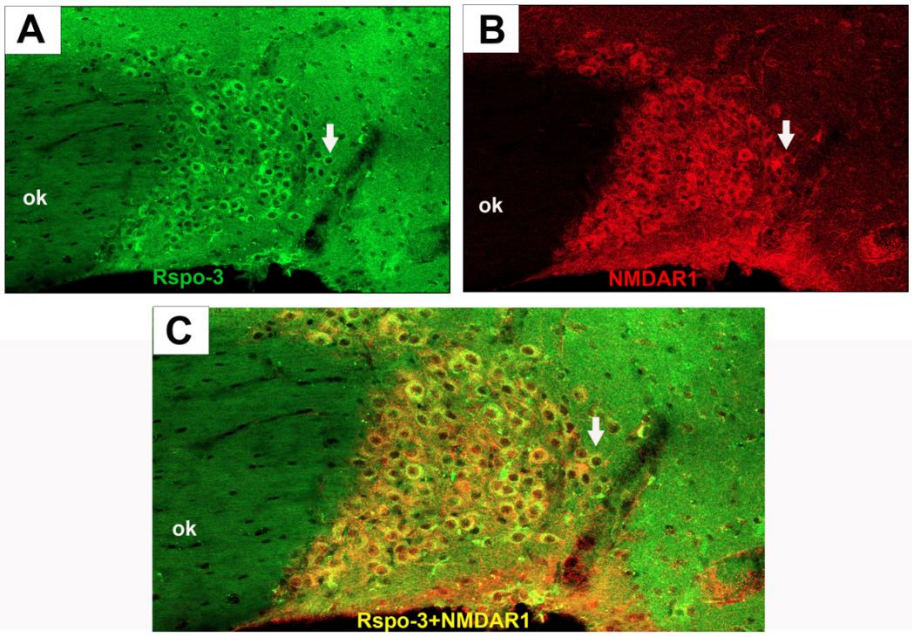
4.6.3. RSPO3 nöronlarında NMDA altbirim reseptörü NMDAR1 ekspresyonunun araştırılması

İkili immünofloresan işaretleme tekniği ile RSPO3 nöronlarının NMDA altbirim reseptörü NMDAR1 reseptör proteinini eksprese ettiği gösterildi (Şekil 65).

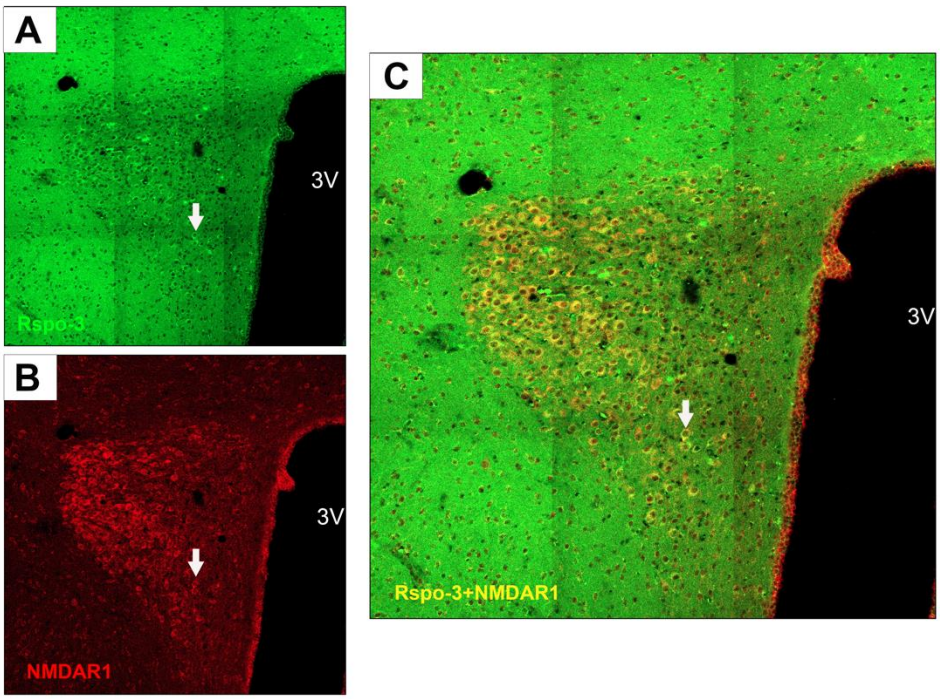


Şekil 65. RSPO3 nöronlarında NMDAR1 ekspresyonu 63X. (A) FITC ile işaretli ile RSPO3 nöronları yeşil, (B) Cy5 ile işaretli NMDAR1 eksprese eden nöronlar ise kımızı renkte görülmektedir. (C) NMDAR1 reseptör proteinini eksprese eden RSPO3 nöronları sarı renkte izlenmektedir.

Supraoptik çekirdek ve paraventriküler çekirdekte NMDA altbirim reseptörü NMDAR1 antikoru ile yapılan boyamalar, RSPO3 nöronlarında bu proteinin eksprese edildiğini gösterdi (Şekil 66, Şekil 67).



Şekil 66. SON'de yerleşik RSPO3 nöronlarında NMDAR1ekspresyonu 20X. (A) FITC ile işaretli ile RSPO3 nöronları yeşil, (B) Cy5 ile işaretli NMDAR1 eksprese eden nöronlar ise kımızı renkte görülmektedir. (C) NMDAR1 reseptör proteinini eksprese eden Rspo-3 nöronları sarı renkte izlenmektedir. ok: optik kiyazma



Şekil 67. PVN'de yerleşik RSPO3 nöronlarında NMDAR1 ekspresyonu 20X. (A) FITC ile işaretli ile RSPO3 nöronları yeşil, (B) Cy5 ile işaretli NMDAR1 eksprese eden nöronlar ise kımızı renkte görülmektedir. (C) NMDAR1 reseptör proteinini eksprese eden RSPO3 nöronları sarı renkte izlenmektedir. 3V: 3. ventrikül

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tez çalışması kapsamında yapılan deneylerde, kurgulanan "RSPO peptitlerini sentezleyen ve salgılayan nöronlar fizyolojik tokluk veya glukoz yüklenmesi sonrası aktive olur ve bu aktivasyonda glutamaterjik sistem rol alır" hipotezi test edilerek doğrulanmış ve ayrıca RSPO1 ve RSPO3 nöronlarının işlevlerinin düzenlenmesinde kullanılan hücre içi yolaklardan birinde *c-fos* geninin yeraldığı anlaşılmıştır. Çalışmalar sonucunda RSPO sentezleyen nöronların glutamaterjik innervasyonları ile ilgili literatürde ilk olacak bulgular elde edilmiştir. Çalışmadan elde edilen deneysel sonuçlar özgün hedef sıralamasına göre aşağıda tartışılmıştır.

5.1. RSPO1 ve RSPO3 Nöronlarının Hipotalamustaki Lokalizasyonları

RSPO1 ve RSPO3'ü sentezleyen nöronlar ilk olarak arkuat çekirdek, ventromedial çekirdek, paraventriküler çekirdek ve median eminens'te in situ hibridizasyon tekniği ile mRNA düzeyinde gösterilmiştir (Li ve ark., 2014). Yakın zamanda laboratuvarımızda yaptığımız immunohistokimyasal çalışma ile protein düzeyinde, RSPO1 ve RSPO3 sentezleyen nöronların hipotalamustaki lokalizasyonlarını gösterdik. RSPO'i eksprese eden nöronların, supraoptik çekirdek (SON), paraventriküler çekirdek (PVN), arkuat çekirdek (ARC), lateral hipotalamik alan (LH), suprakiazmatik çekirdek (SCh), anterior paraventriküler çekirdek (PVN), periventriküler hipotalamik çekirdek (PeV), anterior hipotalamik alan, magnoselüler preoptik çekirdek (MCPO) ve ventromedial çekirdekte (VMH) eksprese olduğunu gösterdik. Yine aynı çalışmada, RSPO'ü eksprese eden nöronların ise, SON, PVN, ARC, VMH, LHA, SCh, Pev, zona inserta (ZI) ve anterior parvisellüler çekirdekte lokalize olduğunu immunohistokimyasal olarak gösterdik (Yurtseven Gok ve ark., 2023). Tez çalışmasında RSPO1 ve RSPO3 içeren nöronların hipotalamustaki lokalizasyonlarının önceki çalışmamızla uyumlu olduğu belirlenmiş ancak mevcut çalışmada sadece SON ve PVN'de lokalize RSPO1 ve RSPO3 nöronlarına odaklanmıştır.

5.2. RSPO1 ve RSPO3 Nöronlarının Regülasyonunda Glutamaterjik Sistemin Rolünün Araştırılması (Farklı Glutamat Reseptör Agonistlerinin -Kainik asit, AMPA ve NMDA- RSPO1 ve RSPO3 Nöronlarının Aktivasyonuna Olan Etkisinin Gösterilmesi)

Çalışmanın birinci özgün hedefine yönelik deneylerden, "Rspo sentezleyen nöronlar (RSPO1 ve RSPO3) glutamaterjik sistem tarafından regüle edilmekte midir?" yönündeki araştırma sorusunu cevaplayan/kanıtlayan sonuçlar elde edilmiştir. İyonotropik non-NMDA ve NMDA glutamat reseptörleri üzerinden etki eden tüm glutamat agonistlerinin, RSPO1 ve RSPO3 nöronlarının önemli bir bölümünde aktivasyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca bu nöronal aktivasyonda c-Fos proteininin kullanıldığı hücre içi yolakların rol oynadığı gösterilmiştir.

Çalışmalarımızda temel olarak aktive olan RSPO1 ve RSPO3 nöronlarının hipotalamik supraoptik çekirdekte, paraventriküler çekirdekte ve arkuat çekirdekte lokalize oldukları görülmüştür. Tez çalışması kapsamında sadece SON ve PVN'de yerleşik RSPO1 ve RSPO3 nöronları değerlendirilmiş, arkuat çekirdekte lokalize olan RSPO1 ve RSPO3 nöronlarının incelenmesi tezin tamamlanabilmesi için belirlenen süreden çok daha fazla zaman gerektireceğinden bu alanın incelenmesi kapsam dışında bırakılmıştır.

Glutamat, MSS'deki hızlı uyarıcı nörotransmisyonun çoğuna aracılık eder ve neredeyse her nöronu uyarır. Beyindeki nöronların %80-90 kadarı nörotransmitter olarak glutamatı kullanır ve beyindeki sinapsların yaklaşık %80-90'ı glutamaterjiktir (Braitenberg, & Schütz, 1998). Glutamatın hipotalamik nöroendokrin sistemler üzerindeki etkinliği araştıran çok sayıda çalışma mevcuttur (Eyigor ve ark., 2001, 2005, 2010; Kocoglu ve ark., 2020; Minbay, Eyigor, & Çavusoğlu 2006; Yurtseven ve ark., 2020). Yapılan çalışmalar sonucunda kainik asit (Gynther, Petsalo, Hansen, Bunch, & Pickering 2015; Minbay ve ark., 2006; Ramirez, Terceo, Pineda, & Burgos 2011), AMPA (Gok-Yurtseven ve ark., 2019; Hankir, Parkinson, Bloom, & Bell 2012) ve NMDA (Gok-Yurtseven ve ark., 2019; Knapp ve ark., 2001; Mitsikostas ve ark., 1999) dahil olmak üzere glutamat agonistlerinin, kan-beyin bariyerini geçerek merkezi sinir sistemine ulaşabildiği bildirilmiştir. Glutamatın, nöronlar üzerindeki etkinliğini belirlemek amacıyla ilgili antikor kullanımıyla immünohistokimyasal yöntem kullanılarak, glutamat nörotransmisyonuna özgün veziküler glutamat

taşıyıcılarının varlığı hedef nöron üzerindeki akson sonlanmalarında gösterilebilir. Bu yönde laboratuvarımızda yapılan bir çalışmada anoreksijenik nesfatin-1 nöronlarının glutamaterjik sistem tarafından innerve edildiği, VGluT peptitlerinin glutamaterjik belirteç olarak kullanılmasıyla gösterilmiştir (Aghayeva, Gok Yurtseven, Hasanoglu Akbulut, & Eyigor 2024). Ayrıca immünohistokimyasal yolla diğer bir nörotransmisyon basamağı olan glutamat reseptör alt birimlerinin fonksiyonel iyon kanalı oluşturup oluşturamadıkları belirlenebilir. Bunu belirleyebilmek için, laboratuvarımızda daha önce yapılmış çalışmalarda olduğu gibi, deneklere dışarıdan reseptör agonistleri verilir ve hedef nöronların, nöronal aktivasyon belirteçleri kullanılarak (c-Fos, CREB ve STAT gibi) aktive olup olmadıkları değerlendirilir (Eyigor ve ark., 2010; Kocoglu ve ark., 2020; Yurtseven ve ark., 2020)

Hipotalamik supraoptik çekirdekte lokalize c-Fos-pozitif RSPO1 ve RSPO3 nöron oranlarının kontrolleriyle karşılaştırıldığında kainik asit enjeksiyonunun RSPO1 nöronlarında yaklaşık 68 kat, RSPO3 nöronlarında ise yaklaşık 80 kat artışa sebep olduğu gözlendi. AMPA enjeksiyonu sonrası aktive olan RSPO1 ve RSPO3 nöron sayısının kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 54 kat arttığı belirlendi. NMDA enjeksiyonu sonrası ise aktive olan RSPO1 nöron oranının %77, RSPO3 nöron oranının ise %75 olduğu gözlendi. Bu artışların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi.

Paraventriküler çekirdekte lokalize olan, her üç agonistin enjeksiyonu sonrasında c-Fos'u eksprese eden RSPO1 nöronlarının oranının 70 ila 80 kat kadar arttığı gözlendi. Aktive olan nöron sayıları her gruba ait kontrol denekleriyle karşılaştırıldığında bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu, tüm agonistlerin benzer oranda (KA %82, AMPA %70 ve NMDA %77) RSPO1 nöronlarını aktive ettiği bulundu. PVN'de lokalize RSPO3 nöronlarının her üç agonistin enjeksiyonu sonrasında aktivasyon oranları değerlendirildiğinde bu oranın kainik asit için %82, AMPA için %81 NMDA için ise %79 olduğu belirlendi. Kontrolleriyle karşılaştırıldığında her üç agonistin de c-Fos immünreaktivitesi gösteren RSPO3 nöronlarının sayısında anlamlı bir artışa neden olduğunu gösterdik. Kainik asit, AMPA ve NMDA reseptör agonistleri SON'de ve PVN'de yerleşik RSPO1 ve RSPO3 nöronlarında bazal c-Fos ekspresyonunu uyarmaktadır. Dolayısıyla her üç agonist de RSPO1 ve RSPO3 nöronlarını etkilemekte ve aktivasyon sağlamaktadır.

Laboratuvarımızda yapılan daha önceki çalışmalarla da oksitosin, oreksin, nesfatin ve nöronostatin nöronları gibi farklı nöroendokrin sistemlere glutamat agonistlerinin benzer etkileri gösterilmiştir (Eyigor ve ark., 2010, 2012; Kocoglu ve ark., 2020; Minbay ve ark., 2006; Yurtseven ve ark., 2020). Şöyle ki; anoreksijenik bir peptit olan nesfatin-1'i sentezleyen nöronların regülasyonunda glutamaterjik sistemin etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, hipotalamik SON, PVN ve ARC'de yerleşik nesfatin-1 nöronlarının her üç agonistin enjeksiyonu sonrasında aktivasyon oranlarının arttığı gösterildi (Yurtseven ve ark., 2020). Anoreksijenik nöronlar olarak bilinen nöronostatin nöronların regülasyonunda glutamaterjik sistemin etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada ise, i.p. yolla kainik asit uygulamasının sadece dişi deneklerde, NMDA ve AMPA uygulamalarının ise her iki cinsiyete ait deneklerde de aktive olan nöronostatin nöron sayısında istatistiksel olarak anlamlı artışa sebep olduğu bildirildi (Kocoglu ve ark., 2020).

Tez çalışmasında agonist etkilerinin anlamlı bir şekilde uygun antagonistler tarafından baskılandığı belirlenmiştir. Tüm deneklerin supraoptik çekirdeklerinde, NMDA ve non NMDA reseptör antagonistlerinin aktive olan RSPO1 ve RSPO3 nöronlarındaki agonistlerin aktivasyon etkisini neredeyse kontrol düzeyine indirmiş olduğunu gösterdik. Paraventriküler çekirdekte ise agonist etkisiyle aktive olan nöronların baskılanma oranları verilen antagoniste göre değişiklik gösterdi; MK-801'in özellikle paraventriküler çekirdekte aktive olan RSPO1 ve RSPO3 nöron sayısını baskılama oranınlarını kontrol grubuna yaklaştırdığını, CNQX'in ise agonist gruplara göre aktive olan nöron sayısını anlamlı derecede düşürdüğünü ancak MK-801 kadar potent etki göstermediğini belirledik. Antagonist etkileri açısından değerlendirildiğinde hem SON hem de PVN'de blokörlerin birbirine benzer fonksiyonları gösterdiğini söyleyebiliriz.

5.3. RSPO1 ve RSPO3 Nöronlarının Fizyolojik Olarak Uyarılması ve Bu Uyarılmada Non NMDA Glutamat Antagonistinin (CNQX) Etkinliğinin Araştırılması

Çalışmanın ikinci özgün hedefine yönelik deneylerden, "R-spondin peptitlerini (RSPO1 ve RSPO3) eksprese eden hipotalamik nöronlar açlık sonrası beslenme ile oluşan tokluk durumunda ya da yine açlık sonrası glikoz yüklenmesi gibi durumlarda

fizyolojik olarak nöronal aktivasyon gösterir mi ve bu aktivasyonda glutamaterjik antagonizma etki eder mi?" yönündeki araştırma sorusunu cevaplayan/kanıtlayan sonuçlar elde edilmiştir.

Sunulan tez çalışmasının bu bölümünde ise, erkek sıçanlarda 48 saatlik açlık ile uyarılmış beslenmenin, RSPO1 ve RSPO3 nöronlarında aktivasyon etkisi yarattığı ve bu aktivasyona c-Fos'un aracılık ettiğini gösterdik. Bu veriler doğrultusunda, bazı nöroendokrin nöronların aktivitelerinin düzenlenmesine c-Fos'u içeren hücre içi yolağın aracılık ettiği düşüncesi desteklemektedir. Buna ek olarak, c-Fos'un kullanıldığı yolak ile düzenlenen nöron tipi açısında değerlendirildiğinde "RSPO1/RSPO3- c-Fos ilişkisi" litratürde ilk olacaktır. Bu bulgu, bir önceki bölümden elde ettiğimiz sonuçları da destekler niteliktedir. Glutamaterjik sistemin RSPO1 ve RSPO3 nöronları üzerindeki düzenleyici etkisini belirlemeyi amaçladığımız bu deneyde, glutamat agonistlerinin hangi hücre içi yolak üzerinden etki ettiği ve hangi nöronal aktivasyon belirtecinin kullanıldığı immünohistokimyasal yöntemle gösterilmişti. Kullandığımız nöronal aktivasyon belirteci olan c-Fos antikoruna ait immünoreaktivitenin kontrol gruplarında da var olması RSPO1 ve RSPO3 nöronlarında bazal koşullarda bu yolağın kullanıldığını ve olasılıkla farklı bir sinyalin c-Fos yolağı üzerinden bu nöronların aktivitesini düzenleyebileceğini düşündürmüştü. 48 saatlik açlık ile uyarılmış beslenmeyi takiben erkek sıçanlarda, açlık gruplarıyla karşılaştırıldığında belirlenen c-Fos-immünoreaktif nöron sayısındaki anlamlı artış sırasıyla RSPO1 nöronları için SON %94, PVN'de ise %84, RSPO3 nöronları için SON %94, PVN %76 olarak bulundu. Tez çalışmasının bu bölümünde, açlık sonrası beslenme sonucu ortaya çıkan RSPO1 ve RSPO3 nöronlarındaki aktivasyonunun, glutamat reseptörü antagonisti uygulaması ile baskılandığı da gösterildi. Hem kainik asit hem de AMPA reseptör antagonisti olarak görev yapan CNQX, hem supraoptik çekirdekte hem de paraventriküler çekirdekte anlamlı bir şekilde aktive olan RSPO1 ve RSPO3 nöron sayısını azalttı. Bu sonuç, glutamatın RSPO1 ve RSPO3 nöronlarındaki düzenleyici etkisinin özgün olduğunu düşündürdü.

Hipotalamik çekirdekler olan ARC ve VMH, bazal hipotalamusta bitişik olarak yer alırlar, ancak farklı tipte nöronlar içerirler. ARC, hem oreksijenik nöropeptit Y nöronlarını hem de anoreksijenik POMC/CART nöronlarını içerir**.** RSPO1'in üçüncü beyin ventrikülüne enjeksiyonunun, ARC'de lokalize oreksijenik NPY nöronlarının

ekspresyonlarını mRNA düzeyinde inhibe ettiği ve anoreksijenik POMC nöronlarının ise mRNA ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada, RSPO1'in VMH'de, RSPO3'ün ise PVN'de mRNA düzeyinde eksprese edildiği ve ayrıca açlık ile aşağı regüle edildikleri bildirilmiştir (Li ve ark., 2014). ARC'deki CART nöronları, gıda alımını ve enerji homeostazını düzenlemede önemli bir rol oynar (Lau, & Herzog, 2014). CART peptidinin i.s.v. enjeksiyonu hem normal hem de açlık kaynaklı beslenmeyi engeller (Aja, Schwartz, Kuhar, & Moran 2001; Kristensen ve ark., 1998). Yapılan bir çalışmada ARC'deki CART nöronlarının, RSPO1 reseptörü olan LGR4'ü mRNA düzeyinde ifade ettiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada RSPO1'in i.s.v. enjeksiyonunun, ARC'deki CART nöronlarında 1,5 saatte c-Fos ekspresyonunu indüklediğini; RSPO1 ile indüklenen CART nöronlarının aktivasyonuna, besin alımının akut inhibisyonu eşlik ettiği gösterilmiştir (Li ve ark. 2019).

Santral oksitosin sistemi, çoğunlukla hipotalamusta SON ve PVN'de bulunan nöronlardan oluşmaktadır. Oksitosin sentezleyen nöronlar, magnoselüler ve parvoselüler oksitosin nöronları olarak 2 alt grupta incelenmektedir (Yosten ve ark., 2013). Hem SON hem de PVN'de bulunan magnoselüler oksitosin nöronları, aksonlarını nörohipofize (arka hipofiz) doğru uzatır ve genel dolaşıma oksitosin salgılar. Merkezi melanokortin sistemi gibi, santral oksitosin sisteminin de iştahın kontrolünde önemli işlevleri olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Merkezi olarak verilen oksitosinin doz bağımlı olarak erkek sıçanlarda besin alımını azalttığı gösterilmiştir (Arletti, Benelli, & Bertolini 1989; Olson ve ark., 1991a; Olson, Drutarosky, Stricker, & Verbalis 1991b). Anoreksijenik etkili NUCB2/nesfatin-1 nöronlarının çoğunluğunun oksitosin, vazopressin ve kortikotropin salıcı hormon nöronlarıyla PVN ve SON'de ko-lokalize oldukları birçok çalışma ile gösterilmiştir (Foo ve ark., 2008; Kohno ve ark., 2008; Noetzel ve ark., 2009). Laboratuvarımızda yapılan bir çalışmada, açlık sonrası yeniden beslenmeyle nesfatin-1 nöronlarının büyük ölçüde aktive olduğu, aynı zamanda bu aktivasyonun CNQX'in uygulanmasıyla önemli ölçüde baskılandığı gösterilmiştir (Kocoglu ve ark., 2022). Başka bir çalışmada ise, 48 saatlik açlıktan sonra 2 saatlik yeniden beslenmenin ön hipotalamik periventriküler çekirdekteki nöronostatin nöronlarında pSTAT5 ekspresyonunu indüklediğini ve bu ekspresyonun CNQX tarafından önemli ölçüde baskılandığı kanıtlanmıştır (Kocoglu ve ark., 2020). Bu çalışmaların verileri tez çalışmasından elde

ettiğimiz verilere paralel niteliktedir. Bu bilgiler doğrultusunda SON'de ve PVN'de lokalize magnoselüler nöron gurubunda yer alan anoreksijenik nesfatin-1 gibi, bu hipotalamik alanda lokalize ve anoreksijenik etkileri kanıtlanmış olan RSPO1 ve RSPO3 nöronlarının işlevlerini düzenlemede yeniden beslenme gibi çevresel bir faktörün etkili olduğunu ve bu etkinin glutamaterjik sistem aracılığıyla gerçekleştiğini desteklemektedir.

5.4. RSPO1 ve RSPO3 Nöronlarının Glikoz ile Uyarılması ve Bu Uyarılmada Glutamat Antagonistlerinin Etkinliğinin Araştırılması

Sunulan tez çalışmasının bu bölümünde ise, erkek sıçanlara 48 saat açlık sonrası glikoz verilmesinin RSPO1 ve RSPO3 nöronlarının aktivasyonununa neden olduğunu ve bu aktivasyona c-Fos'un aracılık ettiğini, glikoz öncesi glutamat antagonistleri CNQX ve MK-801'in aktive olan nöron sayısını düşürdüğünü gösterdik.

Erkek sıçanlarda 48 saat açlık sonrası glikoz enjeksiyonunu takiben, SON'de lokalize c-Fos-pozitif RSPO1 ve RSPO3 nöron oranlarının açlık grubu ile karşılaştırıldığında glikoz enjeksiyonunun RSPO1 nöronlarında yaklaşık 16 kat, RSPO3 nöronlarında ise yaklaşık 54 kat artışa sebep olduğu gözlendi. Glikoz enjeksiyonunun PVN'de lokalize nöronlarda aktivasyon etkisi değerlendirildiğinde ise bu oranın RSPO1 nöronlarında %80, RSPO3 nöronlarında ise %73 olduğu bulundu. Bu artışların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi. Açlık sonrası glikoz enjeksiyonu SON'de ve PVN'de yerleşik RSPO1 ve RSPO3 nöronlarında bazal c-Fos ekspresyonunu uyarmaktadır. Açlık sonrası glikoz uygulanan deneklerin RSPO1 ve RSPO3 nöronlarında meydana gelen aktivasyonunun, glutamat reseptörü antagonisti uygulaması ile baskılandığı da gösterildi. Hem kainik asit hem de AMPA reseptör antagonisti olarak göre yapan CNQX'in, glikoz enjeksiyonuna bağlı aktivasyonu anlamlı şekilde baskıladığı gösterildi. RSPO1 nöronlarında glikoz enjeksiyonuna bağlı aktivasyon oranı her iki hipotalamik alan için de %80 iken, CNQX enjeksiyonunun bu oranı SON'de %11, PVN'de ise %14'e düşürdüğü gösterildi. RSPO3 nöronlarında ise aktivasyon oranı SON için %17,3, PVN için ise %10 olarak bulundu. Glikoz öncesi MK-801 uygulanan gruplarda ise RSPO1 nöronlarının aktivasyon oranı SON'de %2, PVN'de %14 olarak, RSPO3 nöronlarının aktivasyon oranı SON'de %1,4, PVN'de %12 olarak gösterildi. Hem NMDA hem de non NMDA reseptör antagonistleri, hem

SON'de hem de PVN'de glikoz enjeksiyonu sonrası anlamlı bir şekilde aktive olan RSPO1 ve RSPO3 nöron sayısını azaltarak bu oranı açlık grubundaki bazal c-Fos ekspresyon oranına yaklaştırmıştır.

Glikoz homeostazisi ve beslenmenin homeostatik ve hedonik kontrolü hormonal, nöronal ve besinle ilgili ipuçlarıyla düzenlenir. Glikoz, beynin birincil yakıtıdır ve yüksek afiniteli glikoz taşıyıcısı (GLUT) tip 1 ile merkezi sinir sistemine girer (Alvarsson, & Stanley, 2018). Glikoz, metabolik enerji kaynağı rolünün yanı sıra, hormon salgılanmasını ve nöronal aktiviteyi kontrol eden önemli bir sinyaldir ve dolayısıyla beslenme kontrolüyle eşgüdümlü olarak tüm vücudun metabolik olarak bütünleşmesine katkıda bulunur (Steinbusch, Labouèbe, & Thorens 2015). MSS'de glikoza duyarlı hücreler birçok yerde lokalizedir, ancak özellikle hipotalamus ve beyin sapında yaygın olarak bulunur. Hipotalamusta, glikoza duyarlı nöronlar esas olarak arkuat çekirdekte (ARC) ve ventromedial (VMN) ve lateral (LH) çekirdeklerde bulunur. Beyin sapında ise area postrema (AP), nucleus tractus solitarius (NTS) ve vagusun dorsal motor çekirdeğinden (DMNX) oluşan dorsal vagal komplekste (DVC) ve medullanın ventral kısmında (bazolateral medulla, BLM) bulunurlar (Steinbusch ve ark., 2015). Glikoza duyarlı nöronlar, glikozla aktive olan veya glikozla inhibe olan nöronlardır ve kan glikozu değişikliklerine yanıt verirler (Miñana-Solis, Angeles-Castellanos, Buijs, & Escobar 2010). Yapılan bir çalışmada intrakarotid glikoz enjeksiyonundan sonra, PVN ve VMH'de yerleşik nöronların aktivasyonu c-Fos belirteci ile gösterilmiştir. Aynı çalışmada ARC ve PVN'deki c-Fos pozitif nöronların sayısının, salin verilen kontrol grubuna göre önemli ölçüde daha yüksek olduğu saptanmıştır (Miñana-Solis ve ark., 2010). Oreksijenik etkili MCH nöronlarının glikoz tarafından stimüle edilerek glikoza duyarlı nöronlar olduğu kanıtlanmıştır (Burdakov ve ark., 2005). Oreksin nöronlarının da glikoza duyarlı olduğu, artan glikoz konsantrasyonlarının oreksin nöronlarının aktivasyonunu engellediği ve farelerde beslenme davranışını uyardığı kanıtlanmştır (Burdakov ve ark., 2005; Yamanaka ve ark., 2003). ARC'de lokalize anoreksijenik POMC nöronlarının önemli bir kısmının leptin tarafından hem STAT-3 hem de c-fos belirteci ile aktive edildikleri gösterilmiştir. Ayrıca kan glikozunun artırılmasıyla (Parton ve ark., 2007) ghrelin tarafından inhibe edildikleri gösterilmiştir (Cowley ve ark., 2003). Bu çalışmalar anoreksijenik POMC nöronlarının glikoza duyarlı nöronlar olduğunu

göstermektedir. RSPO1'in üçüncü beyin ventrikülüne enjeksiyonu sonrası ARC POMC nöronlarının mRNA düzeyinde ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir (Li ve ark., 2014). Yapılan çalışmalarda, açlık sonrası RSPO1 ve RSPO3 mRNA seviyesindeki değişimlerin (Li ve ark., 2014) POMC nöronlarının mRNA seviyesindeki değişimler (Mizuno ve ark., 1998) ile benzer olduğu rapor edilmiştir. Laboratuvarımızda yapılan bir çalışmada SON'de lokalize nesfatin-1 nöronlarının 48 saat açlık sonrası glikoz uygulaması sonrası aktive oldukları, bu aktivasyonu glutamat reseptör antagonisti CNQX'in anlamlı şekilde baskıladığı gösterilmiştir. Bu sayede anoreksijenik nesfatin-1 nöronlarının glikoza duyarlı nöronlar olduğu ve glutamaterjik sistemin bu mekanizmada rolü olduğu gösterilmiştir (Kocoglu ve ark., 2022). Bu bilgiler doğrultusunda, anoreksijenik etkileri kanıtlanmış RSPO1 ve RSPO3'ün de glikoza duyarlı nöronlar olduğunu ve glutamaterjik sistemin bu mekanizmayı düzenlediğini düşünmekteyiz.

5.5. RSPO1 ve RSPO3 Nöronlarında Eksprese Edilen Glutamat Reseptör Alt Birim Protein Ekspresyonlarının Gösterilmesi (Kainat için GLUK5; AMPA için GluA2; NMDA için GluN1)

Çalışmanın üçüncü özgün hedefine yönelik deneylerden, "R-spondin peptitlerini (RSPO-1 ve RSPO-3) eksprese eden hipotalamik nöronlar glutamat reseptör alt birimlerini eksprese eder mi?" yönündeki araştırma sorusunu cevaplayan/kanıtlayan sonuçlar elde edilmiştir.

Glutamatın glutamaterjik nörotransmisyondaki birincil amino asit nörotransmitteri olduğu ve farklı alt birim kompozisyonlarına sahip glutamat reseptörlerine bağlandığını gösteren pek çok çalışma mevcuttur (Brann, 1995; Brann, & Mahesh, 1994; Malarkey, & Parpura, 2008; Sagar ve ark., 1988). İn situ hibridizasyon ve immünohistokimya tekniği kullanılarak elde edilen veriler, glutamat reseptörlerinin üç alt ailesine ait altbirim proteinlerinin hipotalamusta eksprese edildiğini göstermiştir.Yapılan çalışmalarda, kainat reseptör ailesinden GluK5, AMPA reseptör ailesinden GluA1 ve NMDA reseptör ailesinden GluN1 alt biriminin hipotalamusta en yaygın ekspresyon gösteren alt birimler olduğu bildirilmiştir (Eyigor, Centers, Comparative, ve ark., 2001; Eyigor ve ark., 2005; Herman, Eyigor, Ziegler, & Jennes 2000; Petralia ve ark., 1994; Van Den Pol, Hermans-Borgmeyer, Hofer,

Ghosh, & Heinemann 1994).

Glutamat reseptörleri, aynı alt birimlerle homomerik kompleksler veya farklı alt birimlerle heteromerik reseptör kompleksleri oluşturarak işlevsel hale gelirler (Alt ve ark., 2004; Howe, 1996; Mayer, 2016; Monyer ve ark., 1992). Bu bilgiye dayanarak, çalışmamız RSPO1 ve RSPO3 nöronlarının SON ve PVN'de işlevsel glutamat reseptörlerine sahip olabileceğini, çünkü işlevsel reseptör kanalları oluşturmak için gerekli alt birimlerin bir kısmını eksprese ettiğini gösterdi.

Kainat reseptör alt birimlerinin varlığını supraoptik çekirdekte mRNA düzeyinde araştıran bir çalışmanın sonucunda, GluK5'in çok yüksek yoğunlukta ve GluK1'in düşük yoğunlukta ifade edildiği gösterilmiştir (Eyigor, Centers, Comparative, ve ark., 2001). Laboratuvarımızda yapmış olduğumuz bir çalışmada, GluK5 reseptör alt birimine ait immün reaksiyon gösteren nöronların tüm hipotalamik çekirdeklerde ve alanlarda var olduğunu gösterdik (Gök Yurtseven ve ark., 2021). Tez çalışmasından elde ettiğimiz verilere göre hem PVN hem de SON'de lokalize RSPO1 ve RSPO3 nöronlarının GluK5 alt birim proteinini eksprese ettiğini gösterdik. Tek başına kanal oluşturamayan GluK5, RSPO1 ve RSPO3 nöronlarında işlevsel heteromerik kainat seçici reseptörler oluşturmak için GluK1, GluK2 veya GluK3 alt birimlerinden biriyle birleşebilir (Alt ve ark., 2004; Howe, 1996). Düşük afiniteli alt birimler (GluK1, GluK2 ve GluK3) homomerik kainat reseptörleri oluşturabilir (Alt ve ark., 2004). Bu veriler doğrultusunda GluK1, GluK2 veya GluK3 alt birimlerinden biriyle RSPO1 ve RSPO3 nöronlarının ko-lokalize olup olmadığını araştıran ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

AMPA reseptör ailesinden GluA1-4'ün araştırıldığı bir çalışmada, in situ hibridizasyon tekniği kullanılarak mRNA düzeyinde, GluA1 ve GluA2'nin hipotalamusta yaygın olarak dağıldığı ve güçlü bir ekspresyon gösterdiği, GluA3 ve GluA4 alt birimlerinin ise daha düşük yoğunlukta eksprese edildiği bildirilmiştir (Sato, Kiyama, & Tohyama 1993). Tez çalışmasına ait verilerde ise hem PVN hem de SON'de lokalize RSPO1 ve RSPO3 nöronlarıyla GluA2 alt birim proteininin ko-lokalize olduğunu gösterdik. AMPA reseptör alt birimleri GluA1 veya GluA2, homomerik ve/veya heteromerik fonksiyonel AMPA seçici glutamat reseptörleri oluşturabilirler, ancak GluA2 içeren heteromerler MSS boyunca baskın olanıdır (Hansen ve ark., 2021).

NMDA reseptör alt birimleri yalnızca heteromerik yapıdaki işlevsel reseptör kompleksleri oluşturabilirler (Paoletti, 2011). NMDA reseptör komplekslerinin oluşturulmasında zorunlu alt birim GluN1'dir (Kumar, Schuck, & Mayer 2011). İmmünohistokimyasal çalışmalar GluN1 (Petralia ve ark., 1994b), GluN2A ve GluN2B reseptör proteinlerinin SON ve PVN'de lokalize olan magnosellüler nöronlarda yüksek yoğunlukta ifade edildiğini göstermiştir. (Doherty, & Sladek, 2011; Petralia ve ark., 1994a). Tez çalışmasında bir NMDA reseptör alt birimi proteini olan GluN1'in SON ve PVN'de yerleşik RSPO1 ve RSPO3 nöronlarında ifade edildiği gösterilmiştir. GluN2A immünoreaktivitesi RSPO1 ve RSPO3 nöronlarında araştırılmasa da, GluN1 alt birimi diğer GluN2 tipleriyle işlevsel reseptör kanalları oluşturur. Mevcut çalışmada, RSPO1 ve RSPO3 nöronlarındaki GluN2B, GluN2C ve GluN2D alt birimlerinin ifadeleri araştırılmamıştır. Yine de, GluN2B, C ve D reseptör tipleri supraoptik çekirdek ve paraventriküler çekirdekte ekprese edilir. Sonuçlar, SON ve PVN'de lokalize olan RSPO1 ve RSPO3 nöronlarının da bu reseptör tiplerini eksprese edebileceğini ve bu nedenle NMDA reseptörleri tarafından düzenlenebileceğini düşündürmektedir.

Sunulan tez çalışmasıyla RSPO1 ve RSPO3 nöronlarının regülasyonu ile ilgili literatürde ilk olacak pek çok yeni veri elde edilmiştir:

1. RSPO1 ve RSPO3 nöronlarının aktivitesinin düzenlenmesinde glutamaterjik sistemin direkt rol oynadığı gösterilmiştir.

2. RSPO1 ve RSPO3 nöronlarının aktivasyonunda c-Fos ekspresyonunu gerektiren hücre içi yolakların kullanıldığı gösterilmiş, literatürde ilk kez RSPO1 ve RSPO3 nöronlarında c-Fos proteininin varlığı belirlenmiştir.

3. RSPO1 ve RSPO3 nöronlarında, açlık sonrası beslenme ya da glikoz yüklenmesi sonrası nöronal aktivasyon gerçekleştiği ve bu aktivasyonu glutamat reseptör antagonistlerinin baskıladığı gösterilmiştir.

4. RSPO1 ve RSPO3 nöronlarının, homomerik ya da heteromerik fonksiyonel reseptör kanalları oluşturabilecek glutamat reseptör alt birimlerini eksprese ettiği gösterilmiştir.

Tez çalışmasının limitasyonları kapsamında öncelikle finansal destek yetersizliği ve zaman kısıtlaması nedeniyle RSPO nöronlarının lokalize olduğu SON ve PVN dışındaki diğer hipotalamik çekirdekler incelenememiştir. Bunun yanı sıra yukarıda belirtilen kısıtlamalar nedeniyle RSPO sisteminin dişi ve erkek deney hayvanları

arasındaki farklılıkların araştırılamamış olması da tez çalışmasının limitasyonları arasındadır. Tez çalışmasında, finansal destek yetersizliği nedeniyle, yapılan uygulamalar sonrasında periferik serum RSPO düzeylerindeki değişiklikler ölçülememiştir.

Sonuç olarak elde edilen veriler doğrultusunda, anoreksijenik etkilere sahip RSPO1 ve RSPO3 nöronlarının beslenme davranışı ve glikoz metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynayabileceği, bu regülasyonda nörotransmitter glutamat gibi santral sinyallerin rol oynadığı ve glutamatın etkinliğini NMDA ve non-NMDA reseptörleri aracılığıyla gösterdiği sonucuna varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

Abbud, R., & Smith, M. S. (1991). Differences in the luteinizing hormone and prolactin responses to multiple injections of kainate, as compared to N-methyl-D,L-aspartate, in cycling rats. *Endocrinology*, 129(6), 3254–3258. https://doi.org/10.1210/ENDO-129-6-3254

Adam, C. L., Archer, Z. A., Findlay, P. A., Thomas, L., & Marie, M. (2002). Hypothalamic gene expression in sheep for cocaine- and amphetamine-regulated transcript, pro-opiomelanocortin, neuropeptide Y, agouti-related peptide and leptin receptor and responses to negative energy balance. Neuroendocrinology, 75(4), 250–256. https://doi.org/10.1159/000054716

Aghayeva, A., Gok Yurtseven, D., Hasanoğlu Akbulut, N., & Eyigor, Ö. (2024). Immunohistochemical determination of the excitatory and inhibitory axonal endings contacting NUCB2 nesfatin-1 neurons. NEUROPEPTIDES, 103(102401), 1–11. https://dx.doi.org/10.1016/j.npep.2023.102401

Aja, S., Schwartz, G. J., Kuhar, M. J., & Moran, T. H. (2001). Intracerebroventricular CART peptide reduces rat ingestive behavior and alters licking microstructure. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 280(6). https://doi.org/10.1152/AJPREGU.2001.280.6.R1613

Al-Massadi, O., Dieguez, C., Schneeberger, M., López, M., Schwaninger, M., Prevot, V., & Nogueiras, R. (2021). Multifaceted actions of melanin-concentrating hormone on mammalian energy homeostasis. *Nature Reviews. Endocrinology*, 17(12), 745–755. https://doi.org/10.1038/S41574-021-00559-1

Al-Massadi, O., Quiñones, M., Clasadonte, J., Hernandez-Bautista, R., Romero-Picó, A., Folgueira, C., … Nogueiras, R. (2019). MCH Regulates SIRT1/FoxO1 and Reduces POMC Neuronal Activity to Induce Hyperphagia, Adiposity, and Glucose Intolerance. *Diabetes*, 68(12), 2210–2222. https://doi.org/10.2337/DB19-0029

Alon, T., & Friedman, J. M. (2006). Late-onset leanness in mice with targeted ablation of melanin concentrating hormone neurons. *The Journal of Neuroscience*, 26(2), 389–397. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1203-05.2006

Alt, A., Weiss, B., Ogden, A. M., Knauss, J. L., Oler, J., Ho, K., … Bleakman, D. (2004). Pharmacological characterization of glutamatergic agonists and antagonists at recombinant human homomeric and heteromeric kainate receptors in vitro. *Neuropharmacology*, 46(6), 793–806. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2003.11.026

Alvarsson, A., & Stanley, S. A. (2018). Remote control of glucose-sensing neurons to analyze glucose metabolism. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 315(3), E327–E339. https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00469.2017

Anand, B. K., & Brobeck, J. R. (1951). Localization of a "Feeding Center" in the Hypothalamus of the Rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 77(2), 323–325. https://doi.org/10.3181/00379727-77-18766

Anwar, G. M., Yamamah, G., Ibrahim, A., El-Lebedy, D., Farid, T. M., & Mahmoud, R. (2014). Nesfatin-1 in childhood and adolescent obesity and its association with food intake, body composition and insulin resistance. *Regulatory Peptides*, 188, 21–24. https://doi.org/10.1016/J.REGPEP.2013.12.001

Aoki, M., Mieda, M., Ikeda, T., Hamada, Y., Nakamura, H., & Okamoto, H. (2007). R-spondin3 is required for mouse placental development. *Developmental*

Biology, 301(1), 218–226. https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2006.08.018

Aparicio, L., Fierro, L., Abreu, A., Cárdenas, T., Durán, R., Denes, M., … Antonio Pérez Estudillo, C. (2022). Current Opinion on the Use of c-Fos in Neuroscience. *NeuroScience 687-702*, 3(4), 687–702. https://doi.org/10.3390/NEUROSCI3040050

Appleyard, S. M. (2009). Lighting Up Neuronal Pathways: The Development of a Novel Transgenic Rat that Identifies Fos-Activated Neurons Using a Red Fluorescent Protein. *Endocrinology*, 150(12), 5199–5201. https://doi.org/10.1210/EN.2009-1234

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

Arora, S., & Anubhuti. (2006). Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity--a review. *Neuropeptides*, 40(6), 375–401. https://doi.org/10.1016/J.NPEP.2006.07.001

Balla, A., Koneru, R., Smiley, J., Sershen, H., & Javitt, D. C. (2001). Continuous phencyclidine treatment induces schizophrenia-like hyperreactivity of striatal dopamine release. *Neuropsychopharmacology*, 25(2), 157–164. https://doi.org/10.1016/S0893-133X(01)00230-5

Balthasar, N., Dalgaard, L. T., Lee, C. E., Yu, J., Funahashi, H., Williams, T., … Lowell, B. B. (2005). Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell*, 123(3), 493–505. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2005.08.035

Barker, N., Van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., Van Den Born, M., Cozijnsen, M., … Clevers, H. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature*, 449(7165), 1003–1007. https://doi.org/10.1038/NATURE06196

Barsh, G. (1999). From Agouti to Pomc--100 years of fat blonde mice. *Nature Medicine*, 5(9), 984–985. https://doi.org/10.1038/12415

Bell, S. M., Schreiner, C. M., Wert, S. E., Mucenski, M. L., Scott, W. J., & Whitsett, J. A. (2008). R-spondin 2 is required for normal laryngeal-tracheal, lung and limb morphogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 135(6), 1049–1058. https://doi.org/10.1242/DEV.013359

Belousov, A. B., & Van Den Pol, A. N. (1997). Local synaptic release of glutamate from neurons in the rat hypothalamic arcuate nucleus. *The Journal of Physiology*, 499(3), 747–761. https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.1997.SP021966

Berthoud, H. R. (2002). Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 26(4), 393–428. https://doi.org/10.1016/S0149-7634(02)00014-3

Bessa-Neto, D., & Choquet, D. (2023). Molecular mechanisms of AMPAR reversible stabilization at synapses. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 125. https://doi.org/10.1016/J.MCN.2023.103856

Biebermann, H., Kühnen, P., Kleinau, G., & Krude, H. (2012). The neuroendocrine circuitry controlled by POMC, MSH, and AGRP. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 209(209), 47–50. https://doi.org/10.1007/978-3-642-24716-3_3

Bisset, G. W., & Fairhall, K. M. (1996). Release of vasopressin and oxytocin by excitatory amino acid agonists and the effect of antagonists on release by muscarine and hypertonic saline, in the rat in vivo. *British Journal of*

Pharmacology, 117(2), 309–314. https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.1996.TB15192.X

Bito, H., Deisseroth, K., & Tsien, R. W. (1997). Ca2+-dependent regulation in neuronal gene expression. *Current Opinion in Neurobiology*, 7(3), 419–429. https://doi.org/10.1016/S0959-4388(97)80072-4

Bittencourt, J. C., Presse, F., Arias, C., Peto, C., Vaughan, J., Nahon, J. -L, … Sawchenko, P. E. (1992). The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *The Journal of Comparative Neurology*, 319(2), 218–245. https://doi.org/10.1002/CNE.903190204

Blaydon, D. C., Ishii, Y., O'Toole, E. A., Unsworth, H. C., Teh, M. T., Rüschendorf, F., … Kelsell, D. P. (2006). The gene encoding R-spondin 4 (RSPO4), a secreted protein implicated in Wnt signaling, is mutated in inherited anonychia. *Nature Genetics*, 38(11), 1245–1247. https://doi.org/10.1038/NG1883

Bleakman, D., Gates, M., Ogden, A., & Mackowiak, M. (2002). Kainate receptor agonists, antagonists and allosteric modulators. *Current Pharmaceutical Design*, 8(10), 873–885. https://doi.org/10.2174/1381612024607108

Blomqvist, A. G., & Herzog, H. (1997). Y-receptor subtypes--how many more? *Trends in Neurosciences*, 20(7), 294–298. https://doi.org/10.1016/S0166-2236(96)01057-0

Blundell, J. E., & Halford, J. C. G. (1994). Regulation of nutrient supply: the brain and appetite control. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 53(2), 407–418. https://doi.org/10.1079/PNS19940046

Blundell, J., De Graaf, C., Hulshof, T., Jebb, S., Livingstone, B., Lluch, A., … Westerterp, M. (2010). Appetite control: methodological aspects of the evaluation of foods. *Obesity Reviews*, 11(3), 251–270. https://doi.org/10.1111/J.1467-789X.2010.00714.X

Boorse, G. C., & Denver, R. J. (2006). Widespread tissue distribution and diverse functions of corticotropin-releasing factor and related peptides. *General and Comparative Endocrinology*, 146(1), 9–18. https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2005.11.014

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), 5088–5094. https://doi.org/10.1210/EN.2007-0701

Braitenberg, V., & Schüz, A. (1998). Cortex: Statistics and Geometry of Neuronal Connectivity. *Cortex: Statistics and Geometry of Neuronal Connectivity*. https://doi.org/10.1007/978-3-662-03733-1

Bran, D. W., Zamorano, P. L., Chorich, L. P., & Mahesh, V. B. (1993). Steroid hormone effects on NMDA receptor binding and NMDA receptor mRNA levels in the hypothalamus and cerebral cortex of the adult rat. *Neuroendocrinology*, 58(6), 666–672. https://doi.org/10.1159/000126607

Brann, D. W. (1995). Glutamate: a major excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology*, 61(3), 213–225. https://doi.org/10.1159/000126843

Brann, D. W., & Mahesh, V. B. (1994). Excitatory amino acids: function and significance in reproduction and neuroendocrine regulation. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 15(1), 3–49. https://doi.org/10.1006/FRNE.1994.1002

Broberger, C., & Hökfelt, T. (2001). Hypothalamic and vagal neuropeptide circuitries regulating food intake. *Physiology and Behavior*, 74(4–5), 669–682. https://doi.org/10.1016/S0031-9384(01)00611-4

Broberger, C., Johansen, J., Johansson, C., Schalling, M., & Hökfelt, T. (1998). The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(25), 15043–15048. https://doi.org/10.1073/PNAS.95.25.15043

Burbach, J. P. H. (2011). What are neuropeptides? *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 789, 1–36. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-310-3_1

Burdakov, D., Gerasimenko, O., & Verkhratsky, A. (2005). Physiological changes in glucose differentially modulate the excitability of hypothalamic melanin-concentrating hormone and orexin neurons in situ. *The Journal of Neuroscience*, 25(9), 2429–2433. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4925-04.2005

Butler, A. A., Kesterson, R. A., Khong, K., Cullen, M. J., Pelleymounter, M. A., Dekoning, J., … Cone, R. D. (2000). A unique metabolic syndrome causes obesity in the melanocortin-3 receptor-deficient mouse. *Endocrinology*, 141(9), 3518–3521. https://doi.org/10.1210/ENDO.141.9.7791

Camilleri, M. (2015). Peripheral mechanisms in appetite regulation. *Gastroenterology*, 148(6), 1219–1233. https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2014.09.016

Campos, C. A., & Ritter, R. C. (2015). Nmda-type glutamate receptors participate in reduction of food intake following hindbrain melanocortin receptor activation. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 308(1), R1–R9. https://doi.org/10.1152/AJPREGU.00388.2014

Campos, C. A., Wright, J. S., Czaja, K., & Ritter, R. C. (2012). CCK-Induced Reduction of Food Intake and Hindbrain MAPK Signaling Are Mediated by NMDA Receptor Activation. *Endocrinology*, 153(6), 2633. https://doi.org/10.1210/EN.2012-1025

Cannon, W. B., & Washburn, A. L. (1993). An explanation of hunger. 1911. *Obesity Research*, 1(6), 494–500. https://doi.org/10.1002/J.1550-8528.1993.TB00033.X

Carlini, V. P., Ghersi, M., Gabach, L., Schiöth, H. B., Pérez, M. F., Ramirez, O. A., … de Barioglio, S. R. (2011). Hippocampal effects of neuronostatin on memory, anxiety-like behavior and food intake in rats. *Neuroscience*, 197, 145–152. https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2011.09.040

Carmon, K. S., Gong, X., Lin, Q., Thomas, A., & Liu, Q. (2011). R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/β-catenin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(28), 11452–11457. https://doi.org/10.1073/PNAS.1106083108/SUPPL_FILE/PNAS.201106083SI.PDF

Carr, K. D., Cabeza De Vaca, S., Sun, Y., & Chau, L. S. (2009). Reward-potentiating effects of D-1 dopamine receptor agonist and AMPAR GluR1 antagonist in nucleus accumbens shell and their modulation by food restriction. *Psychopharmacology*, 202(4), 731–743. https://doi.org/10.1007/S00213-008-1355-9/FIGURES/12

Caruso, M., Ferranti, F., Scheri, K. C., Dobrowolny, G., Ciccarone, F., Grammatico, P., … Ricci, G. (2015). R-Spondin 1/Dickkopf-1/Beta-Catenin Machinery Is Involved in Testicular Embryonic Angiogenesis. *PLoS ONE*, 10(4), e0124213.

https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0124213
Cavalcante, J. C., Cândido, P. L., Sita, L. V., Do Nascimento, E. S., Cavalcante, J. D. S., De Oliveira Costa, M. S. M., … Elias, C. F. (2011). Comparative distribution of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) in the hypothalamus of the capuchin monkey (Cebus apella) and the common marmoset (Callithrix jacchus). *Brain Research*, 1425, 47–61. https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2011.09.020
Chen, L. W., Wei, L. C., Lang, B., Ju, G., & Chan, Y. S. (2001). Differential expression of AMPA receptor subunits in dopamine neurons of the rat brain: a double immunocytochemical study. *Neuroscience*, 106(1), 149–160. https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00255-X
Chen, P. E., & Wyllie, D. J. A. (2006). Pharmacological insights obtained from structure-function studies of ionotropic glutamate receptors. *British Journal of Pharmacology*, 147(8), 839–853. https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0706689
Chen, X., Shu, X., Cong, Z. K., Jiang, Z. Y., & Jiang, H. (2015). Nesfatin-1 acts on the dopaminergic reward pathway to inhibit food intake. *Neuropeptides*, 53, 45–50. https://doi.org/10.1016/J.NPEP.2015.07.004
Choi, Y., Qin, Y., Berger, M. F., Ballow, D. J., Bulyk, M. L., & Rajkovic, A. (2007). Microarray analyses of newborn mouse ovaries lacking Nobox. *Biology of Reproduction*, 77(2), 312–319. https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.107.060459
Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, 127(3), 469–480. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.10.018
Clevers, H., & Nusse, R. (2012). Wnt/β-catenin signaling and disease. *Cell*, 149(6), 1192–1205. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.05.012
Collingridge, G. L., Olsen, R. W., Peters, J., & Spedding, M. (2009). A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology*, 56(1), 2–5. https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2008.06.063
Cone, R. D. (2005). Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nature Neuroscience*, 8(5), 571–578. https://doi.org/10.1038/NN1455
Cone, R. D. (2006). Studies on the physiological functions of the melanocortin system. *Endocrine Reviews*, 27(7), 736–749. https://doi.org/10.1210/ER.2006-0034
Conti, P., Amici, M., & Micheli, C. (2002). Selective agonists and antagonists for kainate receptors. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 2(2), 177–184. https://doi.org/10.2174/1389557024605456
Cotman, C. W., Monaghan, D. T., Ottersen, O. P., & Storm-Mathisen, J. (1987). Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their pathways. *Trends in Neurosciences*, 10(7), 273–280. https://doi.org/10.1016/0166-2236(87)90172-X
Cowley, M. A., Smart, J. L., Rubinstein, M., Cerdán, M. G., Diano, S., Horvath, T. L., … Low, M. J. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*, 411(6836), 480–484. https://doi.org/10.1038/35078085
Cowley, M. A., Smith, R. G., Diano, S., Tschöp, M., Pronchuk, N., Grove, K. L., … Horvath, T. L. (2003). The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron*, 37(4), 649–661. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00063-1
Creemers, J. W. M., Pritchard, L. E., Gyte, A., Le Rouzic, P., Meulemans, S.,

Wardlaw, S. L., … White, A. (2006). Agouti-Related Protein Is Posttranslationally Cleaved by Proprotein Convertase 1 to Generate Agouti-Related Protein (AGRP)83–132: Interaction between AGRP83–132 and Melanocortin Receptors Cannot Be Influenced by Syndecan-3. *Endocrinology*, 147(4), 1621–1631. https://doi.org/10.1210/EN.2005-1373

Crespo, C. S., Cachero, A. P., Jiménez, L. P., Barrios, V., & Ferreiro, E. A. (2014). Peptides and food intake. *Frontiers in Endocrinology*, 5(APR). https://doi.org/10.3389/FENDO.2014.00058

CROWLEY, W. R., PARKER, S. L., STRONG, W. E. A., SPINOLO, L. H., & GROSVENOR, C. E. (1992). Neurotransmitter and neurohormonal regulation of oxytocin secretion in lactation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 652(1), 286–302. https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.1992.TB34362.X

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). https://doi.org/10.3390/BRAINSCI12060687

Cull-Candy, S., Brickley, S., & Farrant, M. (2001). NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 11(3), 327–335. https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00215-4

Cummings, D. E., & Overduin, J. (2007). Gastrointestinal regulation of food intake. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(1), 13–23. https://doi.org/10.1172/JCI30227

Curran, T., Miller, A. D., Zokas, L., & Verma, I. M. (1984). Viral and cellular fos proteins: a comparative analysis. *Cell*, 36(2), 259–268. https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90219-8

Danbolt, N. C. (2001). Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology*, 65(1), 1–105. https://doi.org/10.1016/S0301-0082(00)00067-8

Date, Y., Ueta, Y., Yamashita, H., Yamaguchi, H., Matsukura, S., Kangawa, K., … Nakazato, M. (1999). Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(2), 748–753. https://doi.org/10.1073/PNAS.96.2.748

De Backer, M. W. A., La Fleur, S. E., Brans, M. A. D., Van Rozen, A. J., Luijendijk, M. C. M., Merkestein, M., … Adan, R. A. H. (2011). Melanocortin receptor-mediated effects on obesity are distributed over specific hypothalamic regions. *International Journal of Obesity (2005)*, 35(5), 629–641. https://doi.org/10.1038/IJO.2010.169

De Cian, M. C., Gregoire, E. P., Le Rolle, M., Lachambre, S., Mondin, M., Bell, S., … Chaboissier, M. C. (2020). R-spondin2 signaling is required for oocyte-driven intercellular communication and follicular growth. *Cell Death & Differentiation 2020 27:10*, 27(10), 2856–2871. https://doi.org/10.1038/s41418-020-0547-7

De Lau, W. B. M., Snel, B., & Clevers, H. C. (2012). The R-spondin protein family. *Genome Biology*, 13(3), 242. https://doi.org/10.1186/GB-2012-13-3-242

De Lau, W., Barker, N., Low, T. Y., Koo, B. K., Li, V. S. W., Teunissen, H., … Clevers, H. (2011). Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature*, 476(7360), 293–297. https://doi.org/10.1038/NATURE10337

Diering, G. H., & Huganir, R. L. (2018). The AMPA Receptor Code of Synaptic Plasticity. *Neuron*, 100(2), 314–329.

https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2018.10.018
Doherty, F. C., & Sladek, C. D. (2011). NMDA receptor subunit expression in the supraoptic nucleus of adult rats: Dominance of NR2B and NR2D. *Brain Research*, 1388, 89–99. https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2011.03.015
Doherty, L., & Sanjay, A. (2020). LGRs in Skeletal Tissues: An Emerging Role for Wnt-Associated Adult Stem Cell Markers in Bone. *JBMR Plus*, 4(7), e10380. https://doi.org/10.1002/JBM4.10380
Drucker, D. J. (2007). The role of gut hormones in glucose homeostasis. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(1), 24–32. https://doi.org/10.1172/JCI30076
Dun, S. L., Brailoiu, G. C., Tica, A. A., Yang, J., Chang, J. K., Brailoiu, E., & Dun, N. J. (2010). Neuronostatin is co-expressed with somatostatin and mobilizes calcium in cultured rat hypothalamic neurons. *Neuroscience*, 166(2), 455–463. https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2009.12.059
Dyer, C. J., Touchette, K. J., Carroll, J. A., Allee, G. L., & Matteri, R. L. (1999). Cloning of porcine prepro-orexin cDNA and effects of an intramuscular injection of synthetic porcine orexin-B on feed intake in young pigs. *Domestic Animal Endocrinology*, 16(3), 145–148. https://doi.org/10.1016/S0739-7240(99)00011-9
Erecińska, M., & Silver, I. A. (1990). Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Progress in Neurobiology*, 35(4), 245–296. https://doi.org/10.1016/0301-0082(90)90013-7
Eriksson, M., Ceccatelli, S., Uvnäs-Moberg, K., Iadarola, M., & Hökfelt, T. (1996). Expression of Fos-related antigens, oxytocin, dynorphin and galanin in the paraventricular and supraoptic nuclei of lactating rats. *Neuroendocrinology*, 63(4), 356–367. https://doi.org/10.1159/000126976
Erreger, K., Chen, P. E., Wyllie, D. J. A., & Traynelis, S. F. (2004). Glutamate receptor gating. *Critical Reviews in Neurobiology*, 16(3), 187–224. https://doi.org/10.1615/CRITREVNEUROBIOL.V16.I3.10
Eyigor, O., Centers, A., & Jennes, L. (2001). Distribution of ionotropic glutamate receptor subunit mRNAs in the rat hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology*, 434(1), 101–124. https://doi.org/10.1002/CNE.1167
Eyigor, O., Minbay, Z., & Cavusoglu, I. (2010). Activation of orexin neurons through non-NMDA glutamate receptors evidenced by c-Fos immunohistochemistry. *Endocrine*, 37(1), 167–172. https://doi.org/10.1007/S12020-009-9284-X
Eyigor, O., Minbay, Z., & Kafa, I. M. (2012). Glutamate and orexin neurons. *Vitamins and Hormones*, 89, 209–222. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394623-2.00011-1
Eyigor, O., Minbay, Z., Cavusoglu, I., & Jennes, L. (2005). Localization of kainate receptor subunit GluR5-immunoreactive cells in the rat hypothalamus. *Molecular Brain Research*, 136(1–2), 38–44. https://doi.org/10.1016/J.MOLBRAINRES.2005.01.015
Fekete, C., Wittmann, G., Liposits, Z., & Lechan, R. M. (2004). Origin of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART)-immunoreactive innervation of the hypothalamic paraventricular nucleus. *The Journal of Comparative Neurology*, 469(3), 340–350. https://doi.org/10.1002/CNE.10999
Fenselau, H., Campbell, J. N., Verstegen, A. M. J., Madara, J. C., Xu, J., Shah, B. P., … Lowell, B. B. (2017). A rapidly acting glutamatergic ARC→PVH satiety circuit postsynaptically regulated by α-MSH. *Nature Neuroscience*, 20(1), 42–

51. https://doi.org/10.1038/NN.4442
Ferguson, A. V., & Samson, W. K. (2003). The orexin/hypocretin system: A critical regulator of neuroendocrine and autonomic function. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 24(3), 141–150. https://doi.org/10.1016/S0091-3022(03)00028-1
Flavell, S. W., & Greenberg, M. E. (2008). Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. *Annual Review of Neuroscience*, 31, 563–590. https://doi.org/10.1146/ANNUREV.NEURO.31.060407.125631
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), 563–579. https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2008.07.054
Fort, P., Salvert, D., Hanriot, L., Jego, S., Shimizu, H., Hashimoto, K., … Luppi, P. H. (2008). The satiety molecule nesfatin-1 is co-expressed with melanin concentrating hormone in tuberal hypothalamic neurons of the rat. *Neuroscience*, 155(1), 174–181. https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2008.05.035
Frerking, M., & Nicoll, R. A. (2000). Synaptic kainate receptors. *Current Opinion in Neurobiology*, 10(3), 342–351. https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00094-5
Garfield, A. S., Li, C., Madara, J. C., Shah, B. P., Webber, E., Steger, J. S., … Lowell, B. B. (2015). A neural basis for melanocortin-4 receptor-regulated appetite. *Nature Neuroscience*, 18(6), 863–871. https://doi.org/10.1038/NN.4011
Gavello, D., Carbone, E., & Carabelli, V. (2016). Leptin-mediated ion channel regulation: PI3K pathways, physiological role, and therapeutic potential. *Channels*, 10(4), 282–296. https://doi.org/10.1080/19336950.2016.1164373
Gehlert, D. R. (1999). Role of hypothalamic neuropeptide Y in feeding and obesity. *Neuropeptides*, 33(5), 329–338. https://doi.org/10.1054/NPEP.1999.0057
Gereau, R. W. ., & Swanson, G. T. . (2008). *The glutamate receptors*. 576.
Glass, D. A., Bialek, P., Ahn, J. D., Starbuck, M., Patel, M. S., Clevers, H., … Karsenty, G. (2005). Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Developmental Cell*, 8(5), 751–764. https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2005.02.017
Glenn Stanley, B., Ha, L. H., Spears, L. C., & Dee, M. G. (1993). Lateral hypothalamic injections of glutamate, kainic acid,d,l-α-amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazole propionic acid or N-methyl-d-aspartic acid rapidly elicit intense transient eating in rats. *Brain Research*, 613(1), 88–95. https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90458-Y
Glinka, A., Dolde, C., Kirsch, N., Huang, Y. L., Kazanskaya, O., Ingelfinger, D., … Niehrs, C. (2011). LGR4 and LGR5 are R-spondin receptors mediating Wnt/β-catenin and Wnt/PCP signalling. *EMBO Reports*, 12(10), 1055–1061. https://doi.org/10.1038/EMBOR.2011.175
Goebel, M., Stengel, A., Wang, L., Lambrecht, N. W. G., & Taché, Y. (2009). Nesfatin-1 immunoreactivity in rat brain and spinal cord autonomic nuclei. *Neuroscience Letters*, 452(3), 241–246. https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2009.01.064
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

Gok-Yurtseven, D., Kafa, I. M., Minbay, Z., & Eyigor, O. (2019). Glutamatergic activation of A1 and A2 noradrenergic neurons in the rat brain stem. *CROATIAN MEDICAL JOURNAL*, 60(4), 352–360. https://doi.org/10.3325/CMJ.2019.60.352

Goldsmith, P. C., Thind, K. K., Perera, A. D., & Plant, T. M. (1994). Glutamate-immunoreactive neurons and their gonadotropin-releasing hormone-neuronal interactions in the monkey hypothalamus. *Endocrinology*, 134(2), 858–868. https://doi.org/10.1210/ENDO.134.2.7905410

Gomori, A., Ishihara, A., Ito, M., Mashiko, S., Matsushita, H., Yumoto, M., … Kanatani, A. (2003). Chronic intracerebroventricular infusion of MCH causes obesity in mice. Melanin-concentrating hormone. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 284(3). https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00350.2002

Gong, X., Carmon, K. S., Lin, Q., Thomas, A., Yi, J., & Liu, Q. (2012). LGR6 is a high affinity receptor of R-spondins and potentially functions as a tumor suppressor. *PloS One*, 7(5). https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0037137

Gong, X., Carmon, K. S., Lin, Q., Thomas, A., Yi, J., & Liu, Q. (2012). LGR6 is a high affinity receptor of R-spondins and potentially functions as a tumor suppressor. *PloS One*, 7(5). https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0037137

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), 90–99. https://doi.org/10.1111/JNC.12066

Gök Yurtseven, D., Topal, G., Zehra MİNBAY, F., Eyigör, Ö., Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, B., & ve Embriyoloji Anabilim Dalı, H. (2021). Hipotalamusta İyonotropik Glutamat Reseptör Ekspresyonu: İmmunohistokimyasal Lokalizasyon Çalışması. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 47(2), 255–264. https://doi.org/10.32708/UUTFD.973523

Greicius, G., Kabiri, Z., Sigmundsson, K., Liang, C., Bunte, R., Singh, M. K., & Virshup, D. M. (2018). PDGFRα+ pericryptal stromal cells are the critical source of Wnts and RSPO3 for murine intestinal stem cells in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(14), E3173–E3181. https://doi.org/10.1073/PNAS.1713510115

Grossmann, M., Weintraub, B. D., & Szkudlinski, M. W. (1997). Novel insights into the molecular mechanisms of human thyrotropin action: structural, physiological, and therapeutic implications for the glycoprotein hormone family. *Endocrine Reviews*, 18(4), 476–501. https://doi.org/10.1210/EDRV.18.4.0305

Guan, X., Duan, Y., Zeng, Q., Pan, H., Qian, Y., Li, D., … Liu, M. (2014). Lgr4 protein deficiency induces ataxia-like phenotype in mice and impairs long term depression at cerebellar parallel fiber-Purkinje cell synapses. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(38), 26492–26504. https://doi.org/10.1074/JBC.M114.564138

Guan, X., Karpen, H. E., Stephens, J., Bukowski, J. T., Niu, S., Zhang, G., … Burrin, D. G. (2006). GLP-2 receptor localizes to enteric neurons and endocrine cells expressing vasoactive peptides and mediates increased blood flow. *Gastroenterology*, 130(1), 150–164. https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2005.11.005

Güemes, A., & Georgiou, P. (2018). Review of the role of the nervous system in glucose homoeostasis and future perspectives towards the management of diabetes. *Bioelectronic Medicine 2018 4:1*, 4(1), 1–18. https://doi.org/10.1186/S42234-018-0009-4

Gynther, M., Petsalo, A., Hansen, S. H., Bunch, L., & Pickering, D. S. (2015). Blood–Brain Barrier Permeability and Brain Uptake Mechanism of Kainic Acid and Dihydrokainic Acid. *Neurochemical Research*, 40(3), 542–549. https://doi.org/10.1007/S11064-014-1499-4/TABLES/3

Hahn, T. M., Breininger, J. F., Baskin, D. G., & Schwartz, M. W. (1998). Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nature Neuroscience*, 1(4), 271–272. https://doi.org/10.1038/1082

Halawi, H., Camilleri, M., Acosta, A., Vazquez-Roque, M., Oduyebo, I., Burton, D., … Zinsmeister, A. R. (2017). Relationship of gastric emptying or accommodation with satiation, satiety, and postprandial symptoms in health. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 313(5), G442–G447. https://doi.org/10.1152/AJPGI.00190.2017

Han, X. H., Jin, Y. R., Seto, M., & Yoon, J. K. (2011). A WNT/β-Catenin Signaling Activator, R-spondin, Plays Positive Regulatory Roles during Skeletal Myogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(12), 10649. https://doi.org/10.1074/JBC.M110.169391

Hankenson, K. D., Sweetwyne, M. T., Shitaye, H., & Posey, K. L. (2010). Thrombospondins and novel TSR-containing proteins, R-spondins, regulate bone formation and remodeling. *Current Osteoporosis Reports*, 8(2), 68–76. https://doi.org/10.1007/S11914-010-0017-0

Hankir, M. K., Parkinson, J. R., Bloom, S. R., & Bell, J. D. (2012). The effects of glutamate receptor agonists and antagonists on mouse hypothalamic and hippocampal neuronal activity shown through manganese enhanced MRI. *NeuroImage*, 59(2), 968–978. https://doi.org/10.1016/J.NEUROIMAGE.2011.08.063

Hansen, K. B., Wollmuth, L. P., Bowie, D., Furukawa, H., Menniti, F. S., Sobolevsky, A. I., … Traynelis, S. F. (2021). Structure, Function, and Pharmacology of Glutamate Receptor Ion Channels. *Pharmacological Reviews*, 73(4), 1469–1658. https://doi.org/10.1124/PHARMREV.120.000131/ASSET/F106DF58-F3B5-4475-B081-1595A1180FA3/MAIN.ASSETS/GR14.JPG

Hao, H. X., Xie, Y., Zhang, Y., Zhang, O., Oster, E., Avello, M., … Cong, F. (2012). ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. *Nature*, 485(7397), 195–202. https://doi.org/10.1038/NATURE11019

Harnack, C., Berger, H., Antanaviciute, A., Vidal, R., Sauer, S., Simmons, A., … Sigal, M. (2019). R-spondin 3 promotes stem cell recovery and epithelial regeneration in the colon. *Nature Communications 2019 10:1*, 10(1), 1–15. https://doi.org/10.1038/s41467-019-12349-5

He, Z., Zhang, J., Ma, J., Zhao, L., Jin, X., & Li, H. (2023). R-spondin family biology and emerging linkages to cancer. *Annals of Medicine*, 55(1), 428–446. https://doi.org/10.1080/07853890.2023.2166981

Heinrichs, S. C., Menzaghi, F., & Koob, G. F. (1998). Neuropeptide Y-induced feeding and its control. *Vitamins and Hormones*, 54(C), 51–66. https://doi.org/10.1016/S0083-6729(08)60921-8

Heisler, L. K., & Lam, D. D. (2017). An appetite for life: brain regulation of hunger

and satiety. *Current Opinion in Pharmacology*, 37, 100–106. https://doi.org/10.1016/J.COPH.2017.09.002

Herguedas, B., García-Nafría, J., Cais, O., Fernández-Leiro, R., Krieger, J., Ho, H., & Greger, I. H. (2016). Structure and organization of heteromeric AMPA-type glutamate receptors. *Science (New York, N.Y.)*, 352(6285). https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAD3873

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. *J. Comp. Neurol*, 422, 352–362. https://doi.org/10.1002/1096-9861(20000703)422:3

Hetherington, A. W., & Ranson, S. W. (1983). Nutrition Classics. The Anatomical Record, Volume 78, 1940: Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *Nutrition Reviews*, 41(4), 124–127. https://doi.org/10.1111/J.1753-4887.1983.TB07169.X

Hettes, S. R., Gonzaga, J., Heyming, T. W., Perez, S., Wolfsohn, S., & Stanley, B. G. (2003). Dual roles in feeding for AMPA/kainate receptors: receptor activation or inactivation within distinct hypothalamic regions elicits feeding behavior. *Brain Research*, 992(2), 167–178. https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2003.08.032

Hettes, S. R., Gonzaga, W. J., Heyming, T. W., Nguyen, J. K., Perez, S., & Stanley, B. G. (2010). Stimulation of lateral hypothalamic AMPA receptors may induce feeding in rats. *Brain Research*, 1346, 112–120. https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2010.05.008

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), 173–213. https://doi.org/10.1006/FRNE.1993.1006

Hollmann, M., & Heinemann, S. (1994). Cloned glutamate receptors. *Annual Review of Neuroscience*, 17, 31–108. https://doi.org/10.1146/ANNUREV.NE.17.030194.000335

Horvath, T. L., Andrews, Z. B., & Diano, S. (2009). Fuel utilization by hypothalamic neurons: roles for ROS. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 20(2), 78–87. https://doi.org/10.1016/J.TEM.2008.10.003

Howe, J. R. (1996). Homomeric and heteromeric ion channels formed from the kainate-type subunits GluR6 and KA2 have very small, but different, unitary conductances. *Journal of Neurophysiology*, 76(1), 510–519. https://doi.org/10.1152/JN.1996.76.1.510

Hsu, S. Y., Liang, S. G., & Hsueh, A. J. W. (1998). Characterization of two LGR genes homologous to gonadotropin and thyrotropin receptors with extracellular leucine-rich repeats and a G protein-coupled, seven-transmembrane region. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 12(12), 1830–1845. https://doi.org/10.1210/MEND.12.12.0211

Huettner, J. E. (2001). Kainate receptors: knocking out plasticity. *Trends in Neurosciences*, 24(7), 365–366. https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)01830-0

Huettner, J. E. (2003). Kainate receptors and synaptic transmission. *Progress in Neurobiology*, 70(5), 387–407. https://doi.org/10.1016/S0301-0082(03)00122-9

Hunter, R. G., Philpot, K., Vicentic, A., Dominguez, G., Hubert, G. W., & Kuhar, M. J. (2004). CART in feeding and obesity. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 15(9), 454–459. https://doi.org/10.1016/J.TEM.2004.09.010

Huszar, D., Lynch, C. A., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J. H., Fang, Q., Berkemeier, L. R., … Frank, L. (1997). Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell*, 88(1), 131–141. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81865-6

Isaac, J. T. R., Mellor, J., Hurtado, D., & Roche, K. W. (2004). Kainate receptor trafficking: physiological roles and molecular mechanisms. *Pharmacology & Therapeutics*, 104(3), 163–172. https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2004.08.006

Ito, M., Ishihara, A., Gomori, A., Egashira, S., Matsushita, H., Mashiko, S., … Kanatani, A. (2009). Melanin-concentrating hormone 1-receptor antagonist suppresses body weight gain correlated with high receptor occupancy levels in diet-induced obesity mice. *European Journal of Pharmacology*, 624(1–3), 77–83. https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2009.10.004

Jais, A., & Brüning, J. C. (2022). Arcuate Nucleus-Dependent Regulation of Metabolism-Pathways to Obesity and Diabetes Mellitus. *Endocrine Reviews*, 43(2), 314–328. https://doi.org/10.1210/ENDREV/BNAB025

Javitt, D. C., Balla, A., Burch, S., Suckow, R., Xie, S., & Sershen, H. (2004). Reversal of phencyclidine-induced dopaminergic dysregulation by N-methyl-D-aspartate receptor/glycine-site agonists. *Neuropsychopharmacology*, 29(2), 300–307. https://doi.org/10.1038/SJ.NPP.1300313

Jin, Y. R., & Yoon, J. K. (2012). The R-spondin family of proteins: emerging regulators of WNT signaling. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(12), 2278. https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2012.09.006

Joost, P., & Methner, A. (2002). Phylogenetic analysis of 277 human G-protein-coupled receptors as a tool for the prediction of orphan receptor ligands. *Genome Biology*, 3(11). https://doi.org/10.1186/GB-2002-3-11-RESEARCH0063

Joshi, N., McAree, M., & Chandler, D. (2020). Corticotropin releasing factor modulates excitatory synaptic transmission. *Vitamins and Hormones*, 114, 53–69. https://doi.org/10.1016/BS.VH.2020.04.003

Kamata, T., Katsube, K. I., Michikawa, M., Yamada, M., Takada, S., & Mizusawa, H. (2004). R-spondin, a novel gene with thrombospondin type 1 domain, was expressed in the dorsal neural tube and affected in Wnts mutants. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1676(1), 51–62. https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2003.10.009

Kamiya, H. (2002). Kainate receptor-dependent presynaptic modulation and plasticity. *Neuroscience Research*, 42(1), 1–6. https://doi.org/10.1016/S0168-0102(01)00303-0

Karakas, E., Simorowski, N., & Furukawa, H. (2011). Subunit arrangement and phenylethanolamine binding in GluN1/GluN2B NMDA receptors. *Nature*, 475(7355), 249–253. https://doi.org/10.1038/NATURE10180

Kato, S., Matsubara, M., Matsuo, T., Mohri, Y., Kazama, I., Hatano, R., … Nishimori, K. (2006). Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor-4 (LGR4, Gpr48) is essential for renal development in mice. *Nephron. Experimental Nephrology*, 104(2). https://doi.org/10.1159/000093999

Kawashima, T., Okuno, H., & Bito, H. (2014). A new era for functional labeling of neurons: activity-dependent promoters have come of age. *Frontiers in Neural Circuits*, 8(APR). https://doi.org/10.3389/FNCIR.2014.00037

Kazanskaya, O., Glinka, A., del Barco Barrantes, I., Stannek, P., Niehrs, C., & Wu,

W. (2004). R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for Xenopus myogenesis. *Developmental Cell*, 7(4), 525–534. https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2004.07.019

Kazanskaya, O., Ohkawara, B., Heroult, M., Wu, W., Maltry, N., Augustin, H. G., & Niehrs, C. (2008). The Wnt signaling regulator R-spondin 3 promotes angioblast and vascular development. *Development (Cambridge, England)*, 135(22), 3655–3664. https://doi.org/10.1242/DEV.027284

Kennedy, G. C. (1953). The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 140(901), 578–596. https://doi.org/10.1098/RSPB.1953.0009

Kew, J. N. C., & Kemp, J. A. (2005). Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology*, 179(1), 4–29. https://doi.org/10.1007/S00213-005-2200-Z

Khalili, S., Shekari Khaniani, M., Afkhami, F., & Mansoori Derakhshan, S. (2017). NUCB2/Nesfatin-1: A Potent Meal Regulatory Hormone and its Role in Diabetes. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 18(2), 105–109. https://doi.org/10.1016/J.EJMHG.2016.10.003

Kim, K. A., Zhao, J., Andarmani, S., Kakitani, M., Oshima, T., Binnerts, M. E., … Funk, W. D. (2006). R-Spondin proteins: a novel link to beta-catenin activation. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 5(1), 23–26. https://doi.org/10.4161/CC.5.1.2305

Kishi, T., Aschkenasi, C. J., Lee, C. E., Mountjoy, K. G., Saper, C. B., & Elmquist, J. K. (2003). Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 457(3), 213–235. https://doi.org/10.1002/CNE.10454

Knapp, D. J., Braun, C. J., Duncan, G. E., Qian, Y., Fernandes, A., Crews, F. T., & Breese, G. R. (2001). Regional specificity of ethanol and NMDA action in brain revealed with FOS-like immunohistochemistry and differential routes of drug administration. *Wiley Online Library*, 25(11), 1662–1672. https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2001.tb02173.x

Knight, M. N., Karuppaiah, K., Lowe, M., Mohanty, S., Zondervan, R. L., Bell, S., … Hankenson, K. D. (2018). R-spondin-2 is a Wnt agonist that regulates osteoblast activity and bone mass. *Bone Research*, 6(1), 24. https://doi.org/10.1038/S41413-018-0026-7

Kocer, A., Pinheiro, I., Pannetier, M., Renault, L., Parma, P., Radi, O., … Pailhoux, E. (2008). R-spondin1 and FOXL2 act into two distinct cellular types during goat ovarian differentiation. *BMC Developmental Biology*, 8, 36. https://doi.org/10.1186/1471-213X-8-36

Kocoglu, S. S., Cakir, C., Minbay, Z., & Eyigor, O. (2022). Expression of the ionotropic glutamate receptors on neuronostatin neurons in the periventricular nucleus of the hypothalamus. *Folia Morphologica*, 81(1), 13–19. https://doi.org/10.5603/FM.A2020.0145

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), 379–386. https://doi.org/10.5603/FM.A2021.0034

Kocoglu, S. S., Yurtseven, D. G., Cakir, C., Minbay, Z., & Eyigor, O. (2020). Glutamatergic Activation of Neuronostatin Neurons in the Periventricular Nucleus of the Hypothalamus. *Brain Sciences*, 10(4), 217.

https://doi.org/10.3390/BRAINSCI10040217
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), 1295–1301. https://doi.org/10.1210/EN.2007-1276
Koizumi, M., Oyama, K., Yamakami, Y., Kida, T., Satoh, R., Kato, S., … Nishimori, K. (2015). Lgr4 controls specialization of female gonads in mice. *Biology of Reproduction*, 93(4). https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.114.123638
Kong, D., Vong, L., Parton, L. E., Ye, C., Tong, Q., Hu, X., … Lowell, B. B. (2010). Glucose stimulation of hypothalamic MCH neurons involves K(ATP) channels, is modulated by UCP2, and regulates peripheral glucose homeostasis. *Cell Metabolism*, 12(5), 545–552. https://doi.org/10.1016/J.CMET.2010.09.013
Koo, B. K., Spit, M., Jordens, I., Low, T. Y., Stange, D. E., Van De Wetering, M., … Clevers, H. (2012). Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. *Nature*, 488(7413), 665–669. https://doi.org/10.1038/NATURE11308
Köles, L., Wirkner, K., & Illes, P. (2001). Modulation of ionotropic glutamate receptor channels. *Neurochemical Research*, 26(8–9), 925–932. https://doi.org/10.1023/A:1012380416876
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 (2005)*, 36(12), 1514–1521. https://doi.org/10.1038/IJO.2012.2
Krashes, M. J., Shah, B. P., Madara, J. C., Olson, D. P., Strochlic, D. E., Garfield, A. S., … Lowell, B. B. (2014). An excitatory paraventricular nucleus to AgRP neuron circuit that drives hunger. *Nature*, 507(7491), 238–242. https://doi.org/10.1038/NATURE12956
Kristensen, P., Judge, M. E., Thim, L., Ribel, U., Christjansen, K. N., Wulff, B. S., … Hastrup, S. (1998). Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature*, 393(6680), 72–76. https://doi.org/10.1038/29993
Krystal, J. H., Karper, L. P., Seibyl, J. P., Freeman, G. K., Delaney, R., Bremner, J. D., … Charney, D. S. (1994). Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Archives of General Psychiatry*, 51(3), 199–214. https://doi.org/10.1001/ARCHPSYC.1994.03950030035004
Kubo, M., & Ito, E. (2004). Structural dynamics of an ionotropic glutamate receptor. *Proteins*, 56(3), 411–419. https://doi.org/10.1002/PROT.20154
Kuiken, S. D., Samsom, M., Camilleri, M., Mullan, B. P., Burton, D. D., Kost, L. J., … O'Connor, M. K. (1999). Development of a test to measure gastric accommodation in humans. *The American Journal of Physiology*, 277(6). https://doi.org/10.1152/AJPGI.1999.277.6.G1217
Kumar, J., Schuck, P., & Mayer, M. L. (2011). Structure and Assembly Mechanism for Heteromeric Kainate Receptors. *Neuron*, 71(2), 319–331. https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2011.05.038/ATTACHMENT/87CCB8B6-E5AA-410C-A0D5-9C9E4AD80B17/MMC3.MOV
Laburthe, M., & Voisin, T. (2012). The orexin receptor OX(1)R in colon cancer: a promising therapeutic target and a new paradigm in G protein-coupled receptor signalling through ITIMs. *British Journal of Pharmacology*, 165(6), 1678–1687.

https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.2011.01510.X
Larsen, M. H., Hay-Schmidt, A., Rønn, L. C. B., & Mikkelsen, J. D. (2008). Temporal expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA in the rat hippocampus after treatment with selective and mixed monoaminergic antidepressants. *European Journal of Pharmacology*, 578(2–3), 114–122. https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2007.08.050
Larsen, P. J., & Hunter, R. G. (2006). The role of CART in body weight homeostasis. *Peptides*, 27(8), 1981–1986. https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2005.11.027
Lau, J., & Herzog, H. (2014). CART in the regulation of appetite and energy homeostasis. *Frontiers in Neuroscience*, 8(SEP). https://doi.org/10.3389/FNINS.2014.00313
Lee, B., Koo, J., Jun, J. Y., Gavrilova, O., Lee, Y., Seo, A. Y., … Yanovski, J. A. (2016). A mouse model for a partially inactive obesity-associated human MC3R variant. *Nature Communications*, 7. https://doi.org/10.1038/NCOMMS10522
Lerma, J. (2003). Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission. *Nature Reviews. Neuroscience*, 4(6), 481–495. https://doi.org/10.1038/NRN1118
Lerma, J., Paternain, A. V., Rodríguez-Moreno, A., & López-Garciáa, J. C. (2001). Molecular physiology of kainate receptors. *Physiological Reviews*, 81(3), 971–998. https://doi.org/10.1152/PHYSREV.2001.81.3.971
Lester, R. A. J., Clements, J. D., Westbrook, G. L., & Jahr, C. E. (1990). Channel kinetics determine the time course of NMDA receptor-mediated synaptic currents. *Nature*, 346(6284), 565–567. https://doi.org/10.1038/346565A0
Levin, G., Zuber, S. M., Squillaro, A. I., Sogayar, M. C., Grikscheit, T. C., & Carreira, A. C. O. (2020). R-Spondin 1 (RSPO1) Increases Mouse Intestinal Organoid Unit Size and Survival in vitro and Improves Tissue-Engineered Small Intestine Formation in vivo. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. https://doi.org/10.3389/FBIOE.2020.00476
Levine, A. S., & Billington, C. J. (1989). Opioids. Are they regulators of feeding? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 575(1), 209–220. https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.1989.TB53244.X
Li, H. Y., Hwang, H. W., & Hu, Y. H. (2002). Functional characterizations of cocaine- and amphetamine-regulated transcript mRNA expression in rat hypothalamus. *Neuroscience Letters*, 323(3), 203–206. https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)00151-9
Li, J. Y., Chai, B., Zhang, W., Fritze, D. M., Zhang, C., & Mulholland, M. W. (2014). LGR4 and its ligands, R-spondin 1 and R-spondin 3, regulate food intake in the hypothalamus of male rats. *Endocrinology*, 155(2), 429–440. https://doi.org/10.1210/EN.2013-1550
Li, J. Y., Kuick, R., Thompson, R. C., Misek, D. E., Lai, Y. M., Liu, Y. Q., … Gantz, I. (2005). Arcuate nucleus transcriptome profiling identifies ankyrin repeat and suppressor of cytokine signalling box-containing protein 4 as a gene regulated by fasting in central nervous system feeding circuits. *Journal of Neuroendocrinology*, 17(6), 394–404. https://doi.org/10.1111/J.1365-2826.2005.01317.X
Li, J. Y., Wu, X., Lee, A., Zhou, S. Y., & Owyang, C. (2019). Altered R-spondin 1/CART neurocircuit in the hypothalamus contributes to hyperphagia in diabetes. *Journal of Neurophysiology*, 121(3), 928–939. https://doi.org/10.1152/JN.00413.2018

Li, J., Hu, Z., & De Lecea, L. (2013). The hypocretins/orexins: integrators of multiple physiological functions. *British Journal of Pharmacology*, 171(2), 332. https://doi.org/10.1111/BPH.12415

Li, Q. C., Wang, H. Y., Chen, X., Guan, H. Z., & Jiang, Z. Y. (2010). Fasting plasma levels of nesfatin-1 in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus and the nutrient-related fluctuation of nesfatin-1 level in normal humans. *Regulatory Peptides*, 159(1–3), 72–77. https://doi.org/10.1016/J.REGPEP.2009.11.003

Li, S., Liu, Q., Xiao, L., Chen, H., Li, G., Zhang, Y., & Lin, H. (2016). Molecular cloning and functional characterization of spexin in orange-spotted grouper (Epinephelus coioides). *Biochemistry & Molecular Biology*, 196–197, 85–91. https://doi.org/10.1016/J.CBPB.2016.02.009

Li, Z., Zhang, W., & Mulholland, M. W. (2015). LGR4 and Its Role in Intestinal Protection and Energy Metabolism. *Frontiers in Endocrinology*, 6. https://doi.org/10.3389/FENDO.2015.00131

Lin, X., Volkoff, H., Narnaware, Y., Bernier, N. J., Peyon, P., & Peter, R. E. (2000). Brain regulation of feeding behavior and food intake in fish. *A Molecular and Integrative Physiology*, 126(4), 415–434. https://doi.org/10.1016/S1095-6433(00)00230-0

Liu, J., Dimitrov, S., Sawangjit, A., Born, J., Ehrlich, I., & Hallschmid, M. (2021). Short-term high-fat feeding induces a reversible net decrease in synaptic AMPA receptors in the hypothalamus. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 87, 108516. https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2020.108516

Liu, S., Yin, Y., Yu, R., Li, Y., & Zhang, W. (2018). R-spondin3-LGR4 signaling protects hepatocytes against DMOG-induced hypoxia/reoxygenation injury through activating β-catenin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 499(1), 59–65. https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2018.03.126

Locke, A. E., Kahali, B., Berndt, S. I., Justice, A. E., Pers, T. H., Day, F. R., … Econs, M. J. (2015). Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature 2015 518:7538*, 518(7538), 197–206. https://doi.org/10.1038/nature14177

Lomeli, H., Wisden, W., Köhler, M., Keinänen, K., Sommer, B., & Seeburg, P. H. (1992). High-affinity kainate and domoate receptors in rat brain. *FEBS Letters*, 307(2), 139–143. https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80753-4

Lubkin, M., & Stricker-Krongrad, A. (1998). Independent feeding and metabolic actions of orexins in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 253(2), 241–245. https://doi.org/10.1006/BBRC.1998.9750

Ludwig, D. S., Tritos, N. A., Mastaitis, J. W., Kulkarni, R., Kokkotou, E., Elmquist, J., … Maratos-Flier, E. (2001). Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 107(3), 379–386. https://doi.org/10.1172/JCI10660

Lv, S., Zhou, Y., Feng, Y., Zhang, X., Wang, X., Yang, Y., & Wang, X. (2020). Peripheral Spexin Inhibited Food Intake in Mice. *International Journal of Endocrinology*, 2020. https://doi.org/10.1155/2020/4913785

Ma, A., Bai, J., He, M., & Wong, A. O. L. (2018). Spexin as a neuroendocrine signal with emerging functions. *General and Comparative Endocrinology*, 265, 90–96. https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2018.01.015

Macdermott, A. B., Mayer, M. L., Westbrook, G. L., Smith, S. J., & Barker, J. L. (1986). NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration

in cultured spinal cord neurones. *Nature*, 321(6069), 519–522. https://doi.org/10.1038/321519A0

MacDonald, M. C., Robertson, H. A., & Wilkinson, M. (1990). Expression of c-fos protein by N-methyl-D-aspartic acid in hypothalamus of immature female rats: blockade by MK-801 or neonatal treatment with monosodium glutamate. *Developmental Brain Research*, 56(2), 294–297. https://doi.org/10.1016/0165-3806(90)90096-H

MacDonald, M. C., Robertson, H. A., & Wilkinson, M. (1993). Age- and dose-related NMDA induction of Fos-like immunoreactivity and c-fos mRNA in the arcuate nucleus of immature female rats. *Developmental Brain Research*, 73(2), 193–198. https://doi.org/10.1016/0165-3806(93)90138-Z

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), 355–365. https://doi.org/10.1016/J.CMET.2009.09.002

Malarkey, E. B., & Parpura, V. (2008). Mechanisms of glutamate release from astrocytes. *Neurochemistry International*, 52(1), 142–154. https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2007.06.005

Malinow, R., & Malenka, R. C. (2002). AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annual Review of Neuroscience*, 25, 103–126. https://doi.org/10.1146/ANNUREV.NEURO.25.112701.142758

Mariam, Z., & Niazi, S. K. (2024). Glucagon-like peptide agonists: A prospective review. *Endocrinology, Diabetes & Metabolism*, 7(1). https://doi.org/10.1002/EDM2.462

Marsh, D. J., Weingarth, D. T., Novi, D. E., Chen, H. Y., Trumbauer, M. E., Chen, A. S., … Qian, S. (2002). Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(5), 3240–3245. https://doi.org/10.1073/PNAS.052706899

Martin, L. J., Blackstone, C. D., Levey, A. I., Huganir, R. L., & Price, D. L. (1993). AMPA glutamate receptor subunits are differentially distributed in rat brain. *Neuroscience*, 53(2), 327–358. https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90199-P

Mayer, M. L. (2006). Glutamate receptors at atomic resolution. *Nature*, 440(7083), 456–462. https://doi.org/10.1038/NATURE04709

Mayer, M. L. (2016). Structural biology of glutamate receptor ion channel complexes. *Current Opinion in Structural Biology*, 41, 119–127. https://doi.org/10.1016/J.SBI.2016.07.002

Mayer, M. L., Westbrook, G. L., & Guthrie, P. B. (1984). Voltage-dependent block by Mg2+ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature*, 309(5965), 261–263. https://doi.org/10.1038/309261A0

Mazerbourg, S., Bouley, D. M., Sudo, S., Klein, C. A., Zhang, J. V., Kawamura, K., … Hsueh, A. J. W. (2004). Leucine-rich repeat-containing, G protein-coupled receptor 4 null mice exhibit intrauterine growth retardation associated with embryonic and perinatal lethality. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 18(9), 2241–2254. https://doi.org/10.1210/ME.2004-0133

McDonald, T., Wang, R., Bailey, W., Xie, G., Chen, F., Caskey, C. T., & Liu, Q. (1998). Identification and cloning of an orphan G protein-coupled receptor of the glycoprotein hormone receptor subfamily. *Biochemical and Biophysical*

Research Communications, 247(2), 266–270. https://doi.org/10.1006/BBRC.1998.8774

McIlwraith, E. K., Loganathan, N., & Belsham, D. D. (2018). Phoenixin Expression Is Regulated by the Fatty Acids Palmitate, Docosahexaenoic Acid and Oleate, and the Endocrine Disrupting Chemical Bisphenol A in Immortalized Hypothalamic Neurons. *Frontiers in Neuroscience*, 12(NOV). https://doi.org/10.3389/FNINS.2018.00838

Meldrum, B. S. (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *The Journal of Nutrition*, 130(4S Suppl). https://doi.org/10.1093/JN/130.4.1007S

Méndez-Díaz, M., Domínguez Martín, E., Pérez Morales, M., Ruiz-Contreras, A. E., Navarro, L., & Prospéro-García, O. (2009). The anorexigenic peptide cocaine-and-amphetamine-regulated transcript modulates rem-sleep in rats. *Neuropeptides*, 43(6), 499–505. https://doi.org/10.1016/J.NPEP.2009.08.004

Merchenthaler, I., Lane, M., & Shughrue, P. (1999). Distribution of pre-pro-glucagon and glucagon-like peptide-1 receptor messenger RNAs in the rat central nervous system. *The Journal of comparative neurology*, *403*(2), 261–280. https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9861(19990111)403:2<261::aid-cne8>3.0.co;2-5

Miñana-Solis, M. D. C., Angeles-Castellanos, M., Buijs, R. M., & Escobar, C. (2010). Altered Fos immunoreactivity in the hypothalamus after glucose administration in pre- and post-weaning malnourished rats. *Nutritional Neuroscience*, 13(4), 152–160. https://doi.org/10.1179/147683010X12611460764246

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

Minbay, Z., & Eyigör, Ö. (2020). Oksitosin Nöronlarında Kainat Reseptör Alt Birimlerinin Sentezi: İmmünohistokimyasal Çalışma. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 46(3), 357-363. https://doi.org/10.32708/uutfd.823410

Mitsikostas, D. D., Sanchez Del Rio, M., Waeber, C., Huang, Z., Michael Cutrer, F., & Moskowitz, M. A. (1999). Non-NMDA glutamate receptors modulate capsaicin induced c-fos expression within trigeminal nucleus caudalis. *Wiley Online Library*, 127(3), 623–630. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702584

Mizuno, T. M., Kleopoulos, S. P., Bergen, H. T., Roberts, J. L., Priest, C. A., & Mobbs, C. V. (1998). Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting and [corrected] in ob/ob and db/db mice, but is stimulated by leptin. *Diabetes*, 47(2), 294–297. https://doi.org/10.2337/DIAB.47.2.294

Moghaddam, B., & Adams, B. W. (1998). Reversal of phencyclidine effects by a group II metabotropic glutamate receptor agonist in rats. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5381), 1349–1352. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.281.5381.1349

Mogharnasi, M., TaheriChadorneshin, H., Papoli-Baravati, S. A., & Teymuri, A. (2019). Effects of upper-body resistance exercise training on serum nesfatin-1 level, insulin resistance, and body composition in obese paraplegic men. *Disability and Health Journal*, 12(1), 29–34. https://doi.org/10.1016/J.DHJO.2018.07.003

Mohri, Y., Kato, S., Umezawa, A., Okuyama, R., & Nishimori, K. (2008). Impaired hair placode formation with reduced expression of hair follicle-related genes in

mice lacking Lgr4. *Developmental Dynamics*, 237(8), 2235–2242. https://doi.org/10.1002/DVDY.21639

Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., … Seeburg, P. H. (1992). Heteromeric NMDA receptors: Molecular and functional distinction of subtypes. *Science*, 256(5060), 1217–1221. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.256.5060.1217

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, 421–451. https://doi.org/10.1146/ANNUREV.NE.14.030191.002225

Mori, H., & Mishina, M. (1995). Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology*, 34(10), 1219–1237. https://doi.org/10.1016/0028-3908(95)00109-J

Morley, J. E. (1987). Neuropeptide Regulation of Appetite and Weight. *Endocrine Reviews*, 8(3), 256–287. https://doi.org/10.1210/EDRV-8-3-256

Mortazavi, S., Gonzalez, R., Ceddia, R., & Unniappan, S. (2015). Long-term infusion of nesfatin-1 causes a sustained regulation of whole-body energy homeostasis of male Fischer 344 rats. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 3(APR). https://doi.org/10.3389/FCELL.2015.00022

Mountjoy, K. G., Mortrud, M. T., Low, M. J., Simerly, R. B., & Cone, R. D. (1994). Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 8(10), 1298–1308. https://doi.org/10.1210/MEND.8.10.7854347

Mul, J. D., Yi, C. X., Van Den Berg, S. A. A., Ruiter, M., Toonen, P. W., Van Der Elst, M. C. J., … Cuppen, E. (2010). Pmch expression during early development is critical for normal energy homeostasis. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 298(3). https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00154.2009

Munguía-Reyes, A., Balderas-Martínez, Y. I., Becerril, C., Checa, M., Ramírez, R., Ortiz, B., … Selman, M. (2018). R-Spondin-2 Is Upregulated in Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Affects Fibroblast Behavior. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 59(1), 65–76. https://doi.org/10.1165/RCMB.2017-0115OC

Muzammil, A. N., Barathan, M., Yazid, M. D., Sulaiman, N., Makpol, S., Mohamed Ibrahim, N., … Abdullah, N. A. H. (2024). A systematic scoping review of the multifaceted role of phoenixin in metabolism: insights from in vitro and in vivo studies. *Frontiers in Endocrinology*, 15, 1406531. https://doi.org/10.3389/FENDO.2024.1406531

Nakagawa, T., & Hosoi, T. (2023). Recent progress on action and regulation of anorexigenic adipokine leptin. *Frontiers in Endocrinology*, 14. https://doi.org/10.3389/FENDO.2023.1172060/FULL

Nakanishi, S. (1992). Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science (New York, N.Y.)*, 258(5082), 597–603. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1329206

Nam, J. S., Park, E., Turcotte, T. J., Palencia, S., Zhan, X., Lee, J., … Yoon, J. K. (2007). Mouse R-spondin2 is required for apical ectodermal ridge maintenance in the hindlimb. *Developmental Biology*, 311(1), 124–135. https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2007.08.023

Nam, J. S., Turcotte, T. J., Smith, P. F., Choi, S., & Jeong, K. Y. (2006). Mouse cristin/R-spondin family proteins are novel ligands for the Frizzled 8 and LRP6 receptors and activate beta-catenin-dependent gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(19), 13247–13257. https://doi.org/10.1074/JBC.M508324200

Nambu, T., Sakurai, T., Mizukami, K., Hosoya, Y., Yanagisawa, M., & Goto, K. (1999). Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Research*, 827(1–2), 243–260. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01336-0

Nauck, M. A., & Meier, J. J. (2016). The incretin effect in healthy individuals and those with type 2 diabetes: physiology, pathophysiology, and response to therapeutic interventions. *The Lancet. Diabetes & Endocrinology*, 4(6), 525–536. https://doi.org/10.1016/S2213-8587(15)00482-9

Neary, N. M., Goldstone, A. P., & Bloom, S. R. (2004). Appetite regulation: from the gut to the hypothalamus. *Clinical Endocrinology*, 60(2), 153–160. https://doi.org/10.1046/J.1365-2265.2003.01839.X

Nguyen, A. D., Mitchell, N. F., Lin, S., Macia, L., Yulyaningsih, E., Baldock, P. A., … Sainsbury, A. (2012). Y1 and Y5 receptors are both required for the regulation of food intake and energy homeostasis in mice. *PloS One*, 7(6). https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0040191

Niciu, M. J., Kelmendi, B., & Sanacora, G. (2012). Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 100(4), 656–664. https://doi.org/10.1016/J.PBB.2011.08.008

Niehrs, C. (2012). The complex world of WNT receptor signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 13(12), 767–779. https://doi.org/10.1038/NRM3470

Noble, E. E., Wang, Z., Liu, C. M., Davis, E. A., Suarez, A. N., Stein, L. M., … Kanoski, S. E. (2019). Hypothalamus-hippocampus circuitry regulates impulsivity via melanin-concentrating hormone. *Nature Communications 2019 10:1*, 10(1), 1–16. https://doi.org/10.1038/s41467-019-12895-y

Noetzel, S., Stengel, A., Inhoff, T., Goebel, M., Wisser, A. S., Bannert, N., … Kobelt, P. (2009). CCK-8S activates c-Fos in a dose-dependent manner in nesfatin-1 immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and in the nucleus of the solitary tract of the brainstem. *Regulatory Peptides*, 157(1–3), 84–91. https://doi.org/10.1016/J.REGPEP.2009.06.009

Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., & Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*, 307(5950), 462–465. https://doi.org/10.1038/307462A0

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), 709–712. https://doi.org/10.1038/NATURE05162

Ohkawara, B., Glinka, A., & Niehrs, C. (2011). Rspo3 binds syndecan 4 and induces Wnt/PCP signaling via clathrin-mediated endocytosis to promote morphogenesis. *Developmental Cell*, 20(3), 303–314. https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2011.01.006

Okere, B., Xu, L., Roubos, E. W., Sonetti, D., & Kozicz, T. (2010). Restraint stress alters the secretory activity of neurons co-expressing urocortin-1, cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide and nesfatin-1 in the mouse Edinger-Westphal nucleus. *Brain Research*, 1317, 92–99. https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2009.12.053

Ollmann, M. M., Wilson, B. D., Yang, Y. K., Kerns, J. A., Chen, Y., Gantz, I., & Barsh, G. S. (1997). Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science (New York, N.Y.)*, 278(5335), 135–138. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.278.5335.135

Olson, B. R., Drutarosky, M. D., Chow, M. S., Hruby, V. J., Stricker, E. M., & Verbalis, J. G. (1991a). Oxytocin and an oxytocin agonist administered centrally decrease food intake in rats. *Peptides*, 12(1), 113–118. https://doi.org/10.1016/0196-9781(91)90176-P

Olson, B. R., Drutarosky, M. D., Stricker, E. M., & Verbalis, J. G. (1991b). Brain oxytocin receptor antagonism blunts the effects of anorexigenic treatments in rats: evidence for central oxytocin inhibition of food intake. *Endocrinology*, 129(2), 785–791. https://doi.org/10.1210/ENDO-129-2-785

Otsuka, A., Jinguji, A., Maejima, Y., Kasahara, Y., Shimomura, K., Hidema, S., & Nishimori, K. (2019). LGR4 is essential for R-spondin1-mediated suppression of food intake via pro-opiomelanocortin. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 83(7), 1336–1342. https://doi.org/10.1080/09168451.2019.1591266

Oyama, K., Mohri, Y., Sone, M., Nawa, A., & Nishimori, K. (2011). Conditional knockout of Lgr4 leads to impaired ductal elongation and branching morphogenesis in mouse mammary glands. *Sexual Development: Genetics, Molecular Biology, Evolution, Endocrinology, Embryology, and Pathology of Sex Determination and Differentiation*, 5(4), 205–212. https://doi.org/10.1159/000329476

Ozawa, S., Kamiya, H., & Tsuzuki, K. (1998). Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology*, 54(5), 581–618. https://doi.org/10.1016/S0301-0082(97)00085-3

Pachernegg, S., Strutz-Seebohm, N., & Hollmann, M. (2012). GluN3 subunit-containing NMDA receptors: not just one-trick ponies. *Trends in Neurosciences*, 35(4), 240–249. https://doi.org/10.1016/J.TINS.2011.11.010

Pałasz, A., Della Vecchia, A., Saganiak, K., & Worthington, J. J. (2021). Neuropeptides of the human magnocellular hypothalamus. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 117, 102003. https://doi.org/10.1016/J.JCHEMNEU.2021.102003

Pałasz, A., Janas-Kozik, M., Borrow, A., Arias-Carrión, O., & Worthington, J. J. (2018). The potential role of the novel hypothalamic neuropeptides nesfatin-1, phoenixin, spexin and kisspeptin in the pathogenesis of anxiety and anorexia nervosa. *Neurochemistry International*, 113, 120–136. https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2017.12.006

Palmer, C. L., Cotton, L., & Henley, J. M. (2005). The molecular pharmacology and cell biology of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors. *Pharmacological Reviews*, 57(2), 253–277. https://doi.org/10.1124/PR.57.2.7

Paoletti, P. (2011). Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *The European Journal of Neuroscience*, 33(8), 1351–1365. https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2011.07628.X

Paoletti, P. (2011). Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *European Journal of Neuroscience*, 33(8), 1351–1365. https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2011.07628.X

Parker, J. A., & Bloom, S. R. (2012). Hypothalamic neuropeptides and the regulation of appetite. *Neuropharmacology*, 63(1), 18–30. https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2012.02.004

Parma, P., Radi, O., Vidal, V., Chaboissier, M. C., Dellambra, E., Valentini, S., … Camerino, G. (2006). R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nature Genetics*, 38(11), 1304–1309. https://doi.org/10.1038/NG1907

Parton, L. E., Ye, C. P., Coppari, R., Enriori, P. J., Choi, B., Zhang, C. Y., … Lowell, B. B. (2007). Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature*, 449(7159), 228–232. https://doi.org/10.1038/NATURE06098

Patil, S. T., Zhang, L., Martenyi, F., Lowe, S. L., Jackson, K. A., Andreev, B. V., … Schoepp, D. D. (2007). Activation of mGlu2/3 receptors as a new approach to treat schizophrenia: a randomized Phase 2 clinical trial. *Nature Medicine*, 13(9), 1102–1107. https://doi.org/10.1038/NM1632

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

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

Pétervári, E., Szabad, A. O., Soós, S., Garami, A., Székely, M., & Balaskó, M. (2011). Central alpha-MSH infusion in rats: disparate anorexic vs. metabolic changes with aging. *Regulatory Peptides*, 166(1–3), 105–111. https://doi.org/10.1016/J.REGPEP.2010.10.002

Petralia, R. S., & Wenthold, R. J. (1992). Light and electron immunocytochemical localization of AMPA-selective glutamate receptors in the rat brain. *Journal of Comparative Neurology*, 318(3), 329–354. https://doi.org/10.1002/CNE.903180309

Petralia, R. S., & Wenthold, R. J. (1999). Immunocytochemistry of NMDA receptors. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 128, 73–92. https://doi.org/10.1385/1-59259-683-5:73

Petralia, R. S., Wang, Y. -X, & Wenthold, R. J. (1994c). Histological and ultrastructural localization of the kainate receptor subunits, KA2 and GluR6/7, in the rat nervous system using selective antipeptide antibodies. *Journal of Comparative Neurology*, 349(1), 85–110. https://doi.org/10.1002/CNE.903490107

Petralia, R. S., Wang, Y. X., & Wenthold, R. J. (1994a). The NMDA receptor subunits NR2A and NR2B show histological and ultrastructural localization patterns similar to those of NR1. *Journal of Neuroscience*, 14(10), 6102–6120. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-10-06102.1994

Petralia, R. S., Yokotani, N., & Wenthold, R. J. (1994b). Light and electron microscope distribution of the NMDA receptor subunit NMDAR1 in the rat nervous system using a selective anti-peptide antibody. *The Journal of Neuroscience*, 14(2), 667–696. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-02-00667.1994

Pinheiro, P., & Mulle, C. (2006). Kainate receptors. *Cell and Tissue Research*, 326(2), 457–482. https://doi.org/10.1007/S00441-006-0265-6

Pithawa, A. (2011). Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease: pathophysiology, diagnosis, management. *Medical Journal, Armed Forces India*, 63(2), 205. https://doi.org/10.1016/S0377-1237(07)80085-2

Plaitakis, A., & Shashidharan, P. (2000). Glutamate transport and metabolism in dopaminergic neurons of substantia nigra: implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of Neurology*, 247 Suppl 2(2), 25–35. https://doi.org/10.1007/PL00007757

Price, C. J., Samson, W. K., & Ferguson, A. V. (2008). Nesfatin-1 inhibits NPY neurons in the arcuate nucleus. *Brain Research*, 1230, 99. https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2008.06.084

Prinz, P., & Stengel, A. (2017). Control of Food Intake by Gastrointestinal Peptides: Mechanisms of Action and Possible Modulation in the Treatment of Obesity. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 23(2), 180–196. https://doi.org/10.5056/JNM16194

Pronchuk, N., Beck-Sickinger, A. G., & Colmers, W. F. (2002). Multiple NPY receptors Inhibit GABA(A) synaptic responses of rat medial parvocellular effector neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*, 143(2), 535–543. https://doi.org/10.1210/ENDO.143.2.8655

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), 1643–1659. https://doi.org/10.1093/NAR/15.4.1643

Rajaei, S., Zendehdel, M., Rahnema, M., Hassanpour, S., & Asle-Rousta, M. (2022). Mediatory role of the central NPY, melanocortine and corticotrophin systems on phoenixin-14 induced hyperphagia in neonatal chicken. *General and Comparative Endocrinology*, 315. https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2021.113930

Ramirez, C., Tercero, I., Pineda, A., & Burgos, J. S. (2011). Simvastatin is the Statin that Most Efficiently Protects Against Kainate-Induced Excitotoxicity and Memory Impairment. *Journal of Alzheimer's Disease*, 24(1), 161–174. https://doi.org/10.3233/JAD-2010-101653

Ramos, E. J. B., Meguid, M. M., Campos, A. C. L., & Coelho, J. C. U. (2005). Neuropeptide Y, alpha-melanocyte-stimulating hormone, and monoamines in food intake regulation. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 21(2), 269–279. https://doi.org/10.1016/J.NUT.2004.06.021

Richard, D., Huang, Q., & Timofeeva, E. (2000). The corticotropin-releasing hormone system in the regulation of energy balance in obesity. *International Journal of Obesity and Related Metabolic*, 24(2), S36–S39. https://doi.org/10.1038/SJ.IJO.0801275

Rodríguez-Moreno, A., & Sihra, T. S. (2007). Metabotropic actions of kainate receptors in the CNS. *Journal of Neurochemistry*, 103(6), 2121–2135. https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2007.04924.X

Rohde, K., Keller, M., la Cour Poulsen, L., Blüher, M., Kovacs, P., & Böttcher, Y. (2019). Genetics and epigenetics in obesity. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 92, 37–50. https://doi.org/10.1016/J.METABOL.2018.10.007

Roseberry, A. G., Liu, H., Jackson, A. C., Cai, X., & Friedman, J. M. (2004). Neuropeptide Y-mediated inhibition of proopiomelanocortin neurons in the arcuate nucleus shows enhanced desensitization in ob/ob mice. *Neuron*, 41(5), 711–722. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(04)00074-1

Rossi, J., Balthasar, N., Olson, D., Scott, M., Berglund, E., Lee, C. E., … Elmquist, J. K. (2011). Melanocortin-4 receptors expressed by cholinergic neurons regulate energy balance and glucose homeostasis. *Cell Metabolism*, 13(2), 195–204.

https://doi.org/10.1016/J.CMET.2011.01.010
Rossi, M., Choi, S. J., O'Shea, D., Miyoshi, T., Ghatei, M. A., & Bloom, S. R. (1997). Melanin-concentrating hormone acutely stimulates feeding, but chronic administration has no effect on body weight. *Endocrinology*, 138(1), 351–355. https://doi.org/10.1210/ENDO.138.1.4887
Rossi, M., Kim, M. S., Morgan, D. G. A., Small, C. J., Edwards, C. M. B., Sunter, D., … Bloom, S. R. (1998). A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology*, 139(10), 4428–4431. https://doi.org/10.1210/ENDO.139.10.6332
Ruffner, H., Sprunger, J., Charlat, O., Leighton-Davies, J., Grosshans, B., Salathe, A., … Cong, F. (2012). R-Spondin potentiates Wnt/β-catenin signaling through orphan receptors LGR4 and LGR5. *PloS One*, 7(7). https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0040976
Sagar, S. M., Sharp, F. R., & Curran, T. (1988). Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science (New York, N.Y.)*, 240(4857), 1328–1331. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.3131879
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, 175–181. https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2013.04.064
Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R. M., Tanaka, H., … Yanagisawa, M. (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, 92(4), 573–585. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80949-6
Sam, A. H., Troke, R. C., Tan, T. M., & Bewick, G. A. (2012). The role of the gut/brain axis in modulating food intake. *Neuropharmacology*, 63(1), 46–56. https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2011.10.008
Samson, W. K., Zhang, J. V., Avsian-Kretchmer, O., Cui, K., Yosten, G. L. C., Klein, C., … Hsueh, A. J. W. (2008). Neuronostatin Encoded by the Somatostatin Gene Regulates Neuronal, Cardiovascular, and Metabolic Functions. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(46), 31949. https://doi.org/10.1074/JBC.M804784200
Saper, C. B., & Lowell, B. B. (2014). The hypothalamus. *Current Biology*, 24(23), R1111–R1116. https://doi.org/10.1016/J.CUB.2014.10.023
Sartin, J. L., Dyer, C., Matteri, R., Buxton, D., Buonomo, F., Shores, M., … Steele, B. (2001). Effect of intracerebroventricular orexin-B on food intake in sheep. *Journal of Animal Science*, 79(6), 1573–1577. https://doi.org/10.2527/2001.7961573X
Sato, K., Kiyama, H., & Tohyama, M. (1993). The differential expression patterns of messenger RNAs encoding non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptor subunits (GluR1-4) in the rat brain. *Neuroscience*, 52(3), 515–539. https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90403-3
Scammel, T. E., & Winrow, C. J. (2011). Orexin receptors: pharmacology and therapeutic opportunities. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 51, 243–266. https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHARMTOX-010510-100528
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

Schalla, M. A., & Stengel, A. (2019). The role of phoenixin in behavior and food intake. *Peptides*, 114, 38–43. https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2019.04.002

Schalla, M., Prinz, P., Friedrich, T., Scharner, S., Kobelt, P., Goebel-Stengel, M., … Stengel, A. (2017). Phoenixin-14 injected intracerebroventricularly but not intraperitoneally stimulates food intake in rats. *Peptides*, 96, 53–60. https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2017.08.004

Schneeberger, M., Tan, K., Nectow, A. R., Parolari, L., Caglar, C., Azevedo, E., … Friedman, J. M. (2018). Functional analysis reveals differential effects of glutamate and MCH neuropeptide in MCH neurons. *Molecular Metabolism*, 13, 83–89. https://doi.org/10.1016/J.MOLMET.2018.05.001

Schwartz, M. W., Dallman, M. F., & Woods, S. C. (1995). Hypothalamic response to starvation: implications for the study of wasting disorders. *The American Journal of Physiology*, 269(5 Pt 2). https://doi.org/10.1152/AJPREGU.1995.269.5.R949

Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Seeley, R. J., & Baskin, D. G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404(6778), 661–671. https://doi.org/10.1038/35007534

Sears, R. M., Liu, R. J., Narayanan, N. S., Sharf, R., Yeckel, M. F., Laubach, M., … DiLeone, R. J. (2010). Regulation of Nucleus Accumbens Activity by the Hypothalamic Neuropeptide Melanin-Concentrating Hormone. *Journal of Neuroscience*, 30(24), 8263–8273. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5858-09.2010

Sedbazar, U., Ayush, E. A., Maejima, Y., & Yada, T. (2014). Neuropeptide Y and α-melanocyte-stimulating hormone reciprocally regulate nesfatin-1 neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Neuroreport*, 25(18), 1453–1458. https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000000293

Seeburg, P. H. (1993). The TINS/TiPS Lecture. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends in Neurosciences*, 16(9), 359–365. https://doi.org/10.1016/0166-2236(93)90093-2

Shah, B. P., Vong, L., Olson, D. P., Koda, S., Krashes, M. J., Ye, C., … Lowell, B. B. (2014). MC4R-expressing glutamatergic neurons in the paraventricular hypothalamus regulate feeding and are synaptically connected to the parabrachial nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(36), 13193–13198. https://doi.org/10.1073/PNAS.1407843111

Shimada, M., Tritos, N. A., Lowell, B. B., Flier, J. S., & Maratos-Flier, E. (1998). Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature*, 396(6712), 670–679. https://doi.org/10.1038/25341

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), 662–671. 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), 537–543. https://doi.org/10.1507/ENDOCRJ.K09E-117

Shimizu, H., Ohsaki, A., Oh-I, S., Okada, S., & Mori, M. (2009c). A new anorexigenic protein, nesfatin-1. *Peptides*, 30(5), 995–998. https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2009.01.002

Sigal, M., Reinés, M. del M., Müllerke, S., Fischer, C., Kapalczynska, M., Berger, H., … Meyer, T. F. (2019). R-spondin-3 induces secretory, antimicrobial Lgr5+ cells

in the stomach. *Nature Cell Biology*, 21(7), 812–823. https://doi.org/10.1038/S41556-019-0339-9

Smith, C. A., Shoemaker, C. M., Roeszler, K. N., Queen, J., Crews, D., & Sinclair, A. H. (2008). Cloning and expression of R-Spondin1 in different vertebrates suggests a conserved role in ovarian development. *BMC Developmental Biology*, 8. https://doi.org/10.1186/1471-213X-8-72

Snippert, H. J., Haegebarth, A., Kasper, M., Jaks, V., Van Es, J. H., Barker, N., … Clevers, H. (2010). Lgr6 marks stem cells in the hair follicle that generate all cell lineages of the skin. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5971), 1385–1389. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1184733

Sohn, J. W. (2015). Network of hypothalamic neurons that control appetite. *BMB Reports*, 48(4), 229–233. https://doi.org/10.5483/BMBREP.2015.48.4.272

Speliotes, E. K., Willer, C. J., Berndt, S. I., Monda, K. L., Thorleifsson, G., Jackson, A. U., … Loos, R. J. F. (2010). Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nature Genetics*, 42(11), 937–948. https://doi.org/10.1038/NG.686

Stein, L. M., Tullock, C. W., Mathews, S. K., Garcia-Galiano, D., Elias, C. F., Samson, W. K., & Yosten, G. L. C. (2016). Hypothalamic action of phoenixin to control reproductive hormone secretion in females: importance of the orphan G protein-coupled receptor Gpr173. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 311(3), R489–R496. https://doi.org/10.1152/AJPREGU.00191.2016

Steinbusch, L., Labouèbe, G., & Thorens, B. (2015). Brain glucose sensing in homeostatic and hedonic regulation. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 26(9), 455–466. https://doi.org/10.1016/J.TEM.2015.06.005

Stengel, A. (2015). Nesfatin-1 - More than a food intake regulatory peptide. *Peptides*, 72, 175–183. https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2015.06.002

Stengel, A., & Taché, Y. (2013b). Role of NUCB2/Nesfatin-1 in the Hypothalamic Control of Energy Homeostasis. *Hormone and Metabolic Research*, 45(13), 975. https://doi.org/10.1055/S-0033-1351324

Stengel, A., Goebel, M., Wang, L., & Taché, Y. (2010). Ghrelin, des-acyl ghrelin and nesfatin-1 in gastric X/A-like cells: role as regulators of food intake and body weight. *Peptides*, 31(2), 357–369. https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2009.11.019

Stengel, A., Goebel, M., Wang, L., Rivier, J., Kobelt, P., Mönnikes, H., … Taché, Y. (2009). Central nesfatin-1 reduces dark-phase food intake and gastric emptying in rats: differential role of corticotropin-releasing factor2 receptor. *Endocrinology*, 150(11), 4911–4919. https://doi.org/10.1210/EN.2009-0578

Stengel, A., Mori, M., & Taché, Y. (2013a). The role of nesfatin-1 in the regulation of food intake and body weight: recent developments and future endeavors. *Obesity Reviews*, 14(11), 859–870. https://doi.org/10.1111/OBR.12063

Stockwell, I., Watson, J. F., & Greger, I. H. (2024). Tuning synaptic strength by regulation of AMPA glutamate receptor localization. *News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 46(7). https://doi.org/10.1002/BIES.202400006

Stricker-Krongrad, A., Dimitrov, T., & Beck, B. (2001). Central and peripheral dysregulation of melanin-concentrating hormone in obese Zucker rats. *Molecular Brain Research*, 92(1–2), 43–48. https://doi.org/10.1016/S0169-328X(01)00130-

9
Strubbe, J. H., & Woods, S. C. (2004). The timing of meals. *Psychological Review*, 111(1), 128–141. https://doi.org/10.1037/0033-295X.111.1.128
Su, S. F., Yang, A. M., Yang, S. Bin, Wang, N. B., Lu, S. S., Wang, H. H., & Chen, Q. (2012). Intracerebroventricular administration of neuronostatin delays gastric emptying and gastrointestinal transit in mice. *Peptides*, 35(1), 31–35. https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2012.03.013
Susan, A. J. A., Sahandy, S., Ladenheim, E. E., Schwartz, G. J., & Moran, T. H. (2001). Intracerebroventricular CART peptide reduces food intake and alters motor behavior at a hindbrain site. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 281(6). https://doi.org/10.1152/AJPREGU.2001.281.6.R1862
Tang-Christensen, M., Larsen, P. J., Göke, R., Fink-Jensen, A., Jessop, D. S., Møller, M., & Sheikh, S. P. (1996). Central administration of GLP-1-(7-36) amide inhibits food and water intake in rats. *The American Journal of Physiology*, 271(4 Pt 2). https://doi.org/10.1152/AJPREGU.1996.271.4.R848
Tang-Christensen, M., Larsen, P. J., Thulesen, J., Rømer, J., & Vrang, N. (2000). The proglucagon-derived peptide, glucagon-like peptide-2, is a neurotransmitter involved in the regulation of food intake. *Nature Medicine*, 6(7), 802–807. https://doi.org/10.1038/77535
Tatemoto, K., Carlquist, M., & Mutt, V. (1982). Neuropeptide Y--a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature*, 296(5858), 659–660. https://doi.org/10.1038/296659A0
ter Steege, E. J., & Bakker, E. R. M. (2021). The role of R-spondin proteins in cancer biology. *Oncogene*, 40(47), 6469–6478. https://doi.org/10.1038/S41388-021-02059-Y
Themmen, A. P. N., & Huhtaniemi, I. T. (2000). Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocrine Reviews*, 21(5), 551–583. https://doi.org/10.1210/EDRV.21.5.0409
Tomizuka, K., Horikoshi, K., Kitada, R., Sugawara, Y., Iba, Y., Kojima, A., … Kakitani, M. (2008). R-spondin1 plays an essential role in ovarian development through positively regulating Wnt-4 signaling. *Human Molecular Genetics*, 17(9), 1278–1291. https://doi.org/10.1093/HMG/DDN036
Toni, R., Malaguti, A., Benfenati, F., & Martini, L. (2004). The human hypothalamus: a morpho-functional perspective. *Journal of endocrinological investigation*, *27*(6 Suppl), 73–94.
Tracy, A. L., Clegg, D. J., Johnson, J. D., Davidson, T. L., & Benoit, S. C. (2008). The melanocortin antagonist AgRP (83-132) increases appetitive responding for a fat, but not a carbohydrate, reinforcer. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 89(3), 263–271. https://doi.org/10.1016/J.PBB.2007.12.018
Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., … Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological Reviews*, 62(3), 405–496. https://doi.org/10.1124/PR.109.002451
Tse, Y. C., & Yung, K. K. L. (2000). Cellular expression of ionotropic glutamate receptor subunits in subpopulations of neurons in the rat substantia nigra pars reticulata. *Brain Research*, 854(1–2), 57–69. https://doi.org/10.1016/S0006-

8993(99)02292-1
Umbricht, D., Schmid, L., Koller, R., Vollenweider, F. X., Hell, D., & Javitt, D. C. (2000). Ketamine-induced deficits in auditory and visual context-dependent processing in healthy volunteers: implications for models of cognitive deficits in schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, 57(12), 1139–1147. https://doi.org/10.1001/ARCHPSYC.57.12.1139
Valassi, E., Scacchi, M., & Cavagnini, F. (2008). Neuroendocrine control of food intake. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases*, 18(2), 158–168. https://doi.org/10.1016/J.NUMECD.2007.06.004
Vale, W., Spiess, J., Rivier, C., & Rivier, J. (1981). Characterization of a 41-Residue Ovine Hypothalamic Peptide That Stimulates Secretion of Corticotropin and β-Endorphin. *Science*, 213(4514), 1394–1397. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.6267699
Van Den Pol, A. N. (1991). Glutamate and aspartate immunoreactivity in hypothalamic presynaptic axons. *The Journal of Neuroscience*, 11(7), 2087–2101. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.11-07-02087.1991
Van Den Pol, A. N., & Trombley, P. Q. (1993). Glutamate neurons in hypothalamus regulate excitatory transmission. *The Journal of Neuroscience*, 13(7), 2829–2836. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-07-02829.1993
Van Den Pol, A. N., Hermans-Borgmeyer, I., Hofer, M., Ghosh, P., & Heinemann, S. (1994). Ionotropic glutamate-receptor gene expression in hypothalamus: Localization of AMPA, kainate, and NMDA receptor RNA with in situ hybridization. *Journal of Comparative Neurology*, 343(3), 428–444. https://doi.org/10.1002/CNE.903430307
Van den Pol, A. N., Wuarin, J.-P., & Dudek, F. E. (1990). Glutamate, the dominant excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. *Science (New York, N.Y.)*, 250(4985), 1276–1278. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1978759
Van Loy, T., Vandersmissen, H. P., Van Hiel, M. B., Poels, J., Verlinden, H., Badisco, L., … Vanden Broeck, J. (2008). Comparative genomics of leucine-rich repeats containing G protein-coupled receptors and their ligands. *General and Comparative Endocrinology*, 155(1), 14–21. https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2007.06.022
Van Schoore, G., Mendive, F., Pochet, R., & Vassart, G. (2005). Expression pattern of the orphan receptor LGR4/GPR48 gene in the mouse. *Histochemistry and Cell Biology*, 124(1), 35–50. https://doi.org/10.1007/S00418-005-0002-3
Vidal, V. P. I., Motamedi, F. J., Rekima, S., Gregoire, E. P., Szenker-Ravi, E., Leushacke, M., … Schedl, A. (2020). R-spondin signalling is essential for the maintenance and differentiation of mouse nephron progenitors. *ELife*, 9. https://doi.org/10.7554/ELIFE.53895
Vohra, M. S., Benchoula, K., Serpell, C. J., & Hwa, W. E. (2022). AgRP/NPY and POMC neurons in the arcuate nucleus and their potential role in treatment of obesity. *European Journal of Pharmacology*, 915. https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2021.174611
Wang, C., Billington, C. J., Levine, A. S., & Kotz, C. M. (2000). Effect of CART in the hypothalamic paraventricular nucleus on feeding and uncoupling protein gene expression. *Neuroreport*, 11(14), 3251–3255. https://doi.org/10.1097/00001756-200009280-00040
Wang, L., Tran, A., Lee, J., & Belsham, D. D. (2020). Palmitate differentially regulates

Spexin, and its receptors Galr2 and Galr3, in GnRH neurons through mechanisms involving PKC, MAPKs, and TLR4. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 518. https://doi.org/10.1016/J.MCE.2020.110991

Wang, M., Deng, S. P., Chen, H. P., Jiang, D. neng, Tian, C. X., Yang, W., … Li, G. L. (2018). Phoenixin participated in regulation of food intake and growth in spotted scat, Scatophagus argus. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 226, 36–44. https://doi.org/10.1016/J.CBPB.2018.07.007

Waxman, A. (2011). Hypothalamus. *Encyclopedia of Clinical Neuropsychology*, 1286–1289. https://doi.org/10.1007/978-0-387-79948-3_1128

Wernecke, K., Lamprecht, I., Jöhren, O., Lehnert, H., & Schulz, C. (2014). Nesfatin-1 increases energy expenditure and reduces food intake in rats. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 22(7), 1662–1668. https://doi.org/10.1002/OBY.20736

Wollmuth, L. P., & Sobolevsky, A. I. (2004). Structure and gating of the glutamate receptor ion channel. *Trends in Neurosciences*, 27(6), 321–328. https://doi.org/10.1016/J.TINS.2004.04.005

Wong, M. K. H., Sze, K. H., Chen, T., Cho, C. K., Law, H. C. H., Chu, I. K., & Wong, A. O. L. (2013). Goldfish spexin: solution structure and novel function as a satiety factor in feeding control. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 305(3). https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00141.2013

Wu, H., Lin, F., Chen, H., Liu, J., Gao, Y., Zhang, X., … Li, Z. (2016). Ya-fish (Schizothorax prenanti) spexin: identification, tissue distribution and mRNA expression responses to periprandial and fasting. *Fish Physiology and Biochemistry*, 42(1), 39–49. https://doi.org/10.1007/S10695-015-0115-0

Wu, L., Zhang, W., Qian, J., Wu, J., Jiang, L., & Ling, C. (2019). R-spondin family members as novel biomarkers and prognostic factors in lung cancer. *Oncology Letters*, 18(4), 4008–4015. https://doi.org/10.3892/OL.2019.10778

Wynne, K., Stanley, S., McGowan, B., & Bloom, S. R. (2005). Appetite control. *The Journal of Endocrinology*, 184(2), 291–318. https://doi.org/10.1677/JOE.1.05866

Yamakami, Y., Kohashi, K., Oyama, K., Mohri, Y., Hidema, S., & Nishimori, K. (2016). LGR4 is required for sequential molar development. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 8, 174–183. https://doi.org/10.1016/J.BBREP.2016.08.018

Yamanaka, A., Beuckmann, C. T., Willie, J. T., Hara, J., Tsujino, N., Mieda, M., … Sakurai, T. (2003). Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron*, 38(5), 701–713. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00331-3

Yan, K. S., Janda, C. Y., Chang, J., Zheng, G. X. Y., Larkin, K. A., Luca, V. C., … Kuo, C. J. (2017). Non-equivalence of Wnt and R-spondin ligands during Lgr5+ intestinal stem-cell self-renewal. *Nature*, 545(7653), 238–242. https://doi.org/10.1038/NATURE22313

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). https://doi.org/10.1152/AJPREGU.90867.2008

Yosten, G. L. C., Lyu, R. M., Hsueh, A. J. W., Avsian-Kretchmer, O., Chang, J. K., Tullock, C. W., … Samson, W. K. (2013). A novel reproductive peptide, phoenixin. *Journal of Neuroendocrinology*, 25(2), 206–215.

https://doi.org/10.1111/J.1365-2826.2012.02381.X
Yosten, G. L. C., Pate, A. T., & Samson, W. K. (2011). Neuronostatin acts in brain to biphasically increase mean arterial pressure through sympatho-activation followed by vasopressin secretion: the role of melanocortin receptors. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 300(5). https://doi.org/10.1152/AJPREGU.00849.2010
Yu, J. H., & Kim, M. S. (2012). Molecular mechanisms of appetite regulation. *Diabetes & Metabolism Journal*, 36(6), 391–398. https://doi.org/10.4093/DMJ.2012.36.6.391
Yulyaningsih, E., Zhang, L., Herzog, H., & Sainsbury, A. (2011). NPY receptors as potential targets for anti-obesity drug development. *British Journal of Pharmacology*, 163(6), 1170–1202. https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.2011.01363.X
Yurtseven Gok, D., Coskan, N., Topal, G., Hasanoglu Akbulut, N., & Eyigor, O. (2023). The Localization of R-Spondin1 and R-Spondin 3 Peptides in Rat Hypothalamus: An Immunohistochemical Study. *International Journal of Morphology*, 41(6), 1808–1815. https://doi.org/10.4067/S0717-95022023000601808
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), 1–18. https://doi.org/10.3390/BRAINSCI10090630
Zebisch, M., Xu, Y., Krastev, C., Macdonald, B. T., Chen, M., Gilbert, R. J. C., … Jones, E. Y. (2013). Structural and molecular basis of ZNRF3/RNF43 transmembrane ubiquitin ligase inhibition by the Wnt agonist R-spondin. *Nature Communications*, 4. https://doi.org/10.1038/NCOMMS3787
Zhang, Y., Li, F., Sun, D., Liu, J., Liu, N., & Yu, Q. (2011). Molecular analysis shows differential expression of R-spondin1 in zebrafish (Danio rerio) gonads. *Molecular Biology Reports*, 38(1), 275–282. https://doi.org/10.1007/S11033-010-0105-3
Zhao, J., Kim, K. A., De Vera, J., Palencia, S., Wagle, M., & Abo, A. (2009). R-Spondin1 protects mice from chemotherapy or radiation-induced oral mucositis through the canonical Wnt/beta-catenin pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(7), 2331–2336. https://doi.org/10.1073/PNAS.0805159106
Zhu, C., Jiang, Z., Xu, Y., Cai, Z. L., Jiang, Q., Xu, Y., … Tong, Q. (2020). Profound and redundant functions of arcuate neurons in obesity development. *Nature Metabolism*, 2(8), 763–774. https://doi.org/10.1038/S42255-020-0229-2

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

aa	:	Amino asit
AgRP	:	Agouti-İlişkili Peptit
AMPA	:	α-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoazolpropionik asit
ARC	:	Arkuat çekirdek
AVPV	:	Anteroventral periventriküler
BDNF	:	Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
CART	:	Kokain ve amfetaminle düzenlenen transkript
DMH	:	Dorsomedial hipotalamus
DMN	:	Dorsamedial çekirdek
FU	:	Furin benzeri sistein açısından zengin bölge
GLP-1	:	Glukagon benzeri peptid-1
GLP-2	:	Glukagon benzeri peptid-2
GPCRs	:	G protein-bağlı reseptörler
H. pylori	:	Helicobacter pylori
H/R	:	Hipoksi/reoksijenasyon
HCRTR1	:	Hipokretin reseptörü tip 1
HCRTR2	:	Hipokretin reseptörü tip 2
İ.s.v.	:	İntraserebroventriküler
Kainat	:	2-karboksi-3-karboksimetil-4-izopropenilpirolidin
LGR4	:	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 4/5/6
LH	:	Lateral hipotalamus
LHA	:	Lateral hipotalamik alan
LPBN	:	Lateral parabrakial çekirdek
MCR3/4	:	Melanokortin 3/4 reseptör
MCPO	:	Magnoselüler preoptik çekirdek
ME	:	Median eminens
MPO	:	Medial preoptik çekirdek
MSS	:	Merkezi sinir sistemi
NMDA	:	N-metil D-aspartat
NPY	:	Nöropeptid Y
NPYR	:	NPY G-protein bağlı reseptör
NST	:	Soliter traktus çekirdeği
OX1R	:	Oreksin-1 reseptörü
OX2R	:	Oreksin-2 reseptörü
PeV	:	Periventriküler çekirdek
POMC	:	Pro-opiomelanokortin
PVN	:	Paraventriküler çekirdek
RHC	:	Retrokiazmatik alan
RSPO1	:	Roof plate-spesifik spondin-1
RSPO2	:	Roof plate-spesifik spondin-2
RSPO3	:	Roof plate-spesifik spondin-3
RSPO4	:	Roof plate-spesifik spondin-4
SCN	:	Suprakiazmatik çekirdek
SON	:	Supraoptik çekirdek
SP	:	Sinyal peptidi
SPX	:	Speksin
TSP1	:	Trombospondin tip I tekrar domaini

VMH : Ventromedial çekirdek
ZI : Zona inserta
α-MSH : α-melanosit uyarıcı hormon

8. EKLER

Deney Hayvanları Etik Kurul Onayı **EK 1**

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
Görükle Yerleşkesi, 16059 Nilüfer/ BURSA-TÜRKİYE
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN ADI	*R-Spondin peptitlerini sentezleyen nöronlarda beslenmeye bağlı nöronal aktivasyon varlığının araştırılması ve glutamaterjik sistemin bu aktivasyondaki rolünün belirlenmesi*
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ KURUMU	Dr. Öğr. Üyesi Duygu GÖK YURTSEVEN BUÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD
	YARDIMCI ARAŞTIRICILAR	Prof. Dr. Özhan EYİGÖR Dokt. Öğr. Gonca TOPAL Yüks. Lis. Öğr. Miray BERBER
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Gonca TOPAL'ın Doktora Tez Projesi
	ARAŞTIRMANIN SÜRESİ	01.08.2022 – 01.02.2024
	KULLANILACAK HAYVAN TÜRÜ VE SAYISI	224 Adet Erkek – Dişi Sıçan

	Belge Adı	Tarihi
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	ARAŞTIRMA BAŞVURU FORMU	**29.05.2022**

KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 2022 - 08 / 08	Tarih : 07.06.2022
	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 Kabul	İmza Ret	Düşünceler
Prof. Dr. Gökhan GÖKTALAY Başkan	Tıp- Farmakoloji	Tıp Fakültesi	☐ E ■ H			
Dr.Öğr. Üyesi Sezer ERER KAFA Üye	Tıp - Tıp Tarihi ve Etik	Tıp Fakültesi	☐ E ■ H			
Dr.Öğr. Üyesi Diğdem YÖYEN ERMİŞ Üye	Tıp- İmmunoloji	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			
Doç. Dr. Arda SÖZCÜ 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

Doktora eğitimim boyunca bilimsel ve akademik vizyonuyla bana daima yol gösteren, öğrencisi olmaktan onur duyduğum, tezimin her aşamasında zamanını ve desteğini esirgemeyen değerli tez danışmanım Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Özhan Eyigör'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim ve tez sürecimde karşıma çıkan her zorlukta tecrübe ve bilgisinden sürekli yararlandığım, göstermiş olduğu hoşgörü ve desteğinden dolayı değerli hocam Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. F. Zehra Minbay'a sonsuz teşekkür ederim.

Doktora eğitim sürecimdeki tüm emeklerinden dolayı değerli hocalarım Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Semiha Ersoy'a, Prof. Dr. Berrin Avcı'ya, Doç. Dr. Sema Serter Koçoğlu'na ve Dr. Öğretim Üyesi Cihan Çakır'a saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın projelendirilmesinde destek olan, bu süreçte bilgi, birikim ve deneyimleriyle bana yol gösteren, doktora eğitimim süresince bana kattığı maddi ve manevi her değer için minnet duyduğum değerli hocam Dr. Öğretim Üyesi Duygu Gök Yurtseven'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tüm doktora sürecim boyunca ve tezimin her aşamasında benden ilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bilimsel vizyonu ve çalışma disiplini ile bana her zaman örnek olan değerli arkadaşım Uzman Dr. Nursel Hasanoğlu Akbulut'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın tüm deneysel aşamalarında büyük özveriyle bana yardım eden ve destek olan Yüksek Lisans Öğrencisi Aslıgül Bulut ve Yüksek Lisans Öğrencisi Talha Yasin Durdu'ya, bu süreçte manevi olarak hep yanımda hissettiğim değerli arkadaşlarım Uzman Dr. Zülal Uygul ve Uzman Dr. Ceren Oy'a teşekkür ederim.

Son olarak her koşulda yanımda olan sevgili ailem ve eşim Onur'a, bu süreci birlikte başarıyla atlattığımız canım oğlum Arel Efe'ye sonsuz teşekkür ederim.

10. ÖZGEÇMİŞ

yılında doğdu. Lise öğrenimini Bursa Anadolu Kız Lisesinde tamamladı. 2010 yılında Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesini kazandı ve 2016 yılında Veteriner Hekim olarak mezun oldu. 2019 yılında Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı.