NERGİS COŞKAN

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANA BİLİM DALI YÜKSEK LİSNANS TEZİ

2024

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

ANOREKSİJENİK PEPTİT SENTEZLEYEN NÖRONLARDA ÖSTROJEN RESEPTÖR EKSPRESYONUNUN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK BELİRLENMESİ

NERGİS COŞKAN

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

BURSA-2024

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

ANOREKSİJENİK PEPTİT SENTEZLEYEN NÖRONLARDA ÖSTROJEN RESEPTÖR EKSPRESYONUNUN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK BELİRLENMESİ

Nergis COŞKAN

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

DANIŞMAN:
Prof. Dr. Özhan EYİGÖR

Proje no: TYL-2023-1419 B.U.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi

BURSA-2024

T.C.

BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum **"Anoreksijenik peptit sentezleyen nöronlarda östrojen reseptör ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak 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.

Nergis COŞKAN

Tarih ve İmza

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

...../...../.....

Adı Soyadı: Nergis COŞKAN
Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji
Tez Konusu: Anoreksijenik peptit sentezleyen nöronlarda östrojen reseptör ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak 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 BEYANI II
KABUL ONAY..... III
TEZ KONTROL VE BEYAN FORMU IV
İÇİNDEKİLER..... V
TÜRKÇE ÖZET..... VII
İNGİLİZCE ÖZET..... VIII
TEZ KONUSUNUN KÜRESEL SÜRDÜRÜLEBİLİR KALKINMA HEDEFLERİ İLE İLİŞKİSİ..... IX
1.GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER..... 3
2.1. Hipotalamus 3
2.1.1. Hipotalamusun fonksiyonları 3
2.1.2. Hipotalamusun anatomisi 6
2.1.3. Hipotalamusun çekirdekleri 7
2.2. Phoeniksin 9
2.2.1. Phoeniksin'in hastalıklardaki önemi 11
2.2.2. Phoeniksinin besin alımındaki merkezi rolü 11
2.2.3. Phoeniksinin üremedeki merkezi rolü 12
2.3. R-Spondinler 12
2.3.1. R-Spondin 1 15
2.3.2. R-Spondin 3 15
2.3.3. R-Spondinlerin hastalıklardaki önemi 15
2.4. Steroid Hormonlar 16
2.4.1. Östrojen 16
2.5. Hipotalamo-Hipofizer-Gonadal Aks ve Östrojenin Feed-Back Mekanizması 18
2.6. Östrojen Reseptörleri 19
2.6.1. Östrojen reseptörlerinin yapısal özellikleri 19
2.6.1.1. GPER 22
2.6.2. Östrojen reseptörlerinin etki mekanizmaları 23
2.7. Dişi Sıçanlarda Östrus Döngüsü ve Smear Tayini 24
2.7.1. Östrus döngüsü 24
2.7.2.Smear tayini 25
3. GEREÇ VE YÖNTEM 26
3.1. Hayvanlar 26
3.2. Smear Tayini 26
3.3. Ovariektomi Prosedürü 28
3.4. Beyin Kesitlerinin Elde Edilmesi ve Saklanması 29
3.5. İmmünohistokimyasal Boyamaların Gerçekleştirilmesi 30
3.5.1. On Block işlemi 31
3.5.2. Phoeniksin nöronlarında östrojen reseptör alfa (ER-α) varlığının gösterildiği ikili indirekt immünperoksidaz protokolü 33
3.5.3. Phoeniksin nöronlarında östrojen reseptör alfa (ER-β) varlığının gösterildiği ikili indirekt immünperoksidaz protokolü 34
3.5.4. RSPO-1 nöronlarında östrojen reseptör alfa (ER-α) varlığının gösterildiği ikili indirekt immünperoksidaz protokolü 35
3.5.5. RSPO-1 nöronlarında östrojen reseptör alfa (ER-β) varlığının gösterildiği ikili

indirekt immünperoksidaz protokolü 36
3.5.6. RSPO-3 nöronlarında östrojen reseptör alfa (ER-α) varlığının gösterildiği ikili indirekt immünperoksidaz protokolü 37
3.5.7. RSPO-3 nöronlarında östrojen reseptör alfa (ER-β) varlığının gösterildiği ikili indirekt immünperoksidaz protokolü 38
3.6. Preparatların İncelenmesi, Hücre Sayımı ve İstatistiksel Analiz 39
4. BULGULAR 41
4.1. İmmünohistokimyasal İşaretlemeler 41
4.2. Phoeniksin, RSPO-1, RSPO-3 Nöronlarında Östrojen Reseptörlerinin Varlığı . 48
4.2.1. Phoeniksin nöronlarında östrojen reseptörlerinin varlığı 48
4.2.1.1. Phoeniksin nöronlarında ER-α ekspresyonu 48
4.2.1.2. Phoeniksin nöronlarında ER- β ekspresyonu 52
4.2.1.3. Hipotalamustaki phoeniksin nöronlarında östrojen reseptörlerinin ekspresyonunun gruplar arası karşılaştırılması 56
4.2.2. RSPO-1 nöronlarında östrojen reseptörlerinin varlığı 57
4.2.2.1. RSPO-1 nöronlarında ER-α ekspresyonu 57
4.2.2.2. RSPO-1 nöronlarında ER- β ekspresyonu 60
4.2.2.3. Hipotalamustaki RSPO-1 nöronlarında östrojen reseptörlerinin ekspresyonunun gruplar arası karşılaştırılması 64
4.2.3. RSPO-3 nöronlarında östrojen reseptörlerinin varlığı 65
4.2.3.1. RSPO-3 nöronlarında ER-α ekspresyonu 65
4.2.3.2. RSPO-3 nöronlarında ER- β ekspresyonu 68
4.2.3.3. Hipotalamustaki RSPO-3 nöronlarında östrojen reseptörlerinin ekspresyonunun gruplar arası karşılaştırılması 72
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 73
6. KAYNAKLAR 80
7. SİMGELER VE KISALTMALAR 87
8. EKLER 89
9. TEŞEKKÜR 90
10. ÖZGEÇMİŞ 91

TÜRKÇE ÖZET

Dişilerde üreme fonksiyonu besin alımı ile yakından ilişkilidir çünkü dişilerde üreme fonksiyonu yüksek enerji kullanımı gerektirir. Phoeniksin (PNX), R-Spondin 1 (RSPO-1) ve R-Spondin 3 (RSPO-3) besin alımını baskılayan anoreksijenik peptitlerdir ve hipotalamusta yerleşik nöronlar tarafından sentezlenir ve salgılanır. Östrojen ise metabolizma ve enerji homeostazında rol oynayan, ovaryumdan salgılanan önemli bir hormondur. Nükleer reseptör protein ailesine ait ER-α, ER-β ve GPER olmak üzere üç tip reseptörü vardır. Bu çalışma anoreksijenik peptit sentezleyen nöronların periferik östrojen sinyalini almak için ER-α ve/veya ER-β reseptörlerini eksprese edip etmediğini ve östrojenin miktarına göre reseptör miktarındaki değişiklikleri saptamayı amaçlamıştır. Bu amaçla, Phoeniksin, RSPO-1 ve RSPO-3 nöronları ile ER-α, ER-β kolokalizasyonu, yüzen kesitlerde ikili immünohistokimyasal tekniği kullanılarak araştırılmıştır. Çalışmada erişkin 200-250g Wistar türü sıçanlar kullanılmıştır. ER-α, ER-β içeren Phoeniksin, RSPO-1 ve RSPO-3 nöronlarının tüm Phoeniksin, RSPO-1 ve RSPO-3 nöronları içerisindeki oranı hesaplanmıştır. Ventromedial çekirdekte Phoeniksin nöronlarındaki ER-α için proöstrus ve ovariektomi grupları arasında istatiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Supraoptik çekirdekte RSPO-3 nöronlarındaki ER-β için proöstrus ve ovariektomi grupları arasında istatiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Ayrıca hipotalamusta östrojen reseptörlerini eksprese eden Phoeniksin, RSPO-1 ve RSPO-3 nöronların yüzdesi proöstrus ve ovariektomi grupları arasında karşılaştırıldığında ovariektomi grubunda ER-α ve ER-β arasında istatiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Ancak proöstrus grubunda bulunamamıştır. Sonuç olarak Phoeniksin, RSPO-1 ve RSPO-3 nöronlarında ER-α ve ER-β literatürde ilk defa gösterilmiş olup bu nöronların aktivitesini ER-α ve ER-β üzerinden etkileyebileceği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Östrojen reseptörü, Phoeniksin, R-Spondin, Hipotalamus, İmmünohistokimya

İNGİLİZCE ÖZET

'Immunohistochemical Determination of Estrogen Receptor Expression in Anorexigenic Peptide Synthesizing Neurons'

Reproductive function in females is closely related to food intake because reproductive function in females requires high energy use. Phoenixin (PNX), R-Spondin 1 (RSPO-1) and R-Spondin 3 (RSPO-3) are anorexigenic peptides that suppress food intake and synthesized and secreted by neurons located in the hypothalamus. Estrogen is an important hormone secreted from the ovary that plays a role in metabolism and energy homeostasis. It has three types of receptors belonging to the nuclear receptor protein family: ER-α, ER-β and GPER. This study aimed to determine whether neurons synthesizing anorexigenic peptides express ER-α and/or ER-β receptors to receive peripheral estrogen signals and to determine changes in the amount of receptors according to the amount of estrogen. For this purpose, colocalization of ER-α, ER-β with phoenixin, RSPO-1 and RSPO-3 neurons was investigated using double immunohistochemical technique on floating sections. Adult 200-250g Wistar rats were used in the study. The ratio of ER-α, ER-β containing phoenixin, RSPO-1 and RSPO-3 neurons within all phoenixin, RSPO-1 and RSPO-3 neurons was calculated. A statistically significant difference was found between the proestrus and ovariectomy groups for ER-α in phoenixin neurons in the ventromedial nucleus. A statistically significant difference was found between the proestrus and ovariectomy groups for ER-β in RSPO-3 neurons in the supraoptic nucleus. In addition, when the percentage of Phoenixin, RSPO-1 and RSPO-3 neurons expressing estrogen receptors in the hypothalamus was compared between the proestrus and ovariectomy groups, a statistically significant difference was found between ER-α and ER-β in the ovariectomy group. However, it was not found in the proestrus group. In conclusion, Phoenixin, RSPO-1 and RSPO-3 neurons were shown for the first time in the literature as ER-α and ER-β and it was thought that it could affect the activity of these neurons via ER-α and ER-β.

Keywords: Estrogen receptor, Phoenixin, R-Spondin, Hypothalamus, Immunohistochemistry

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



Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum **"Anoreksijenik Peptit Sentezleyen Nöronlarda Östrojen Reseptör Ekspresyonunun İmmünohistokimyasal Olarak Belirlenmesi"** başlıklı tez **3.** Küresel Sürdürülebilir Kalkınma Hedefleri ile ilişkilidir.

1.GİRİŞ

İnsanlar, enerjiyi vücut yağı olarak depolar. Evrimsel olarak açlığın önlenmesi ve üreme yeteneğinin korunması için enerjinin depolanması önemlidir (Heitmann ve ark., 2012). Beslenme bütün hayvanlar için gereklidir ve homeostatik mekanizmalar ile regüle edilir (Challet, 2019). Enerji dengesi, organizmanın hayatta kalma başarısının temel belirleyici faktörüdür (Waterson, & Horvath, 2015). Enerji alımında artış ve enerji harcanmasındaki azalma pozitif-enerji dengesi, enerji alımında azalış ve enerji harcanmasındaki artış negatif-enerji dengesi olarak tanımlanmaktadır (Hill, Wyatt, & Peters, 2013; Ross, Soni, & Houle, 2020). Enerji dengesinin sağlanmasında 3 terim önemlidir. Bunlar; besin alımı ile enerji artışı, ısı olarak enerji azalışı ve yağlı ve yağsız kütle seklindeki vücut enerjisidir. Enerji dengesi, besin alımı ve enerji tüketimi arasındaki dengeyi düzenleyen mekanizmalar ile gerçekleşir. Birbirini tamamlayan iki mekanizma vardır. Birincisi, glikoz seviyesine göre besin alınımını düzenleyen nöroendokrin mekanizmadır. İkincisi ise vücut yağ kütlesini düzenleyen otonom bir mekanizmadır. Besin alımının düzenlenmesi sempatik ve parasempatik sinir sistemi tarafından kontrol edilir ve hipotalamusta bulunan ventromedial çekirdek tarafından kontrol edilir (Le Magnen, 1984).

Enerji alımı ve harcanması arasındaki dengesizlik bazı hastalıklara yol açabilmektedir. Obezite buna bir örnektir. Obezite, yağ dokusunun artışına katkıda bulunan besin alımı ve enerji tüketimi arasındaki dengesizlikten kaynaklanır (Marcelin, Silveira, Martins, Ferreira, & Clément, 2019). Kalorili gıdalar ve hareketsiz yaşam tarzı ile karakterize obezojenik ortamlar nedeniyle obezite oranı dünya çapında artmıştır. Aynı zamanda obezite kalp rahatsızlığı, inme, osteoartrit, diyabet ve üreme bozukluklarını arttırdığı yapılan çalışmalarca bildirilmiştir (Lainez, & Coss, 2019). Obezite, bütün dünyada multifaktöriyel, kompleks ve halk sağlığı sorunu haline gelmiştir (Crovesy, & Rosado, 2019). Obezitenin prevalansı çoğu ülkede erkeklere oranla kadınlarda daha fazladır (Cooper, Gupta, Moustafa, & Chao, 2021). Besin alımı ve enerji tüketimi besin durumu ve adipozite hakkında merkezi sinir sistemine feed-back sağlayan periferal sinyaller ile regüle edilir (Mitchell, & Begg, 2021). Beyin enerji homeostazının devamlılığı için metabolik ve davranışsal cevaplar verir ve bunun için iç ve dış uyaranları birleştiren nöronal devreleri harekete geçirir (Waterson, &

Horvath, 2015). Beslenme davranışında hipotalamusun rolü önemlidir (Waterson, & Horvath, 2015). Östrojenler, glukozun algılanması ve anti-obezojenik etkileri gibi metabolik disregülasyon üzerindeki koruyucu etkileriyle tanımlanmaktadır. (Krolick, & Shi, 2022) Östrojenin metabolik etkileri özellikle östrojen reseptörü α (ER-α) sayesinde çalışır. ER-α cinsiyetler arasında farklılık gösterir ve enerji metabolizmasını regüle eden hipotalamik çekirdeklerde ve tipik olarak enerji homeostazı ile ilişkili olmayan ekstrahipotalamik limbik bölgelerde eksprese edilir (Krolick, & Shi, 2022). Bu çalışma Phoeniksin (PNX), R-Spondin 1 (RSPO-1), R-Spondin 3 (RSPO-3) sentezleyen hipotalamik nöronların üzerindeki östrojen reseptörlerini göstermeyi amaçlamıştır. Bu çalışmada, beslenme ile ilişkili sinyallerin üreme sistemi üzerindeki etkilerinin nöroendokrin olarak düzenlenmesi araştırılmıştır. Bu kapsamda Phoeniksin, RSPO-1, RSPO-3 sentezleyen nöronlarda östrojen reseptörlerinin belirlenmesinde belirteç olarak Phoeniksin, RSPO-1, RSPO-3 peptitlerine ve periferik gonadal sinyalleri direkt olarak alıp alamadıklarını belirlemek amacıyla da bu peptitleri sentezleyen nöronlarda ER-α ve ER-β reseptörlerine karşı ikili immünohistokimyasal işaretlemeler yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

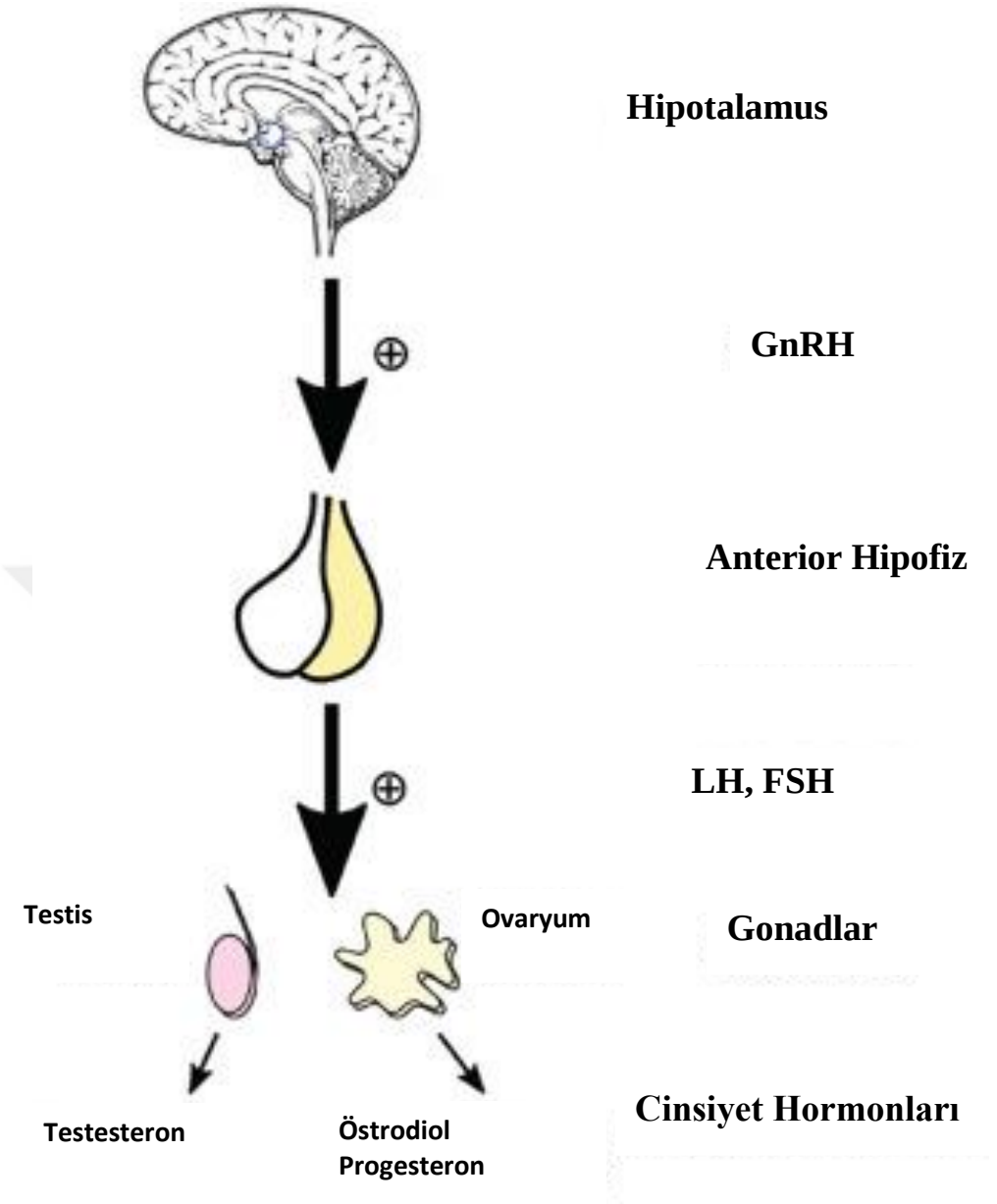
2.1. Hipotalamus

2.1.1. Hipotalamusun fonksiyonları

Omurgalılarda beynin limbik bölümünün bir parçası olan hipotalamus savunma, enerji ve vücut ısısındaki değişiklikler gibi değişen dış koşulları telafi etmek için iç ortamı düzenler yani kısaca homeostazı sağlar. Hipotalamus homeostazı sinir sitemi ve endokrin sistem aracılığıyla kontrol eder.

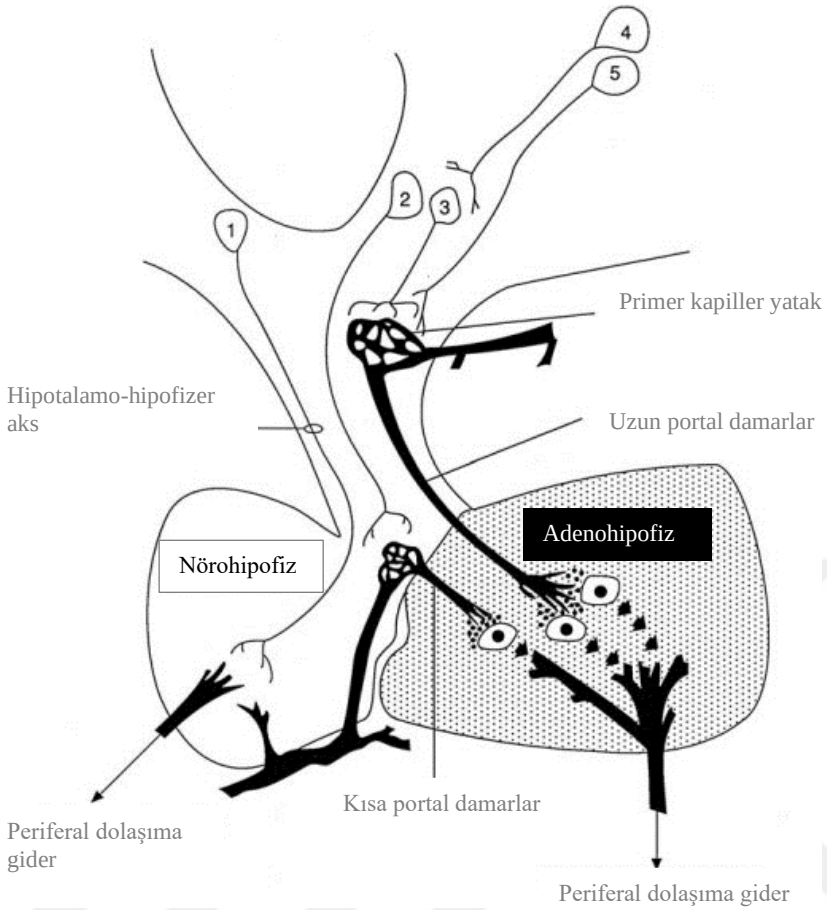
Sinir sistemi, otonomik ve davranışsal süreçlerde görev almaktadır. Otonomik süreçlere örnek olarak kardiyovasküler sistemde kan akımının artması veya azalmasını sağlaması, vazodilatasyon veya vazokonstrüksiyonda görevli olması verilebilir. Ayrıca termoregülatör etki olarak kan akımı, titreme ve soluma işleminde görevlidir. Viseral fonksiyon olarak ise sindirim asidinin sekresyonunun artmasını sağlar. Davranışsal süreçlere örnek olarak beslenme davranışlarının düzenlenmesini sağlaması ve cinsel davranışlarda görevli olması örnek verilebilir. Ek olarak yuva yapma davranışında görevlidir. Duygusal davranışlardan ise saldırganlıkta görevlidir (Freeman, Grattan, & Houpt, 2008).

Endokrin sistem, hipofiz bezinin kontrolünü sağlar. Ön hipofiz (adenohipofiz), büyüme ve emzirmeye ek olarak adrenal, tiroid ve gonadal fonksiyonları düzenleyen hormonları sentezler. Ön hipofiz hormonlarının sentezlenmesi ve salgılanması, hipotalamik nöronlardan sentezlenen peptit ve aminler ile düzenlenir. Bu peptit ve aminler hipotalamo-hipofiz portal sistem (vasküler bir yol) ile adenohipofize taşınır. Adenohipofiz de hormon sentezini ya stimüle eder ya da inhibe ederek etkisini gösterir (Freeman ve ark., 2008) (Şekil 1).



Şekil 1. Hipotalamo-hipofiz-gonadal aks (Ortiz, Green, Rampal, & Rowe, 2022'den modifiye edilmiştir.)

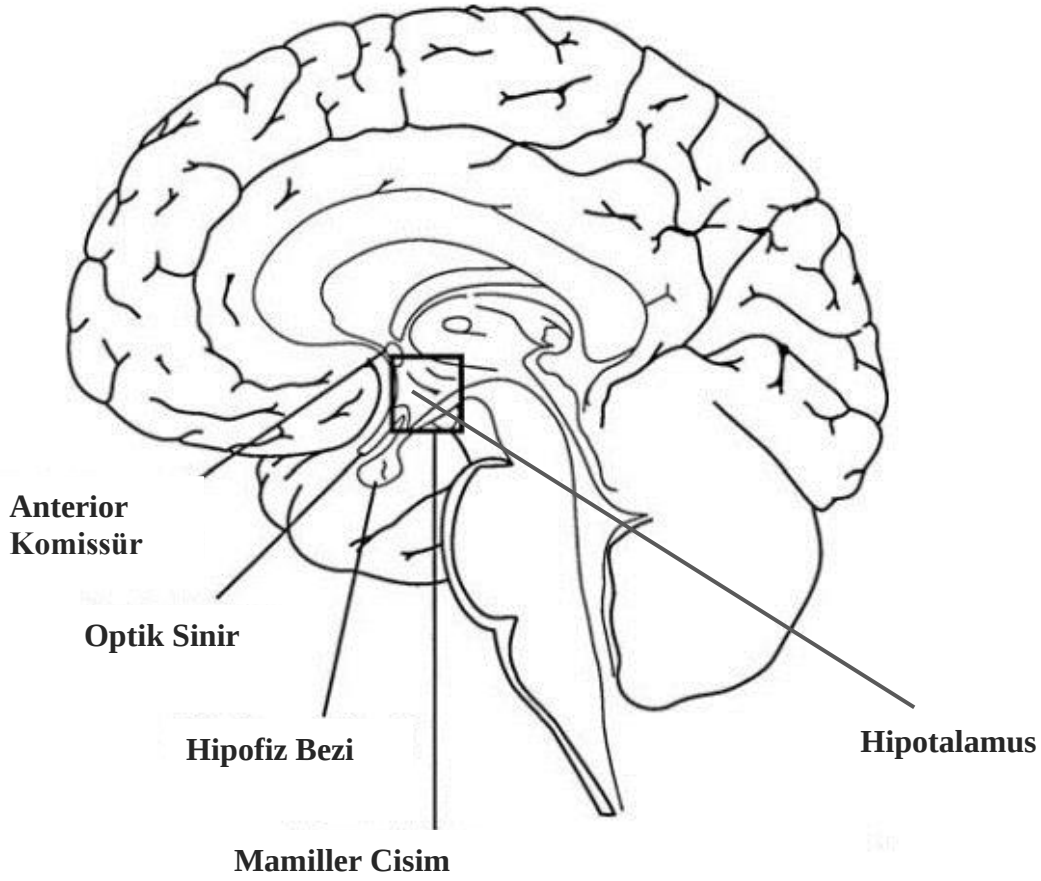
Arka hipofiz (nörohipofiz) hormonları, hipotalamik nöronlar tarafından sentezlenip ve salgılandıktan sonra hipotalamo-hipofizer aks ile aksonal olarak nörohipofize taşınır ve sinüzoidlere salınır. Böylece periferal dolaşıma katılarak kan basıncını, su dengesini ve süt çıkışını düzenler (Freeman ve ark., 2008).



Şekil 2. Nörohipofiz ve adenohipofizin hipotalamus tarafından kontrolü. *Nöron 1* nörohipofizdeki sinüzoidlere oksitosin veya vazopressin salgılayan hipotalamusun supraoptik veya paraventriküler çekirdeklerinden gelen peptiderjik bir magnoselüler nörondur. Bu iki çekirdeğin aksonları nörohipofize gider. *Nöron 2*, nörohipofiz ile adenohipofiz arasında bir iletişim yolunu temsil eden kısa portal damarların bitişiğinde sonlanan hipofizyotropik peptiderjik veya aminerjik bir nöron olabilir. Hipotalamik salınım veya salınımı inhibe eden peptiderjik nöronlar bu tiptedir. Ayrıca tuberohipofizeal dopaminerjik nöronlar da bu tiptedir. *Nöron 3* aynı zamanda hipofizyotropik peptiderjik veya aminerjik bir nöron olabilir. Bu durumda nöron, medyan eminens'in birincil kılcal yatağında sonlanır. Aynı zamanda, uzun portal damarlar yoluyla adenohipofize ulaşan portal kan içine salınımını veya salınımını inhibe eden peptitleri de salgılar. Tuberoinfundibular dopaminerjik nöronlar da bu tiptedir. Hücre gövdeleri arkuat ve periventriküler çekirdekler içinde yer alan ve median eminensteki primer kapiller yatakta sonlanan nöronlar, infundibular yolu oluşturur. Beynin geri kalanı ile hipofiz bezi arasındaki bağlantı, *4 ve 5 numaralı nöronlarla* temsil edilir. Bunlar, hipofizyotropik nöronlar üzerinde nörotransmiterler veya nöromodülatörler olarak görev yapan katekolaminleri (ve bazı durumlarda peptidleri) salgılayan nöronlardır. *Nöron 4*'ün sonlanması akso-dendritik veya akso-somatiktir ve *nöron 5*'in sonlanması akso-aksoniktir. (Freeman ve ark., 2008'den modifiye edilmiştir.)

2.1.2. Hipotalamusun anatomisi

Diensefalonun en altında bulunur. Rostral sınırı anterior komissür'ün ön sınırı, lamina terminalis ve optik kiazmadan dik çizilen çizgi ile sınırlıdır. Kaudal sınırı ise hipotalamus interpedinküler fossayı sınırlarken mamiller cismin arka sınırı boyunca çizilen dik çizgi ile sınırlandırılır. Üst sınırı, talamusla sınırlandığı için hipotalamik sulkustur ve Alt sınırı, hipotalamus ile hipofiz bezi arasındaki infundibulum'u oluşturmak üzere daralan şişkin tuber cinereum'dur. Yan sınırları, iç kapsül ve onun kaudal sınırları tarafından sınırlandırılır. Ancak hipotalamik gri maddenin komşu yapılarla karışması nedeniyle bu tanım yeterli değildir (Freeman ve ark., 2008) (Şekil 3).



Şekil 3. Hipotalamusun anatomik yerleşimi ve çevresindeki yapılar (Freeman ve ark., 2008'den modifiye edilmiştir.)

2.1.3. Hipotalamusun çekirdekleri

Paraventriküler çekirdek (PVN): Üçüncü ventrikülün hemen yanında hipotalamik sulkusun altında preoptik bölgede bulunur. İnsan da medial hipotalamusta magnosellüler nöronlar bulunurken paraventriküler çekirdeğin periventriküler kısmında daha çok parvosellüler nöronlar bulunur. Oksitosin ve vazopressin'in salgılanmasından sorumlu olan bu nöronlar hipotalamo-hipofizer aks aracılığıyla nörohipofiz ile bağlantı halindedir (Şekil 4).

Supraoptik çekirdek (SON): Optik traktus başlangıcının hemen üzerinde bulunur. Büyük anterolateral subnükleus ve daha küçük bir posteromedial subnükleus olmak üzere 2 parçadan oluşur. Magnoselüler ve parviselüler hücreleri vazopressin ve oksitosin üretir ve PVN'de olduğu gibi hipotalamo-hipofizer aks aracılığıyla nörohipofiz ile bağlantı halindedir (Şekil 4).

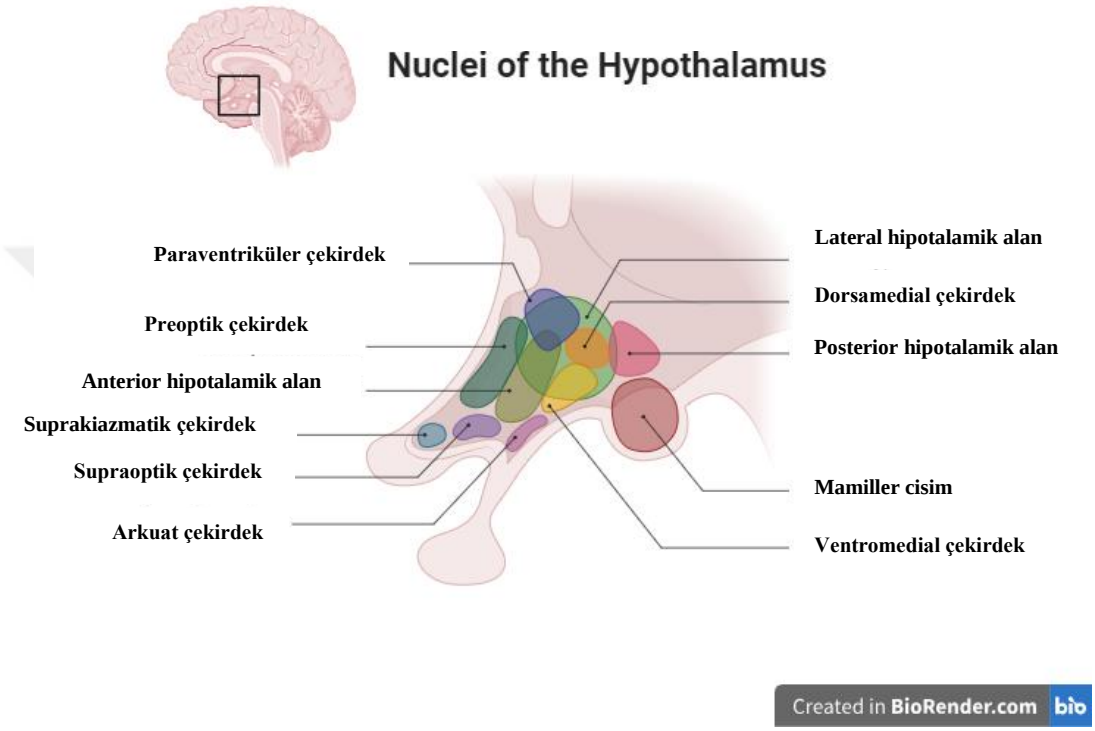
Ventromedial çekirdek (VMN): İnsanda ventromedial çekirdeğin sınırları belirgin değildir. Tuberal bölgede medial hipotalamik alanda yer alır ve diensefalonun tabanında optik tractus ile arkuat çekirdek arasında uzanır (Şekil 4).

Dorsomedial çekirdek (DMN): Arka hipotalamik alana uzanır. Yan sınırları mammiller cisime inen forniks ile sınırlanmıştır (Şekil 4).

Arkuat çekirdek (ARC): İnfundibular bölgenin tabanında bulunur ve periventriküler bölgeyi kaplar. Medyan eminensin orta hattı boyunca uzanan ve lateral olarak medial hipotalamusa doğru uzanan çekirdektir. Burada bulunan nöronlar damarlarla yakın ilişki içindedir ve parvisellüler nöronların kısa aksonları vardır (Şekil 4).

Lateral hipotalamik alan (LHA): Hipotalamusun büyük bir kısmını oluşturur. Medial hipotalamik alandan, mamiller cisme doğru inen postkommissural forniks ile ayrılır. Nöronları belirgindir ve forniksin lateralinde yer alan lateral tüberal çekirdek ve arka hipotalamustaki tüberomammiller çekirdekte bulunur. Bazal hipotalamik yüzeyde küçük çıkıntılar oluşturabilir. Ayrıca medial ön beyin demetinin antero-posterior düzenlenmiş liflerini de içerir (Şekil 4).

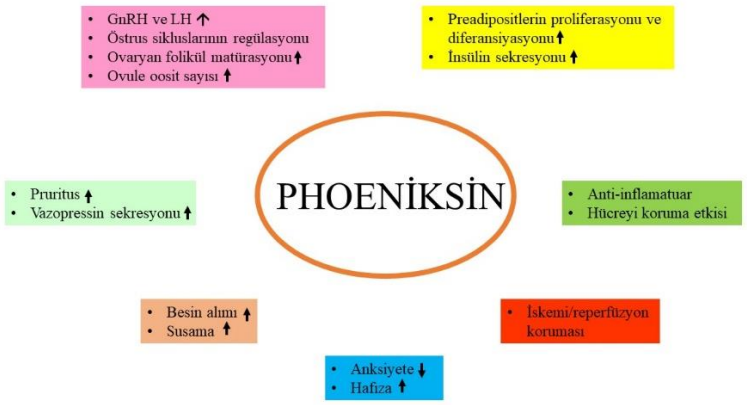
Periventriküler çekirdek (Pe): Küçük nöronlardan oluşur ve hipofiz bezinin kontrolünden sorumludur. Ön hipotalamik alan ile ilişkili olan ve sirkumventriküler organ olarak adlandırılan telensefalik yapılar da bu bölgede bulunur. Bunlar lamina terminalisin organum vasculosum'u (OVLT) ve subfornikal organdır (Dudás, 2013; Freeman ve ark., 2008) (Şekil 4).



Şekil 4. Hipotalamusun çekirdekleri

2.2. Phoeniksin

Phoeniksin (PNX), ağrı regülasyonu, pruritus, anksiyete, hafıza, adipogenez, AVP (vazopressin) sekresyonu, insülin sekresyonu, antiinflamatuar etki, üreme ve beslenme ile ilişkili bir nöropeptittir (Billert, Rak, Nowak, & Skrzypski, 2020; Kaiya, 2021) (Şekil 5).

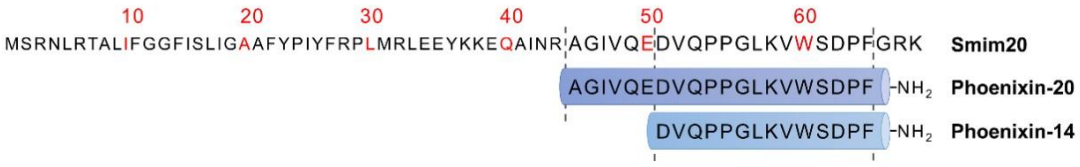


Şekil 5. Phoeniksin'in işlevleri (Billert ve ark., 2020'den modifiye edilmiştir.)

PNX, Yosten ve arkadaşları tarafından 2013 yılında bulunmuştur. Daha önce bilinmeyen nöropeptitlerin bulunmasını sağlayan ve İnsan Genom Projesinin oluşturduğu yeni biyoinformatik algoritma kullanılarak tanımlanmıştır (Pałasz, Janas-Kozik, Borrow, Arias-Carrión, & Worthington, 2018).

Bu peptit'in çeşitli hayvan türlerinde yüksek oranda korunduğu bilinmektedir (Billert ve ark., 2020). Bu nöropeptitin yaygın olarak bilinen ve aminoasit sayısına göre sınıflandırılmış PNX-14 (14aa) ve PNX-20 (20aa) olmak üzere iki izoformu vardır (Şekil 6). Bunun ötesinde 17-,26-,36- ve 42- amino asit izoformları olduğu da tahmin edilmektedir.

PNX, Smim20 (Small integral membrane protein 20) olarak da adlandırılan C4orf52 proteininin C-terminalinin proteolitik klivajı ile oluşan bir peptit olarak tanımlanır. Smim20 iç mitokondriyal membran proteinidir ve yeni sentezlenen sitokrom C oksidaz subünit I' i (MTCO1 veya COX1) stabilize ederek sitokrom C oksidaz'ın (kompleks IV) biyogenezinde işlev görür (Billert ve ark., 2020; Kaiya, 2021).



Şekil 6. PNX prekürsör peptit Smim20'nin aminoasit dizilimi ve PNX'in iki izoformu: PNX-14 ve PNX-20 (Billert ve ark., 2020)

PNX' in aynı kökenli reseptörü, beyinde eksprese edilen süper korunmuş reseptör ailesine ait SREB3 (super conserved receptor expressed in the brain 3) ya da G protein kenetli reseptör ailesine ait GPR173 (G Protein-Coupled Receptor 173) olarak tanımlanır (Stein ve ark., 2016) ve insanda 373 amino asitten oluşur. SREB3/GPR173 insanda Xp11.22'de bulunur. SREB ailesinin SREB1(GPR27), SREB2(GPR85), SREB3(GPR173) olmak üzere 3 üyesi bulunur (Billert ve ark., 2020). SREB3' ün amin GPCR' ler ile yüksek sekans benzerliği vardır (Kaiya, 2021)

Smim20 geni insanlarda 4p15.2'de, sıçanlarda 14q11'de ve farelerde 5 C1'de bulunur ve mRNA üç ekzondan oluşur (Kaiya, 2021). Smim20 mRNA'nın hipotalamus, hipofiz ve overdeki seviyeleri, GnRH-R agonisti (buserelin) ve antagonistinin (cetrorelix) uygulanmasından sonra artarken GPR173 mRNA seviyesi hipotalamus ve hipofizde azalır (Suszka-Świtek ve ark., 2019).

PNX, santral sinir sisteminde; zona inserta, substansia nigra, edinger-westphal çekirdek, nukleus traktus solitarius, santral amigdaloid çekirdek, raphe pallidus, area postrema, hipofiz, serebellum, pons, omurilik ve dorsal kök ganglionunda bulunur. Hipotalamusta (hücrelerin %21-32'sinde bulunur); periventriküler çekirdek (Pe), paraventriküler çekirdek (PVN), ventromedial çekirdek (VMN), supraoptik çekirdek (SON), lateral hipotalamik alan (LHA), arkuat çekirdek (ARC) ve median eminens (ME)'te bulunur. Periferal dokulardan ise kalp, timüs, akciğer, solungaç, özefagus, mide, duodenum ve jejenum kriptaları arasındaki hücrelerde, ileum, kolon, pankreas, karaciğer, adipositler, böbrek, dalak, ovaryum, ovaryan foliküller, testis, kaslar ve deride bulunur (Billert ve ark., 2020; Pałasz, Rojczyk, Bogus, Worthington, & Wiaderkiewicz, 2015).

2.2.1. Phoeniksin'in hastalıklardaki önemi

Polikistik over sendromu (PKOS) hastalarında serum PNX-14, LH (luteinizan hormon) ve androjen konsantrasyonları önemli ölçüde artmıştır. PNX-14 konsantrasyonlarının LH ve testesteron konsantrasyonları ile pozitif korelasyonları, PNX-14'ün PKOS gelişiminde olası bir rolü olduğunu düşündürür.(Ullah ve ark., 2017). PNX serum seviyeleri, anoreksiya nervoza gibi yeme bozukluklarının bazı semptomları ile ilişkilidir (Kaiya, 2021).

2.2.2. Phoeniksinin besin alımındaki merkezi rolü

PNX-14'ün intraserebroventriküler (i.s.v.) olarak uygulanmasının besin alımını arttırdığı bildirilmiştir (Friedrich ve ark., 2019). Yapılan diğer çalışmalar ise SON, PVN ve NTS (nükleus traktus solitorius)'nin medial parçası tarafından yönetildiğini göstermiştir.

Sıçan hipotalamik çekirdeklerinde nesfatin-1 nöronları ile PNX nöronları kolokalizasyon gösterildiği bildirilmiştir (Friedrich ve ark., 2019). Bu iki peptitin karşıt işlevselliğinin olması nesfatin-1' e karşı PNX' in dengeleyici bir rolü olduğunu düşündürmüştür (Friedrich, & Stengel, 2021).

Erkek Sprague-Dawley sıçanlarda, aydınlık fazda PNX-14' ün i.s.v. enjeksiyonu su alımı, lokomotor veya tımarlanma davranışı üzerinde herhangi bir etkisinin olamamasına rağmen doza bağımlı bir şekilde besin alımının artışını indükler (Kaiya, 2021).

Shalla ve ark. yaptıkları bir çalışmada erişkin erkek Sprague-Dawley cinsi sıçanlara PNX-14 ün i.s.v. olarak uygulanması aydınlık fazda besin alımını arttırırken, karanlık fazda ara öğün aralıklarını azaltır. Ayrıca aydınlık fazda yeme oranı ve yeme süresini arttırırken karanlık fazda azaltır. PNX-14'ün intravenöz (i.v.) uygulanması ne aydınlık faz da ne de karanlık fazda etki göstermemiştir (Schalla, & Stengel, 2018). Ek olarak erkek Sprague-Dawley sıçanlarında aydınlık faz sırasında intraperitoneal (i.p.) PNX-14 enjeksiyonu da besin alımını etkilemez (Schalla ve ark., 2017).

PNX'in sıçanlara i.s.v. olarak uygulanması aynı zamanda immün-reaktif c-Fos pozitif hücreler, c-Fos/nesfatin-1 ve NUCB2/nesfatin-1 hücrelerin artışına neden olur (Billert ve ark., 2020).

Sıçanlar dışında, PNX'in balıklar üzerinde besin alımına etkisini araştıran birçok çalışma da mevcuttur.

Wang ve ark. *scatophagus argus* cinsi balıklarla yaptıkları bir çalışmada hipotalamusta açlık sırasında Swim20 mRNA ekspresyonunu artarken, tokluk sırasında azaldığını gözlemlemişlerdir ve PNX'in *scatophagus argus* cinsi balıklar için oreksijenik olabileceği görüşünü ortaya atmışlardır (Wang ve ark., 2018).

Fakat Rajeswari ve ark., zebra balıkları ile yaptıkları bir çalışmada ise 7 gün açlıktan sonra beyinde Swim20 ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir. Yine aynı çalışmada PNX-20'nin intraperitoneal (i.p.) enjeksiyonunun besin alımını azalttığı bildirilmiştir (Rajeswari, Blanco, & Unniappan, 2020).

2.2.3. Phoeniksinin üremedeki merkezi rolü

PNX-R, CREB' in fosforilasyonuna yol açan cAMP/protein kinaz A (PKA) yolunu aktive eder, potansiyel olarak C/EBP-β ve /veya Oct-1 GnRH, GnRH-R ve Kiss1 gen ekspresyonunu arttırır ve sonuç olarak PNX üreme fonksiyonu üzerinde uyarıcı bir etkiye sahiptir (Treen, Luo, & Belsham, 2016).

PNX, östrus döngüsünü HPG aksı (hipotalamo-hipofiz-gonadal aks) üzerinden etkiler. PNX, GnRH ve kisspeptitin pozitif regülatörü olup GnRH'ı arttırıp hipofiz hücrelerinden LH salınımını stimüle eder. Ek olarak oosit olgunlaşmasını uyarır ve ovüle oosit sayısını artırır (Billert ve ark., 2020).

2.3. R-Spondinler

R-Spondin (RSPO) protein ailesi, Wnt/ β -katenin sinyalini artırarak proliferatif kök hücre büyümesi ve gelişmesinde pleiotropik işlevlere sahiptir (ter Steege, & Bakker, 2021). Yapılan bir çalışmada RSPO-1 ve RSPO-3 'ün besin alımını engelleyerek anoreksijenik etki gösterdiği bulunmuştur (Li ve ark., 2014). RSPO (roof plate-spesifik spondin) geninin adı, embriyoların nöral tüpünün çatı plakasında

eksprese edilen fare RSPO-1 geninden gelmektedir (Jin, & Yoon, 2012). R-Spondinler, trombospondin süper ailesinin üyeleridir.

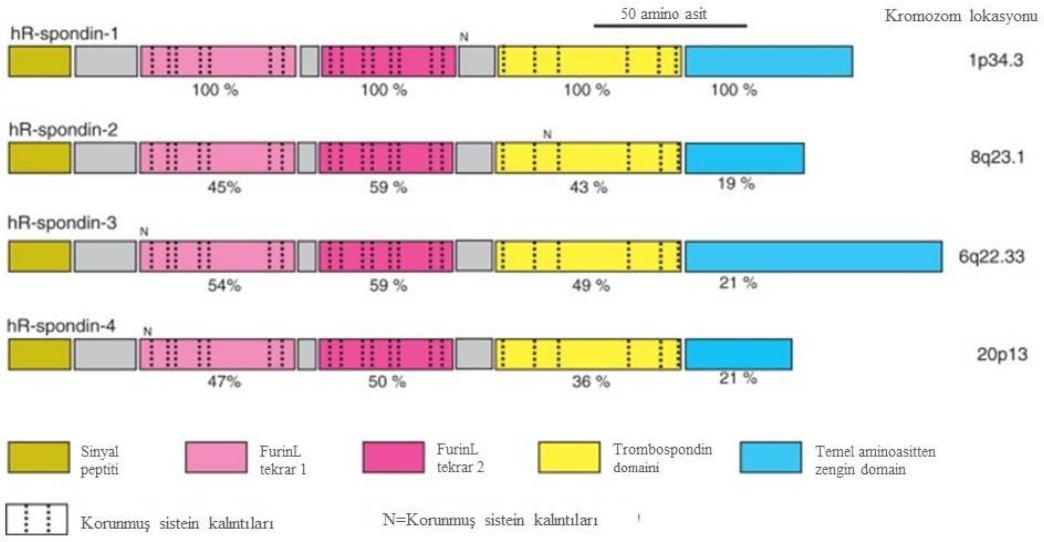
RSPO gen ailesinin ilk üyesi olan hPWTSR (sonrasında hRSPO-3 olarak isimlendirilmiştir), insan fetal beyin cDNA kütüphanesinin sekanslama çalışmaları sırasında bulunmuştur (Jin, & Yoon, 2012) .

R-Spondin homologları tüm omurgalılarda, *Branchiostoma floridae* gibi ilkel kordalılarda, *Saccoglossus kowalevskii* gibi hemikordata filumunda ve *Strongylocentrotus purpuratus* gibi derisi dikenlilerde bulunur ancak Drosophila veya Caenorhabditis gibi omurgasız model organizmalarda veya başka herhangi bir ilkel hayvanda R-Spondin homologu ya da R-Spondin bulunmaz. (de Lau, Snel, & Clevers, 2012).

Memelilerde, RSPO protein ailesi, RSPO-1, RSPO-2, RSPO-3, RSPO-4 olmak üzere dört üyeden oluşur (Kazanskaya ve ark., 2004). R-Spondin 1, 263 amino asittir ve kromozom lokalizasyonu 1p34.3'tür. R-Spondin2, 243 amino asittir ve kromozom lokalizasyonu 8q23.1'dir. R-Spondin 3, 292 amino asittir ve kromozom lokalizasyonu 6q22.33'tür. R-Spondin 4, 234 amino asittir ve kromozom lokalizasyonu 20p13'tür (de Lau ve ark., 2012) (Şekil 7).

Sekresyonları için N-terminalinde hidrofobik bir sinyal peptit dizisi, 92-94 amino asit uzunluğunda birbirine komşu sistein açısından zengin furin benzeri domain (FU-like CR), 55-57 amino asit uzunluğunda spondin tip I tekrar domaini (TSR) ve C-terminalinde değişen uzunluktaki bir bazik amino asit'ten zengin domain (BR) gerekir (Kazanskaya ve ark., 2004) (Şekil 7).

Memeli R-Spondinleri benzer beş ekzonlu gen organizasyonuna ve protein domain yapısına sahiptir. Amino terminal hidrofobik sinyal peptidi (amino-terminal endoplazmik retikulum sinyal peptit), salgılamanın ekson 1 tarafından kodlanmasını sağlarken, Ekson 2 ve 3 iki adet, sisteinden (15 tane sistein) zengin furin tekrar domainini kodlar. Ekson 4 tek TSP1 (60 amino asit korunur) domainini kodlar. Ekson 5, proteindeki yalnızca yüksek yoğunluklu bazik amino asitlerle karakterize edilen bir bölgeyi kodlar (de Lau ve ark., 2012) (Şekil 7).



Şekil 7. Üç tür domain vardır; iki adet sistein açısından zengin furin benzeri tekrar domaini, bir adet trombospondin domaini ve bir adet bazik amino asit açısından zengin domain (de Lau ve ark., 2012'den modifiye edilmiştir.)

RSPO-1, cinsiyet fenotipinin tersine çevrilmesine neden olur. RSPO-2, uzuvların, akciğerlerin kıl foliküllerinin gelişiminde önemlidir. RSPO-3 plasenta'nın gelişiminde önemlidir. RSPO-4 ise tırnak gelişiminde önemlidir (de Lau ve ark., 2012).

R-Spondin LGR4/5/6 reseptörlerinin endojen ligantlarıdır (Wang ve ark., 2013).

R-Spondin proteinleri (RSPO-1-4), ZNRF3/RNF43'ün doğal antagonistleri olarak görev yapar (Hao, Jiang, & Cong, 2016). R-Spondin proteini, kanonik Wnt/β-katenin sinyal yolunun salgılanan agonistleridir (de Lau ve ark., 2012).

RSPO-1 eksprese eden nöronlar, supraoptik çekirdek (SON), suprakiazmatik çekirdek (SCh), anterior paraventriküler çekirdek (PVN), periventriküler hipotalamik çekirdek (PeV), anterior hipotalamik alan, magnoselüler preoptik çekirdek (MCPO), lateral hipotalamik alan (LH) bulunurken az sayıda arkuat çekirdek (ARC) ve ventromedial çekirdekte (VMH) lokalize olur. RSPO-3 eksprese eden nöronlar, SON, SCh, PVN, Pev, ARC, ventromedial çekirdek (VMH), LHA, zona inserta (ZI) ve anterior parvisellüler çekirdekte bulunur (Lee, & Dixon, 2017; Yurtseven Gök, Coşkan, Topal, Hasanoğlu Akbulut, & Eyigör, 2023).

2.3.1. R-Spondin 1

Embriyonun fenotipik cinsiyeti gonadal cinsiyetin belirlenmesine bağlıdır. XY erkekten kadına cinsiyet değişimi daha sık görülürken, cinsiyet belirleyici bölge Y (SRY) geninin translokasyonundan kaynaklanan XX erkek cinsiyet değişimi az görülür.

RSPO-1'deki mutasyonlar, SRY'den bağımsız olarak XX erkek cinsiyetinin tersine dönmesini, ciltte palmoplantar hiperkeratoz ve skuamöz hücreli karsinomuna yatkınlık gibi son derece nadir sendromlara neden olur (de Lau ve ark., 2012).

2.3.2. R-Spondin 3

Vaskülogenez ve anjiyogenez sinyallerini üzerine yapılan çalışmalarda, RSPO-3 geninindeki bozuklukların plasentada ciddi vasküler defektlere sebep olduğu bildirilmiştir (de Lau ve ark., 2012).

2.3.3. R-Spondinlerin hastalıklardaki önemi

RSPO-1’deki mutasyonlar farelerde ve insanlarda dişiden erkeğe cinsiyet değişimine neden olurken sadece insanlarda palmoplantar hiperkeratoza da sebep olur. RSPO-2’deki mutasyonların ise sıçanlarda kraniofasial malformasyonlara, distal ekstremite kaybı ve akciğer hipoplazisine sebep olduğu bildirilmiştir. RSPO-3’teki mutasyonlar ise sıçanlarda defektif anjiyogenezlere ve plasental gelişimde defektlere sebep olur. Son olarak RSPO-4’teki mutasyonlar insanda Onişi / paronişi kongenita’ya sebep olur (Gülmez, & Atakişi, 2019).

2.4. Steroid Hormonlar

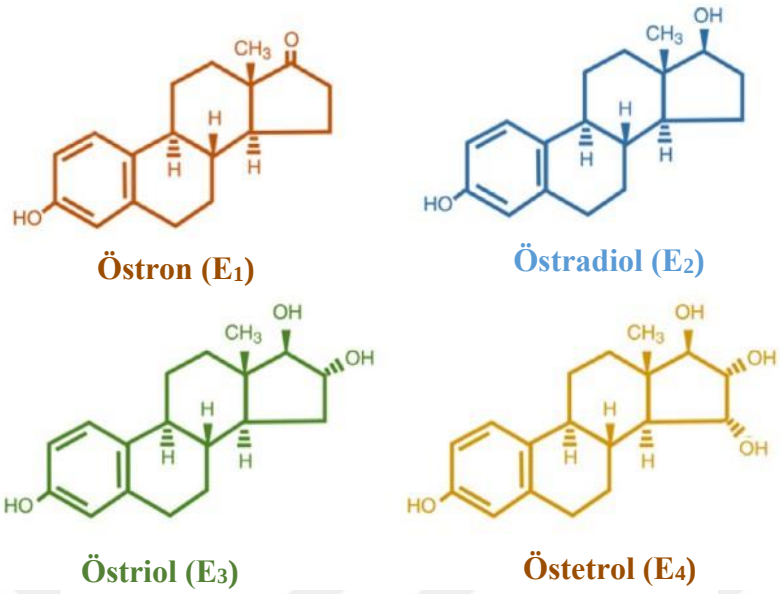
Steroid hormonlar, hücre zarlarından kolayca geçebilen ve yağda çözünebilen organik bileşiklerdir. Yağda çözünebilen bileşikler olması nedeniyle düz endoplazmik retikulum (AGER) ve mitokondrinin iç zarından sentezlendiği gibi hücreden salınırlar ve hücre içindeki veziküllerde depolanmazlar. Dolaşımdaki steroidler kolayca kan beyin bariyerinden (KBB) geçebilirler (Lovejoy, 2005) ve beyinde hareket edebilirler ancak steroidler suda çözünmedikleri için genellikle seks hormon bağlayıcı globulinler gibi taşıyıcı proteinlere bağlanırlar (Caldwell, & Jirikowski, 2014). Bütün steroid hormonların prekürsörleri karaciğerdeki asetattan yapılan kolesteroldür. Steroidlerin yapısında iç siklohekzan halkası ve konjuge siklopentan halkası bulunur. Steroidler çok sayıdaki karbon-hidrojen bağlarından dolayı non-polardır (Carruth, & Shahbazi, 2015).

2.4.1. Östrojen

Östrojenin, oogenez, oosit üretimi, beslenme, üreme, dişi sekonder morfolojik karakterlerinin gelişimi, dişi üreme davranışındaki değişiklikler gibi görevlerine ek olarak bilişsellik, hafıza ve nöroproteksiyon gibi işlevleri de vardır. Östrojenin protein translasyonuna ek olarak negatif ve pozitif feed-back yoluyla ovaryan estradiol sentezini endojen olarak düzenlemesi gibi fizyolojik görevleri de vardır. (Carruth, & Shahbazi, 2015)

1900'lerin başında sığır ve domuzlardan alınan likör foliküllerin kemirgenlere enjekte edilmesiyle bulunmuştur (Allen, & Doisy, 1923) ve bütün dişi hayvanlarda ovaryum folikülleri tarafından üretildiği anlaşılmıştır (Fuentes, & Silveyra, 2019).

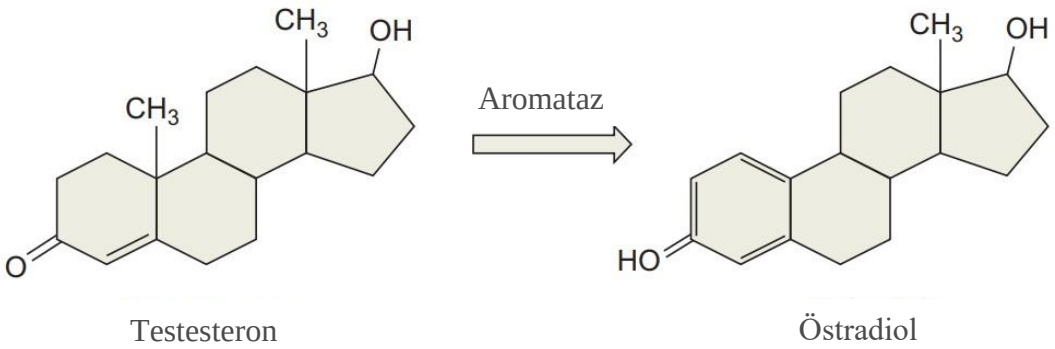
Östrojenlerin östron, östriol, östetrol ve 17β-östradiol (veya E2) olmak üzere dört formu vardır (Şekil 8) ve C_{18} steroidleri olarak sınıflandırılır. Bir benzen halkası, bir fenolik hidroksil grubu ve bir keton grubu (östron) veya bir (17β-östradiol), iki (östriol) veya üç (östetrol) hidroksil grubundan oluşurlar (Carruth, & Shahbazi, 2015; Fuentes, & Silveyra, 2019).



Şekil 8. Endojen östrojenlerin kimyasal yapısı (Fuentes, & Silveyra., 2019'dan modifiye edilmiştir.)

Östrojen, overlerde bulunan büyüyen foliküllerdeki teka ve granüloza hücreleri aracılığı ile üretilir. LH stimülasyonu ile foliküllerin teka interna tabakası, kolesterolden androstenedion ve testosteron gibi androjenleri sentezler. Hipofizden salınan FSH granüloza hücrelerini uyarır ve aromataz enzimi yardımıyla androjenler östrojenlere dönüştürülür (Mahboobifard ve ark., 2022). Östrojenlerin prekürsörleri androjenlerdir. Östrojen ve androjenlerin steroidogenezi, aromatizasyon işlemiyle androjenlerin östrojenlere dönüşmesi için P-450 aromataz enzimi kullanılarak 19. pozisyondaki karbonun çıkarılmasıdır. Sonuç olarak aromatik östrojen bileşiğinin fenolik A halkası olur. Aromataz, monooksijenazların sitokrom P-450 süperailesi üyesidir ve gonadlar, beyin, adrenal korteks, adipoz doku, kemik, deri, ve kan damarlarında eksprese edilir (Harada, Utsumi, & Takagi, 1993). Testesteron östrojene aromatize edilirken öncelikle androstenedion östrona dönüşür (Şekil 9). Dihidrotestesteron (DHT) gibi androjenler östrojene aromatize edilemez. Ovaryan granüloza hücreleri hemen kan dolaşımına salınması için direkt östrojene dönüşen büyük miktarda androjen üretirler (Carruth, & Shahbazi, 2015).

Endojen hormon olan östrojenlerin ana kaynağı overlerdir. Gelişmekte olan foliküller ise en yüksek kapasiteye sahiptir. Ardından hamilelik dönemindeki plesanta gelir. Düşük seviyelerde ise adrenal bezler ve testislerden salgılanır. Ayrıca adipoz dokunun da sentezlediği bilinmektedir (López, & Tena-Sempere, 2015).



Testesteron Östradiol

Şekil 9. Aromataz enzimiyle testosteronun östradiole dönüşümü (Carruth, & Shahbazi., 2015'ten modifiye edilmiştir.)

2.5. Hipotalamo-Hipofizer-Gonadal Aks ve Östrojenin Feed-Back Mekanizması

GnRH nöronları üremeyi ve gonadal steroidogenezi direkt olarak düzenler (Constantin, 2011). Östrojen üretildikten sonra hipotalamusa geçer ve hipotalamik preoptik alandaki (POA) gonadotropin salgılayan hormon (GnRH) nöronlarını uyarır. GnRH pulsatil bir şekilde adenohipofize salgılanır. Gonadotroplardan FSH ve LH salınımı gerçekleşir. Ovaryum fonksiyonu üreme döneminde döngüseldir; ilk önce foliküler faz, ikinci olarak luteal faz meydana gelir. Foliküler fazda, foliküller büyür ve östrojen seviyesi yükselir. Fazın sonuna doğru, ovulasyondan hemen önce östrojen seviyesinde önemli bir artış olur; luteal fazda ise korpus luteum oluşur ve progesteron salgılanır (Kamat, Hinshelwood, Murry, & Mendelson, 2002). Östrojenin HPG aksı üzerinde hem pozitif feed-back etkisi ve hem negatif feed-back etkisi vardır (Şekil 1). Bunun nedeni östrojenin, kisspeptin (GnRH nöronları üzerinde düzenleyici etki gösteren nöropeptit) ekspresyonu üzerinde zıt etkilerinin olmasıdır. Östrojen, arkuat çekirdekteki (ARC) kisspeptin nöronları ile negatif feed-back etkisine sebep olurken; anteroventral periventriküler çekirdekteki (AVPV) kisspeptin nöronları ile pozitif feed-back etkisine sebep olur (Mahboobifard ve ark., 2022).

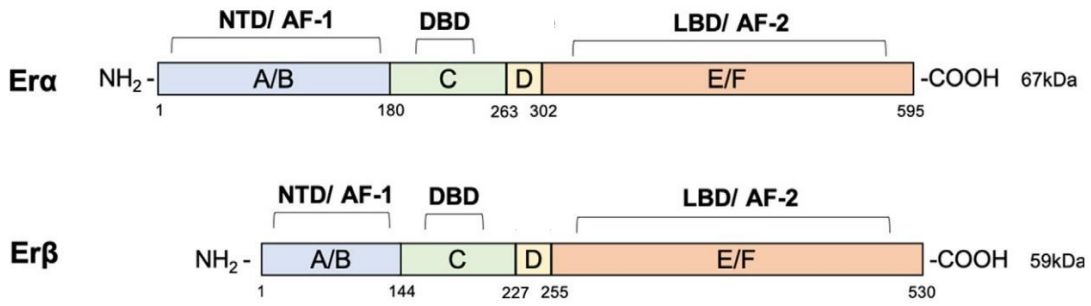
2.6. Östrojen Reseptörleri

Östrojenler, iki farklı nükleer reseptör olan ER-α ve ER-β ya bağlanarak transkripsiyon yanıtlarını kontrol eder (Escande, Pillon, Servant, Cravedi, Larrea, Muhn, Nicolas, Cavaillès, & Balaguer 2006). Bağlanmamış durumda, inaktif östrojen reseptörleri sitoplazmada bulunur. Ligand ile bağlandıktan sonra östrojen reseptörleri (ER) ER-α (αα) veya ER-β (ββ) homodimerleri veya ER-α-ER-β (αβ) heterodimerleri oluşturur ve nükleusa geçerler (Carruth, & Shahbazi, 2015).

1958 yılında Elwood Jensen tarafından keşfedilmiştir (Jensen, Desombre, Hurst, Kawashima, & Jungblut, 1967). Yapılan çalışmada reprodüktif dişi dokularının proteinlere bağlanarak dolaşımdaki östrojeni alabildiği bildirilmiştir ve östrojen reseptörünün herhangi bir hormon için karşılaşılan ilk reseptör olduğu gösterilmiştir. Daha sonra yaptığı çalışmalarda östrojen-bağımlı reseptörlerin nükleusa göç edip, gen transkripsiyonunu stimüle edebileceği gösterilmiştir (Fuentes, & Silveyra, 2019).
İlk insan östrojen reseptörü (günümüzde ER-α olarak bilinen) insan meme kanseri MCF-7 hücre hattından elde edilen RNA kullanılarak klonlandı (Green ve ark., 1986). İkinci insan östrojen reseptörü (günümüzde ER-β olarak bilinen) de benzer bir şekilde bulunmuştur (Kuiper, Enmark, Pelto-Huikko, Nilsson, & Gustafsson, 1996).

2.6.1. Östrojen reseptörlerinin yapısal özellikleri

ER-α 595 aminoasitten oluşur ve 67kDa'dur. ER-β ise 530 aminoasitten oluşur ve 59kDa'dır. ER-β ER-α'dan daha kısa bir amino terminal alanına sahiptir (Fuentes, & Silveyra, 2019) (Şekil 10).



Şekil 10. Östrojen reseptörü α ve östrojen reseptörü β karşılaştırılması (Fuentes ve ark., 2019)

Transkripsiyon regülatörlerinden nüklear hormon reseptör süper ailesinin ER-α ve ER-β üyelerinin yapıları çeşitli fonksiyonel alanlardan oluşur ve birçok ortak yapısal bölgeye sahiptir. Fonksiyonel alanlar A/B, C, D ve E/F olarak adlandırılır (Schwabe, & Teichmann, 2004) (Şekil 10).

A/B bölgesi, amino-teminal bölgesine (amino-teminal domain/NTD) karşılık gelmektedir. Gen transkripsiyonunu ve trans-aktivasyonunu içerir ve hedef diziyi bağlayan çinko-parmağına sahiptir. C bölgesi, DNA-bağlayıcı bölge (DNA Binding Domain/DBD)'ye karşılık gelmektedir. Östrojen reseptörlerinin dimerizasyonuna ve kromatindeki spesifik dizilere bağlanmasına katkıda bulunur ve bu kanonik diziler östrojen duyarlı bölge (ERE) olarak adlandırılır (Scheidereit ve ark., 1986; Truss, & Beato, 1993). D bölgesi, bağlantı bölgesine karşılık gelmektedir. C ve E bölgelerini birbirine bağlar ve şaperon proteinlerine bağlanabilmektedir. Bu bölge ayrıca östrojenin bağlanmasıyla reseptör-ligand komplekslerinin nükleus'a translokasyonunu sağlayan nükleer lokalizasyon sinyalini de içerir (Fuentes, & Silveyra, 2019).

E ve F bölgeleri karboksil-terminal bölgesine karşılık gelmektedir ve aynı zamanda ligand-bağlayıcı bölge (Ligand-Binding Domain/LBD) olarak bilinmektedir. Östrojen, koaktivatörler ve korepresörler için bağlanma alanını içerir.

Son olarak, aktivasyon fonksiyonu (AF) bölgeleri olarak bilinen AF1 ve AF2 östrojen reseptörünün transkripsiyonel aktivitesini düzenler ve sırasıyla NTD ve DBD'de bulunur (Kumar ve ark., 2011). AF-1'in aktifleşmesi için steroid veya hormonlara bağlanması gerekmez iken AF2 için gerekir (Fuentes, & Silveyra, 2019).

ER-α ve ER-β'nın daha kısa izoformları da bulunmaktadır. ER-α kısa izoformlarının (36 kDa, 46 kDa), alternatif başlangıç kodonlarının olmasının bir sonucu olduğu veya alternatif birleştirmenin ürünleri olduğu düşünülmektedir (Schwabe, & Teichmann, 2004). ER-α'nın bazı kısa izoformları NTD bölgesini içermez ve buna bağlı olarak da AF-1 bölgeside yoktur. Bu nedenle transkripsiyon aktivitesi gösteremez. Bunun yerine uzun ER-α'ya sahip heterodimerleri oluşturur ve transkripsyon'u kontrol etme yeteneğini engeller. Daha kısa formları ise (36kDa) transkripsiyonel aktivasyona sahip olan AF-1 ve AF-2 bölgeleri yoktur ve östradiol, östriol ve östetrol'ün membrana bağlanmasıyla GPER1'in cevabıyla birlikte membran tarafından başlatılan sinyal olaylarını (membrane-initiated signaling) da kullandığı gösterilmiştir (Fuentes, & Silveyra, 2019).

ER-β'nın bilinen 5 kısa izofomu vardır. Tam uzunluktaki ER-β ile kısa izoformlarının arasındaki fark C-terminlindeki LBD'dir. Bu nedenle transkripsiyon aktivitesinin olmamasının yanında ER-α ile dimerleşerek ER-α sinyallerini baskılayabilir (Fuentes, & Silveyra, 2019).

DNA bağlayıcı bölgede ER-α ve ER-β sadece %95 homoloji gösterirler (Fuentes, & Silveyra, 2019).

Ligand bağlayıcı bölgede ER-α ve ER-β sadece %56 homoloji gösterirler (Carruth, & Shahbazi, 2015)

İnsanlarda ER-α 6. kromozomda (6q25.1) bulunan ESR-1 geni tarafından kodlanır (Gosden, Middleton, & Rout, 1986). ER-β 14. kromozomda (14q23-24) bulunan ESR-2 geni tarafından kodlanır (Enmark ve ark., 1997).

Vücudun çeşitli bölgelerinde ER-α ve ER-β reseptörleri dağılmıştır. ER-α daha çok hipofiz, prostat (epitel hücreleri), epididimis, ve adrenal bezde eksprese olurken ER-β prostat, akciğer ve mesane de eksprese olur. ER-α ve ER-β birlikte beyin, ovaryum (granüloza hücreleri), uterus ve testiste eksprese olur (Kuiper, Shughrue, Merchenthaler, & Gustafsson, 1998).

Beyinde ER-α ve ER-β reseptörleri birlikte serebral korteksin farklı bölgelerinde, bazal ön beyin, amigdala, talamus, hipotalamus, mezensefalon, pons, serebellum ve medulla oblangatada bulunurken ER-α sadece hipokampüste bulunur (Carruth, & Shahbazi, 2015).

Hipotalamusta, ER-α arkuat çekirdek ve ventromedial çekirdekte eksprese edilirken ER-β anterior periventriküler çekirdek, paraventriküler çekirdek, supraoptik çekirdek, medial tuberal çekirdek ve medial mamiller çekirdekte eksprese edilir. ER-α ve ER-β medial preoptik alan, bed nükleus ve stria terminaliste birlikte eksprese edilirler (Shughrue, Komm, & Merchenthaler, 1996).

Nükleer reseptör protein ailesinin üyeleri olarak, ER'ler esas olarak nükleusta yer alsalar da, aynı zamanda sitoplazmada ve mitokondride de bulunabilirler (Jia, Dahlman-Wright, & Gustafsson, 2015).

2.6.1.1. GPER

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda hedef hücrelerde yeni bir östrojen bağlayan protein keşfedilmiştir; G proteini kenetli reseptör GPER1 ya da membran östrojen reseptör. Ancak nuklear östrojen reseptör ER-α ve ER-β klasik biyokimyasal yaklaşımlarla bulunmuştur. GPER1 ise moleküler klonlama metodlarıyla tanımlanmıştır (Filardo, & Thomas, 2012). Neredeyse 20 yıl önce birçok araştırma laboratuvarı G proteini kenetli reseptör ile GPR30 un homologu olduğu raporlanmıştır (Carmeci, Thompson, Ring, Francke, & Weigel, 1997).

GPR30'un ligandının, anjiyotensin II ve diğer peptit (interlökin-8, monosit kemotaktik proteinleri ve komplement faktör) reseptörlerine yapısal benzerliklerinden dolayı bir hormon veya kemotaktik peptid olduğu düşünülmüştür (Filardo, & Thomas, 2012). Ancak birçok kemotaktik peptid ve faktörün gösterilmesinden sonra GPR30'a bağlanma afinitesi olan molekül bulunamadığı için orfan reseptör olarak adlandırılmaya devam etti (Feng, & Gregor, 1997). 2000 yılında bir araştırma ekibi ekstrasellüler sinyal- regüle kinazların (ERKs) hızlı östrojen-aracılı aktivasyonunun GPR30'la ilişkili olduğunu gösterdi (Filardo, Quinn, Bland, & Frackelton, 2000). 5 yıl sonra 17 β -östrodiol'ün GPR30 ve GPR30-transferize edilmiş hücre ve meme kanseri hücre hattında direkt bağlandığı gösterilmiştir (Revankar, Cimino, Sklar, Arterburn, & Prossnitz, 2005). Sonunda 2007'de GPR-30'un resmi adı G protein-kenetli östrojen reseptör 1 (ayrıca GPER veya GPER 1 olarak bilinir.) olarak değiştirilmiştir (Fuentes, & Silveyra, 2019).

Membran reseptörü GPER1'i kodlayan gen, 7. kromozomda (lokus 7p22.3) bulunur. GPER1 yapısal açıdan ER-α ve ER-β'dan farklıdır. G protein-kenetli reseptör'ün tipik yapısı gibi 7 transmembran α-helikal bölge, 4 ekstrasellüler segment ve 4 sitozolik segmentten oluşur (Barton ve ark., 2018). Bu reseptör diğer östrojen reseptörleri ile karşılaştırıldığında daha düşük bağlama kapasitesine (17beta-östrodiol) sahiptir (Prossnitz, & Barton, 2014). Ancak GPER1'in östrojene hızlı cevapta ve ikincil haberciler tarafından intrasellüler sinyalleşme basamaklarının aktivasyonunun düzenlenmesinde önemli olabileceği düşünülmektedir (Filardo, & Thomas, 2012).

2.6.2. Östrojen reseptörlerinin etki mekanizmaları

Östrojenin hücresel düzeydeki fizyolojik etkileri 2 mekanizma ile gerçekleşir

Direkt genomik etki (sinyalleşme): 17α-östradiol hücre membranından geçerek nükleer östrojen reseptörleri olan ER-α ve ER-β'ya bağlanır. Bu kompleks ya DNA'daki ERE'ye (estrogen response element- östrojen duyarlı bölge) veya DNA'daki AF1'in (aktivasyon fonksiyonu-1/activation function-1) Fos/jun heterodimerlerine bağlanarak transkripsiyonu gerçekleştirir. (Altunkaynak, Ünal, Aksak, & Ünal, 2012) (Şekil 11).

İndirekt genomik etki (sinyalleşme): 17α-östradiol, hücre membranındaki ER-α ve ER-β reseptörlerine bağlanır. İndirekt yolak hücre içi ikincil yolaklar aracılığıyla direkt yolak ile birleşir ve hücrenin transkripsiyonunu sağlar. İkincil yolaklar ise

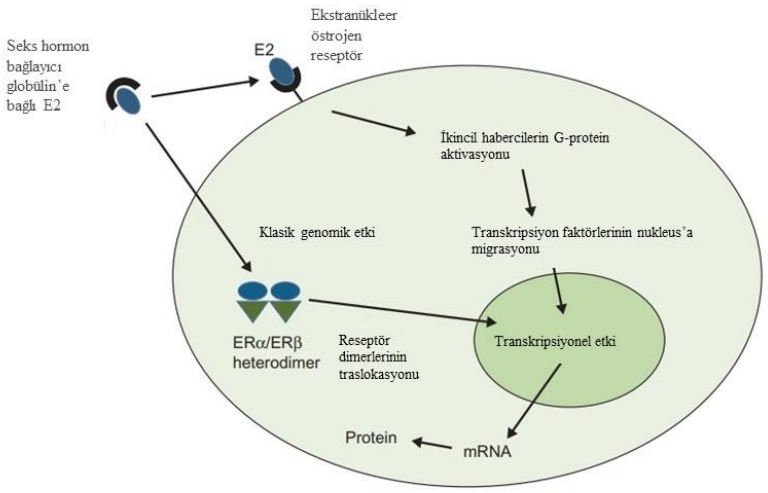
-Protein kinaz C (PKC),

- c AMP,

- Protein kinaz A (PKA),

- Mitojenin aktifleştirdiği protein kinaz (MAPK) ve

- Ekstrasellüler sinyal- regüle eden kinazlar (ERK) 'dır (Altunkaynak ve ark., 2012) (Şekil 11).



Şekil 11. İntrasellüler ve ekstrasellüler ER'ler yoluyla östrojen aktivasyonunun mekanizması (Carruth, & Shahbazi, 2015'ten modifiye edilmiştir.)

2.7. Dişi Sıçanlarda Östrus Döngüsü ve Smear Tayini

2.7.1. Östrus döngüsü

Sıçanlarda postnatal ovaryum gelişimi 4 evreden oluşur.

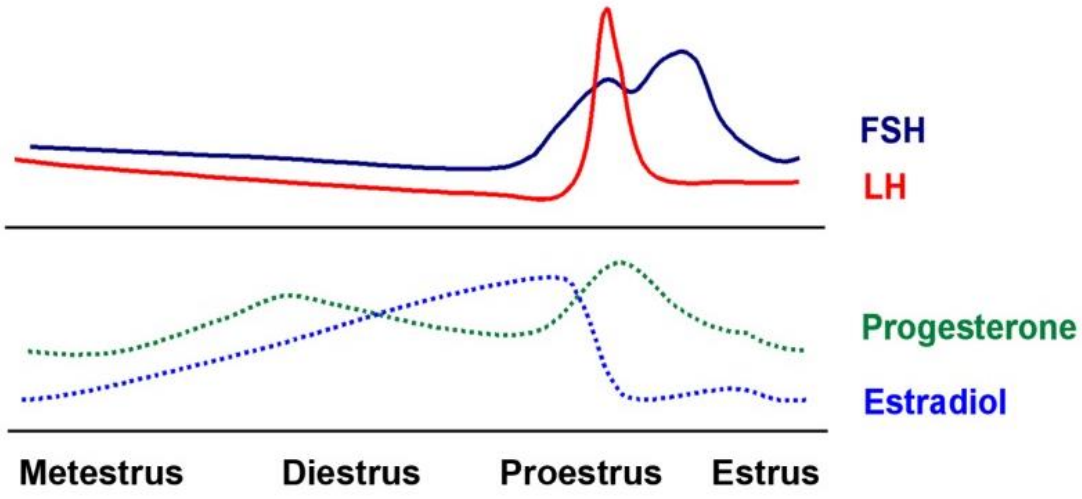
Neonatal dönem: Doğumdan sonraki 7 günü kapsar. Gonadotropin hormon salgılanmasının artmasıyla başlar.

İnfantil dönem: 8-21. günler arasını kapsar. Folikül uyarıcı hormon (FSH) ve lüteinizan hormon (LH) ‘un salgılanıp folikül gelişiminin gerçekleştiği evredir.

Jüvenil (prepubertal) dönem: 22-30. günler arasını kapsar. Foliküllerden östrojen salgısının başladığı evredir.

Peripubertal dönem: Jüvenil dönemden sonraki 3 günü kapsar (Yiğit, Böyük, & Kabakçı, 2019).

Sıçanlar postnatal 30.günde LH salınımıyla puberteye girer (Westwood, 2008). Östrus siklus döngüsü ise vajinal açıklığın belirlendiği yaklaşık 32-36.gün arasında başlar (Goldman, Murr, & Cooper, 2007). Sıçanlar poliöstrik hayvanlardır ve 4-5 günde bir siklik aktivite gösterirler. Östrus 4 dönemden oluşur. Bunlar, proöstrus (12-14 saat), östrus (25-27 saat), metöstrus (6-8 saat) ve diöstrus (55-58 saat)’tur (Westwood, 2008) (Şekil 12). Proöstrus, LH salınımıyla birlikte östrodiolün pik yaptığı seviyedir. Östrusla beraber östrodiol seviyesi azalmaya başlar. Ovulasyon proöstrus ve östrus arasındaki LH piki ile gerçekleşir. Ovulasyon sonrasındaki diöstrus ve metöstrus dönemlerinde östrodiol seviyesi düşer (Köylü, Ömeroğlu, Akarca Dizakar, & Demirel, 2021). Yine yapılan bazı çalışmalar ovariektominin (OVX) östrojen seviyesini düşürdüğünü göstermiştir (Sharma, Mauvais-Jarvis, & Prossnitz, 2018).



Şekil 12. Ratlarda östrus döngüsü (Miller, & Takahashi, 2014'den alınmıştır.)

2.7.2. Smear tayini

Tablo 1. Ratlarda östrus döngüsü ve vajinal smearin hücre tiplerine ve sayısına göre değerlendirilmesi (Cora, Kooistra, & Travlos, 2015)

Östrus Fazı	Nötrofil	Küçük Çekirdekli Epitel Hücreleri	Büyük Çekirdekli Epitel Hücreleri	Çekirdeksiz Keratinize Epitel Hücreleri	Göreceli Hücre Yoğunluğu
Proöstrus	0/+	++/+++	0/+	0/+	Düşük-Orta
Östrus	0/+	0/++	0/++	++/+++	Orta-Yüksek
Metöstrus	+/+++	+/++	+/++	+/+++	Orta-Yüksek
Diöstrus	++/+++	+/++	+/++	0/+	Düşük-Orta

*0= negatif, += zayıf, ++= orta derece, +++= yüksek

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hayvanlar

Çalışmamızda Bursa Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma biriminden temin edilen 200-250 gram Wistar cinsi erişkin dişi sıçanlar kullanılmıştır. Çalışma 2 deney grubunda ve toplamda 20 hayvan kullanılmıştır. İlk deney grubu olan intakt proöstrus grubundan sakrifiye edilen 10 erişkin dişi sıçandan 7 tanesi %4'lük PFA, 3 tanesi %4 PFA + %7,5 pikrik asit ile fikse edilerek beyinleri alınmıştır. İkinci deney grubu olan ovariektomi grubu ise cerrahiden sonraki 14.günün sonunda sakrifiye edildi ve 10 erişkin dişi sıçandan 4 tanesi %4'lük PFA, 6 tanesi %4 PFA + %7,5 pikrik asit ile fikse edilerek beyinleri alındı.
Bu çalışmadaki tüm deneysel işlemler Bursa Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezinin (DEHYUAM) 13.12.2022 tarihli ve 2022-17/04 sayılı kararı ile etik olarak uygun bulunduktan sonra gerçekleştirilmiştir.

3.2. Smear Tayini

Sıçanlara proöstrus evresinin tayini için smear takibi yapıldı.

3.2.1. Vajinal yıkama ve vajinal yayma işlemi

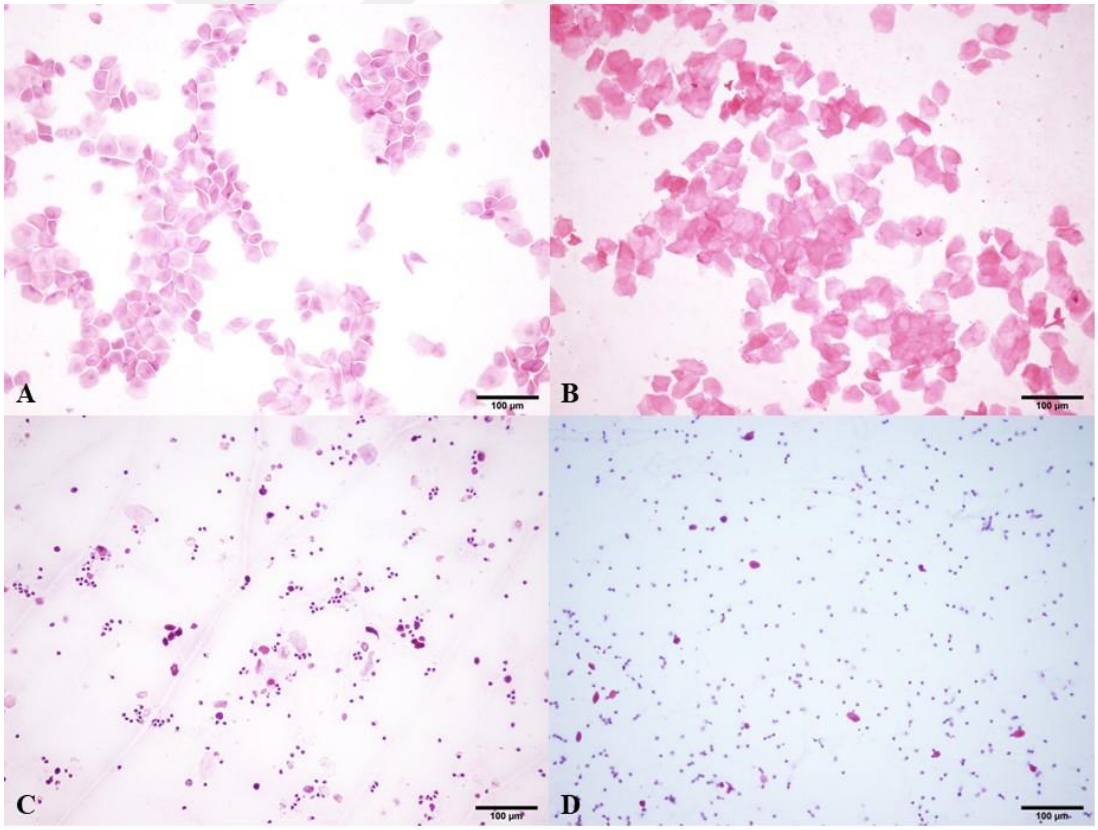
Deneklerden smear alırken vajinal yıkama ve vajinal yayma işlemleri tercih edildi. Damlalıkla yaklaşık 150 µl distile su çekildi. Vulva ve vajen bu su ile yıkandı. Damlalıktaki içerik dikkatle lam üzerine yayılıp, etüv içinde kurutuldu.

3.2.2. Smear örneklerinin boyanması

Bu işlem için hematoksilen-eosin boyaması tercih edildi (Şekil 13).

- Alınan smear örnekleri öncelikle kurutuldu.
- 10 dips %70'lik alkole batırıldı.
- 1 dips akan musluk suyunda yıkandı.
- 5 dips hematoksilen'e batırıldı.
- Mavileşinceye kadar akarsuda yıkandı.
- 5 dips eosin'e batırıldı.
- Su berraklaşıncaya kadar akan musluk suyunda yıkandı.
- Kurutuldu ve DPX ile kapatılıp incelendi.

3.2.3.Smear örneklerinin değerlendirilmesi:



Şekil 13. (**A**) Proöstrus evresi. (**B**) Östrus evresi. (**C**) Metöstrus evresi. (**D**) Diöstrus evresi.

Tablo 2. Ratlarda östrus döngüsü ve vajinal smearin hücre tiplerine ve sayısına göre değerlendirilmesi (Cora ve ark., 2015)

Östrus Fazı	Nötrofil	Küçük Çekirdekli Epitel Hücreleri	Büyük Çekirdekli Epitel Hücreleri	Çekirdeksiz Keratinize Epitel Hücreleri	Göreceli Hücre Yoğunluğu
Proöstrus	0/+	++/+++	0/+	0/+	Düşük-Orta
Östrus	0/+	0/++	0/++	++/+++	Orta-Yüksek
Metöstrus	+/+++	+/++	+/++	+/+++	Orta-Yüksek
Diöstrus	++/+++	+/++	+/++	0/+	Düşük-Orta

*0= negatif, += zayıf, ++= orta derece, +++= yüksek

3.3. Ovariektomi Prosedürü

Deneklere sevofluran inhalasyon anestezisi altında ovariektomi işlemi uygulandı. Bu işlem iki taraflı dorsolateral yaklaşım ile gerçekleştirildi. Ovaryum projeksiyonuna denk düşen sırt alanları tıraşlanarak, asepsi kuralları içerisinde 1,5 cm oblik bir deri kesisi yapıldı. Ardından kas diseksiyonu ile abdominal kaviteye ulaşıldı. Bu aşamada önce ovaryumları çevreleyen yağ dokusu belirlendi ve tuba uterinaların üzerinden uzaklaştırıldı. Ardından overler ve uterusun boynuzları tanımlanarak uterus boynuzunun distal ucuna ligasyon uygulandı (Şekil 14A). Ligasyon sonrasında over dokusu kesilerek çıkartıldı. Uterus boynuzu abdominal kaviteye geri bırakıldı ve kas dokusuyla deri uygun sütürleme işlemiyle kapatıldı (Şekil 14B). Denekler 14.günün sonunda sakrifiye edildi.



Şekil 14. (**A**) ve (**B**) sevofluran inhalasyon anestezisi altında ovariektomi işlemi

3.4. Beyin Kesitlerinin Elde Edilmesi ve Saklanması

Denekler derin eter anestezisi altında sakrifiye edildi. Dokuların eldesi için perfüzyon-fiksasyon yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde, derin anestezi altındaki deneklerin toraksları açıldı ve kalbin apeksinden aortaya doğru deneklerin kan basıncına benzer olarak ayarlanmış perfüzyon pompasına bağlı bir katater yerleştirildi ve dolaşımdaki sıvının (kan, SF, fiksatif vb.) uzaklaştırılması için sağ atrium kesildi. Vücuttaki kanın uzaklaştırılması için kataterden ilk olarak dolaşıma serum fizyolojik verildi ardından fiksatif olarak 300 ml/denek %4 PFA ya da 300 ml/denek %4 PFA + %7,5 pikrik asit kullanıldı. Fikse olan beyinler kafatasından çıkarıldıktan sonra fiksasyon solüsyonunun içinde bir gece post-fiksasyona bırakıldı. Beyinlerden vibratom yardımı ile rostro-kaudal düzlemde 40 mikron kalınlığında alınan koronal kesitler 5 seri halinde Tris-HCl tamponu (0.05M, pH 7.6) bulunan cam sintilasyon viallerine toplandı. Fiksatiften arındırmak için Tris-HCl tamponu ile yıkandı. İmmünohisyokimya uygulaması gerçekleştirilecek zamana kadar kriyoprotektan solüsyonu içinde -20 °C saklandı. Deney grupları tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Deney grupları ve denek sayıları

Deney Grupları	**Denek Sayısı**
ER-α + RSPO-1	n: 5 Proöstrus Grubu
	n: 5 Ovariektomi Grubu
ER-β + RSPO-1	n: 5 Proöstrus Grubu
	n: 5 Ovariektomi Grubu
ER-α + RSPO-3	n: 3 Proöstrus Grubu
	n: 3 Ovariektomi Grubu
ER-β + RSPO-3	n: 3 Proöstrus Grubu
	n: 3 Ovariektomi Grubu
ER-α + PNX	n: 5 Proöstrus Grubu
	n: 5 Ovariektomi Grubu
ER-β + PNX	n: 5 Proöstrus Grubu
	n: 5 Ovariektomi Grubu

3.5. İmmünohistokimyasal Boyamaların Gerçekleştirilmesi

İmmünohistokimyasal boyamalar yüzen kesitler üzerine uygulandı. İnkübasyon ve yıkama işlemleri orbital sallayıcı yardımıyla uygun ajitasyonla gerçekleştirildi. Yıkama işlemleri 0.05 M Tris-HCl solüsyonu (pH 7.6) ile gerçekleştirildi (blocking serum ve primer antikor basamakları arası hariç). Bloklama işlemi için ise %10'luk normal at serumu (blocking serum) kullanıldı. Primer antikor ve sekonder antikor dilüsyonları blocking serum içerisinde hazırlandı. Streptavidin basamağı ise yıkamada kullanılan tampon solüsyonunda (Tris-HCl solüsyonu) hazırlandı. Görüntüleme Ni-DAB (2 g nikel; 12,5 mg DAB, 1,3 µL H_2O_2/50 ml Tris-HCl) veya DAB (12,5 mg DAB, 1,3 µL H_2O_2/25 ml Tris-HCl) ile gerçekleştirildi.

Kullanılan primer antikor, sekonder antikor, streptavidin ve kromojenler hakkındaki ayrıntılı bilgi tablo 4, tablo 5, tablo 6 ve tablo 7'de, kullanılan solüsyonlar, solüsyonların içeriği ve solüsyonların hazırlanımı tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 4. Kullanılan primer antikorlar

Antikor	**Üretici Firma**	**Katolog No**
Rabbit anti-phoeniksin	Phoenix Pharmaceuticals Inc.	H-079-01
Rabbit anti-RSPO-1	Origene	TA306782
Mouse anti-RSPO-3	Origene	TA804633
Rabbit anti-ER-α	Santa Crus Biotecnology	SC-542
Rabbit anti-ER-β	Thermo Fisher Scientific	PA1-310B

Tablo 5. Kullanılan sekonder antikorlar

Antikor	**Üretici Firma**	**Katolog No**
Biyotin konjuge donkey anti-rabbit IgG (H+L)	Jackson İmmunoresearch	711-065-152
Biyotin konjuge donkey anti-mouse IgG (H+L)	Jackson İmmunoresearch	715-065-151

Tablo 6. Kullanılan biyotin bağlayıcı

Biyotin Bağlayıcı	**Üretici Firma**	**Katolog No**
Peroxidase- conjugated streptavidin	Jackson İmmunoresearch	016-030-084

Tablo 7. Kullanılan kromojenler

Kromojen	**Tris**	**H2O2**	**Nikel**	**Üretici Firma**	**Katolog No**
DAB	25 mL	+	-	Sigma-Aldrich	D5637
Ni-DAB	50 mL	+	2g	Sigma-Aldrich	D5637

3.5.1. On block işlemi

Fiksatif ile doku proteinleri, nükleik asit ve polisakkaritler arasında çapraz bağlar oluşur ve bu durum pek çok antijen için immünoreaktivitenin azalmasına sebep olur. İmmünoreaktivitenin artması için on block işlemi uygulanır. Bu işlemde beyin 100 mL on block solüsyona alındı ve ardından 600W da 1 dakika 15 saniye boyunca mikrodalga ışınıma maruz bırakıldı. Ardından 1 saat 30 dakika boyunca distile su içerisinde bekletilip 40µm kalınlığında kesitler alındı.

Tablo 8. Kullanılan solüsyonlar,içeriği ve hazırlanımı

SOLÜSYON	İÇERİK	HAZIRLANIMI
Sorenson'un Fosfat Tamponu	Solüsyon A 46,54 g/lt, [Na2HPO412H2O (0,13 M), (Merck)], Solüsyon B 17,68 g/lt [KH2PO4 (0,13 M), (Merck)]	Solüsyon A üzerine solüsyon B eklenerek pH 7,4'e ayarlanır.
%4'lük Paraformaldehit	200 ml distile su 40 g Paraformaldehit (Merck, Cas No:30525-89-4) 1 N. NaOH (Merck) 0,13 M Sorenson'un fosfat tamponu Konsantre hidroklorik asit	200 ml distile suda 40 g paraformaldehit (Merck, Cas. No:30525-89-4) ısıtıcılı magnetik karıştırıda 58°C'ye kadar ısıtılarak çözüldükten sonra solüsyon berraklaşıncaya kadar 1 N NaOH (Merck) ilave edilir. Ardından filtre kağıdı yardımıyla solüsyon süzülür. 0,13 M'lık fosfat tamponu ile 1 lt'ye tamamlanır. pH 7,4'e ayarlanır.
%4 PFA + %7,5 pikrik asit	200 ml distile su 40 g Paraformaldehit (Merck, Cat. No:104005) 1 N. NaOH (Merck) 0,13 M Sorenson'un fosfat tamponu Konsantre hidroklorik asit 75 mL pikrik asit	200 mL distile suda 40 g paraformaldehit (Merck, Cas. No:30525-89-4) ısıtıcılı magnetik karıştırıda 58°C'ye kadar ısıtılarak çözüldükten sonra solüsyon berraklaşıncaya kadar 1 N NaOH (Merck) ilave edilir. Ardından 1 litre için 75 mL pikrik asit ilave edilir ve filtre kağıdı yardımıyla solüsyon süzülür. 0,13 M'lık fosfat tamponu ile 1 lt'ye tamamlanır. pH 7,4'e ayarlanır.
Tris/HCl Tamponu (0.05 M)	Trizma base 6 g (AFG Bioscience Cas. No:77-86-1) Distile su 1000 mL Konsantre hidroklorik asit	15 g Trizma base 2500 mL distile suda çözünür. Konsantre hidroklorik asit (HCI) ile pH 7,6'ya ayarlanır.
Kriyoprotektan Solüsyonu	500 ml 0,05 M Tris/HCl tamponu 300 gr Sükroz (BDH, Prod. No: 302997) 300 ml Etilen glikol (BDH, Prod. No: 282966) 10 gr Polivinilprolidon (Amresco, Cat. No: 1512B22) 300 ml distile su	500 mL Tris, 10 g polivinilprolidon 300 g sükroz, 300 mL etilen glikol ve kullanılır. Maddeler verilen sıraya göre eklenir. Karışım distile su ile 1 litreye tamamlanır.
Blocking Serum	%10 Normal at serumu %0,1 sodyum azid %0,2 triton-X 100 900 mL 0,05 M Tris/HCl tamponu	İnaktive %10'luk normal at serumu 37°C'lik sıcak su banyosunda aktive edilir. %0,1 sodyum azid ve %0,2 triton–X 100 eklenir ve karışım Tris tamponu ile 1 lt'ye tamamlanır. Filtre kağıdından süzülür.
On Block Solüsyonu	0,61g Tris (AFG Bioscience Cas. No:77-86-1) 500 mL distile su 0.19g EDTA (BioShop Cas. No: 6381-92-6)	0,61g Tris, 500 mL distile su içerisinde çözüldü, üzerine 0.19g EDTA (BioShop Cas. No: 6381-92-6) eklendi. pH 8.5'e ayarlandı.

3.5.2. Phoeniksin nöronlarında östrojen reseptör alfa (ER-α) varlığının gösterildiği ikili indirekt immünperoksidaz protokolü

1. Kriyoprotektandan arındırmak için kesitler 3x10 dakika Tris-HCl tamponunda yıkandı.

2. Blocking serum içerisinde kesitler 2 saat boyunca bloklama işlemi için (non-spesifik boyanmayı engellemek için) inkübe edildi.

3. Tavşan anti-ER-α primer antikoru 1:5000 dilüsyonunda 1 gece boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

4. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

5. Biyotin-konjuge eşek anti-tavşan sekonder antikoru 1:300 dilüsyonunda 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

6. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

7. Streptavidin solüsyonunda 1:1000 dilüsyonunda 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

8. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

9. Substrat kromojen solüsyonu olarak Ni-DAB kullanılarak antikor-antijen-enzim kompleksi çekirdekte görülebilir hale getirildi.

10. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

11. Blocking serum içerisinde kesitler 2 saat boyunca tekrar bloklama işlemi (non-spesifik boyanmayı engellemek için) için inkübe edildi.

12. Tavşan anti-Phoeniksin primer antikoru 1:1000 dilüsyonunda 2 gece boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

13. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

14. Biyotin-konjuge eşek anti-tavşan sekonder antikoru 1:300 dilüsyonunda 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

15. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

16. Streptavidin solüsyonunda 1:1000 dilüsyonunda 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

17. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

18. Substrat kromojen solüsyonu olarak DAB kullanılarak antikor-antijen-enzim kompleksi sitoplazmada görülebilir hale getirildi.

19. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

20. Kesitler lamlara yayıldı, kurutuldu ve DPX ile kapatıldı.

3.5.3. Phoeniksin nöronlarında östrojen reseptör alfa (ER-β) varlığının gösterildiği ikili indirekt immünperoksidaz protokolü

1. Kriyoprotektandan arındırmak için kesitler 3x10 dakika Tris-HCl tamponunda yıkandı.

2. Blocking serum içerisinde kesitler 2 saat boyunca bloklama işlemi (non-spesifik boyanmayı engellemek için) için inkübe edildi.

3. Tavşan anti-ER-β primer antikoru 1:10.000 dilüsyonunda 2 gece boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

4. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

5. Biyotin-konjuge eşek anti-tavşan sekonder antikoru 1:300 dilüsyonunda 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

6. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

7. Streptavidin solüsyonunda 1:1000 dilüsyonunda 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

8. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

9. Substrat kromojen solüsyonu olarak Ni-DAB kullanılarak antikor-antijen-enzim kompleksi çekirdekte görülebilir hale getirildi.

10. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

11. Blocking serum içerisinde kesitler 2 saat boyunca tekrar bloklama işlemi (non-spesifik boyanmayı engellemek için) için inkübe edildi.

12. Tavşan anti-Phoeniksin primer antikoru 1:1000 dilüsyonunda 2 gece boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

13. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

14. Biyotin-konjuge eşek anti-tavşan sekonder antikoru 1:300 dilüsyonunda 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

15. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

16. Streptavidin solüsyonunda 1:1000 dilüsyonunda 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

17. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

18. Substrat kromojen solüsyonu olarak DAB kullanılarak antikor-antijen-enzim kompleksi sitoplazmada görülebilir hale getirildi.

19. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

20. Kesitler lamlara yayıldı, kurutuldu ve DPX ile kapatıldı.

3.5.4. RSPO-1 nöronlarında östrojen reseptör alfa (ER-α) varlığının gösterildiği ikili indirekt immünperoksidaz protokolü

1. Kriyoprotektandan arındırmak için kesitler 3x10 dakika Tris-HCl tamponunda yıkandı.

2. Blocking serum içerisinde kesitler 2 saat boyunca bloklama işlemi (non-spesifik boyanmayı engellemek için) için inkübe edildi.

3. Tavşan anti-ER-α primer antikoru 1:5000 dilüsyonunda 1 gece boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

4. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

5. Biyotin-konjuge eşek anti-tavşan sekonder antikoru 1:300 dilüsyonunda 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

6. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

7. Streptavidin solüsyonunda 1:1000 dilüsyonunda 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

8. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

9. Substrat kromojen solüsyonu olarak Ni-DAB kullanılarak antikor-antijen-enzim kompleksi çekirdekte görülebilir hale getirildi.

10. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

11. Blocking serum içerisinde kesitler 2 saat boyunca tekrar bloklama işlemi (non-spesifik boyanmayı engellemek için) için inkübe edildi.

12. Tavşan anti-RSPO-1 primer antikoru 1:500 dilüsyonunda 3 gece boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

13. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

14. Biyotin-konjuge eşek anti-tavşan sekonder antikoru 1:300 dilüsyonunda 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

15. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

16. Streptavidin solüsyonunda 1:1000 dilüsyonunda 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

17. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

18. Substrat kromojen solüsyonu olarak DAB kullanılarak antikor-antijen-enzim kompleksi sitoplazmada görülebilir hale getirildi.

19. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

20. Kesitler lamlara yayıldı, kurutuldu ve DPX ile kapatıldı.

3.5.5. RSPO-1 nöronlarında östrojen reseptör alfa (ER-β) varlığının gösterildiği ikili indirekt immünperoksidaz protokolü

1. Kriyoprotektandan arındırmak için kesitler 3x10 dakika Tris-HCl tamponunda yıkandı.

2. Blocking serum içerisinde kesitler 2 saat boyunca bloklama işlemi (non-spesifik boyanmayı engellemek için) için inkübe edildi.

3. Tavşan anti-ER-β primer antikoru 1:10.000 dilüsyonunda 2 gece boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

4. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

5. Biyotin-konjuge eşek anti-tavşan sekonder antikoru 1:300 dilüsyonunda 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

6. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

7. Streptavidin solüsyonunda 1:1000 dilüsyonunda 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

8. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

9. Substrat kromojen solüsyonu olarak Ni-DAB kullanılarak antikor-antijen-enzim kompleksi çekirdekte görülebilir hale getirildi.

10. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

11. Blocking serum içerisinde kesitler 2 saat boyunca tekrar bloklama işlemi (non-spesifik boyanmayı engellemek için) için inkübe edildi.

12. Tavşan anti-RSPO-1 primer antikoru 1:500 dilüsyonunda 3 gece boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

13. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

14. Biyotin-konjuge eşek anti-tavşan sekonder antikoru 1:300 dilüsyonunda 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

15. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

16. Streptavidin solüsyonunda 1:1000 dilüsyonunda 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

17. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

18. Substrat kromojen solüsyonu olarak DAB kullanılarak antikor-antijen-enzim kompleksi sitoplazmada görülebilir hale getirildi.

19. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

20. Kesitler lamlara yayıldı, kurutuldu ve DPX ile kapatıldı.

3.5.6. RSPO-3 nöronlarında östrojen reseptör alfa (ER-α) varlığının gösterildiği ikili indirekt immünperoksidaz protokolü

1. Kriyoprotektandan arındırmak için kesitler 3x10 dakika Tris-HCl tamponunda yıkandı.

2. Blocking serum içerisinde kesitler 2 saat boyunca bloklama işlemi (non-spesifik boyanmayı engellemek için) için inkübe edildi.

3. Tavşan anti-ER-α primer antikoru 1:5000 dilüsyonunda 1 gece boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

4. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

5. Biyotin-konjuge eşek anti-tavşan sekonder antikoru 1:300 dilüsyonunda 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

6. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

7. Streptavidin solüsyonunda 1:1000 dilüsyonunda 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

8. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

9. Substrat kromojen solüsyonu olarak Ni-DAB kullanılarak antikor-antijen-enzim kompleksi çekirdekte görülebilir hale getirildi.

10. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

11. Blocking serum içerisinde kesitler 2 saat boyunca tekrar bloklama işlemi (non-spesifik boyanmayı engellemek için) için inkübe edildi.

12. Fare anti-RSPO-3 primer antikoru 1:1500 dilüsyonunda 1 gece oda sıcaklığında 2 gece + 4 °C 'de inkübe edildi.

13. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

14. Biyotin-konjuge eşek anti-fare sekonder antikoru 1:300 dilüsyonunda 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

15. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

16. Streptavidin solüsyonunda 1:1000 dilüsyonunda 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

17. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

18. Substrat kromojen solüsyonu olarak DAB kullanılarak antikor-antijen-enzim kompleksi sitoplazmada görülebilir hale getirildi.

19. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

20. Kesitler lamlara yayıldı, kurutuldu ve DPX ile kapatıldı.

3.5.7. RSPO-3 nöronlarında östrojen reseptör alfa (ER-β) varlığının gösterildiği ikili indirekt immünperoksidaz protokolü

1. Kriyoprotektandan arındırmak için kesitler 3x10 dakika Tris-HCl tamponunda yıkandı.

2. Blocking serum içerisinde kesitler 2 saat boyunca bloklama işlemi (non-spesifik boyanmayı engellemek için) için inkübe edildi.

3. Tavşan anti-ER-β primer antikoru 1:10.000 dilüsyonunda 2 gece boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

4. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

5. Biyotin-konjuge eşek anti-tavşan sekonder antikoru 1:300 dilüsyonunda 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

6. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

7. Streptavidin solüsyonunda 1:1000 dilüsyonunda 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

8. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

9. Substrat kromojen solüsyonu olarak Ni-DAB kullanılarak antikor-antijen-enzim kompleksi çekirdekte görülebilir hale getirildi.

10. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

11. Blocking serum içerisinde kesitler 2 saat boyunca tekrar bloklama işlemi (non-spesifik boyanmayı engellemek için) için inkübe edildi.

12. Fare anti-RSPO-3 primer antikoru 1:1500 dilüsyonunda 1 gece oda sıcaklığında 2 gece + 4 °C 'de inkübe edildi.

13. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

14. Biyotin-konjuge eşek anti-fare sekonder antikoru 1:300 dilüsyonunda 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

15. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

16. Streptavidin solüsyonunda 1:1000 dilüsyonunda 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

17. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

18. Substrat kromojen solüsyonu olarak DAB kullanılarak antikor-antijen-enzim kompleksi sitoplazmada görülebilir hale getirildi.

19. Tris-HCl tamponunda 3x10 dakika yıkandı.

20. Kesitler lamlara yayıldı, kurutuldu ve DPX ile kapatıldı.

3.6. Preparatların İncelenmesi, Hücre Sayımı ve İstatistiksel Analiz

Değerlendirilecek alanlar için "The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates" (Paxinos, & Watson, 2007) atlası kullanıldı. Arkuat çekirdek için bregma -2,12 mm ile -3,80 mm, ventromedial çekirdek için bregma -1.72 mm ile -3.36 mm, paraventriküler çekirdek için bregma -1.56 mm ile -2,04 mm ve supraoptik çekirdek için bregma -0.48 mm ile -1.44 mm koordinat aralıkları belirlendi. Her denekten 5 seri kesit cam viallere alındı. Bir serisindeki dokular ikili immünperoksidaz yöntemi ile işaretlendi.

Tez çalışmasından elde edilen kesitler boyandıktan sonra Olympus BX50 fotomikroskop'un 40X objektifinde dijital kamera (Olympus DP71 CCD color camera, 1,5 million pixel) kullanılarak fotoğraflandı. Hücre sayımı elde edilen fotoğraflar üzerinden ve ImageJ yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Hücre

sayımında PNX, RSPO-1 VE RSPO-3 nöronlarında ER-α ve ER-β eksprese eden nöronların oranları hesaplandı.

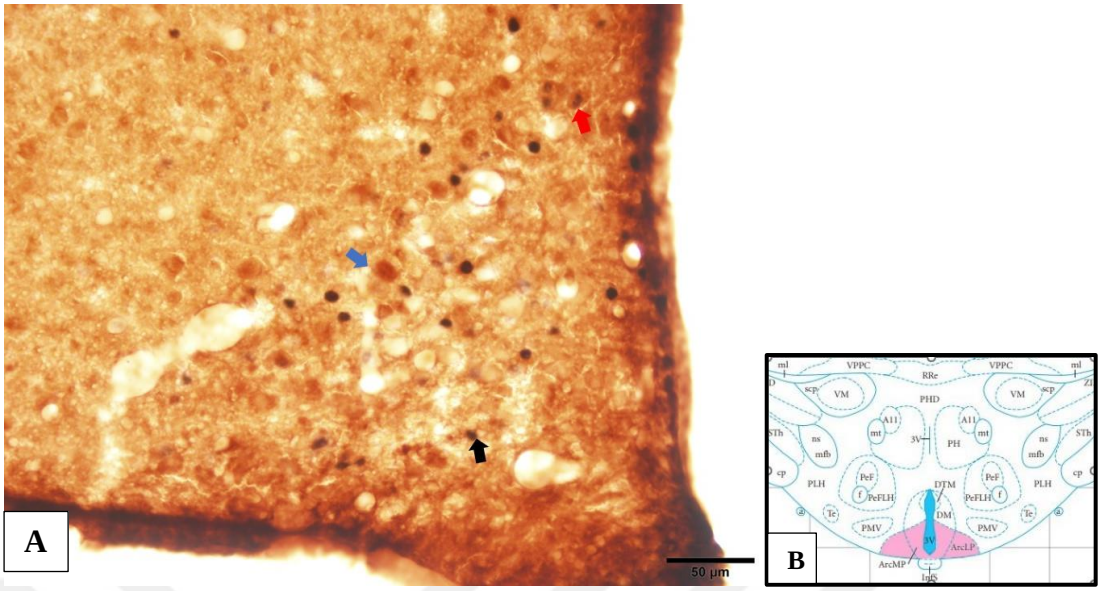
İstatistiksel analizler SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, version 20, SSPS Inc., Chicago, IL, USA) (SPSS) programı kullanılarak yapıldı. Gruplara ait verilerin normal dağılıp dağılmadığı Shapiro-Wilk Testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteriyorsa T-Test, normal dağılım göstermiyorsa Mann-Whitney U testi uygulandı. p değeri 0,05'ten küçük olan değerler anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

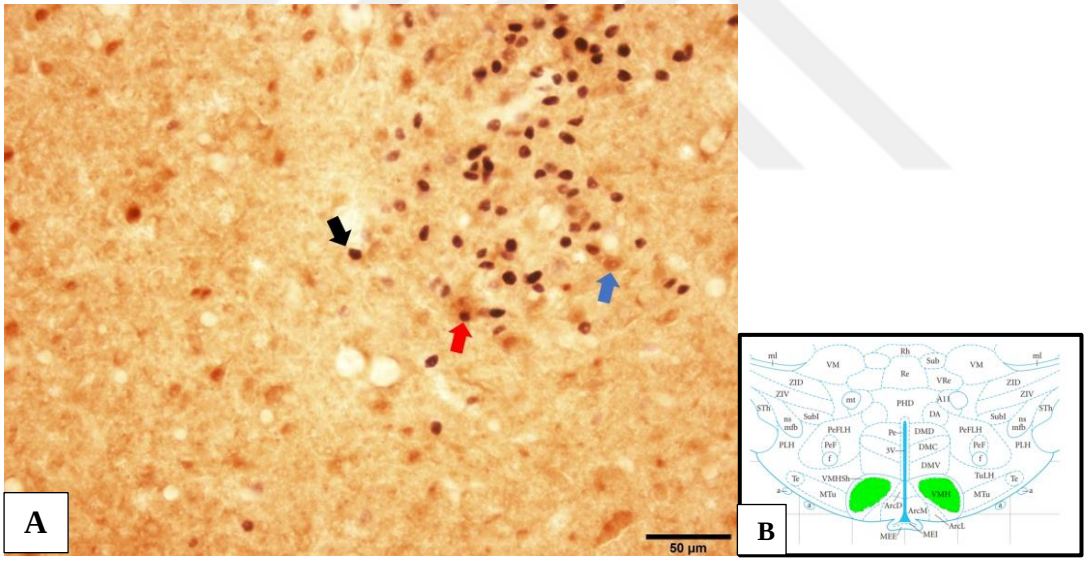
4.1. İmmünohistokimyasal İşaretlemeler

Deneklerden elde edilen kesitlerde ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi kullanılarak Phoeniksin, RSPO-1, RSPO-3 nöronlarında ER-α ve ER-β işaretlemeleri yapıldı. Nöronal çekirdeklerde bulunan ER-α ve ER-β nikel-DAB ile siyah renkte immünohistokimyasal olarak işaretlendikten sonra, aynı kesitlerdeki sitoplazmada bulunan Phoeniksin, RSPO-1, RSPO-3 DAB ile kahverengi olarak işaretlendi. Ardından kesitler lamlara yayıldı ve ışık mikroskobunda incelendi. Hem sitoplazmalarında hem de çekirdeklerinde boyanma görülen nöronların ikili işaretlendiği kabul edildi.

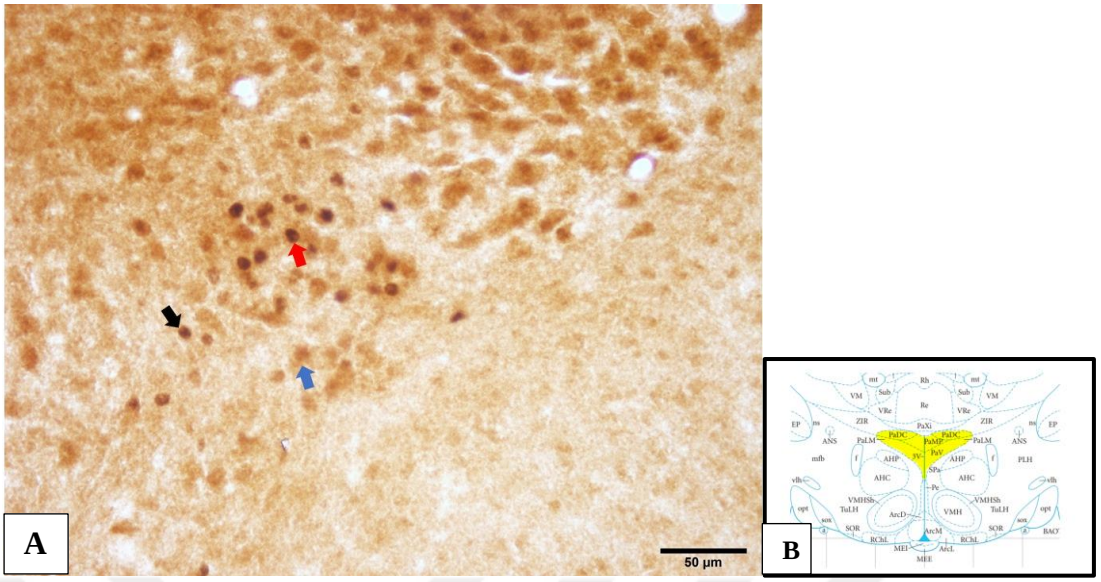
Hipotalamusun ventromedial hipotalamik çekirdeğinde ve arkuat çekirdeğinde ER-α ile kolokalizasyon gösteren Phoeniksin (Şekil 15-A, B; Şekil 16-A, B), RSPO-1 (Şekil 19-A, B; Şekil 20-A, B), RSPO-3 (Şekil 23-A, B; Şekil 24-A, B), nöronlarının oranları belirlenirken, supraoptik çekirdeğinde ve paraventriküler çekirdeğinde ER-β ile kolokalizasyon gösteren Phoeniksin (Şekil 17-A, B; Şekil 18-A, B), RSPO-1 (Şekil 21-A, B; Şekil 22-A, B), RSPO-3 (Şekil 25-A, B; Şekil 26-A, B) nöronlarının oranları değerlendirildi.



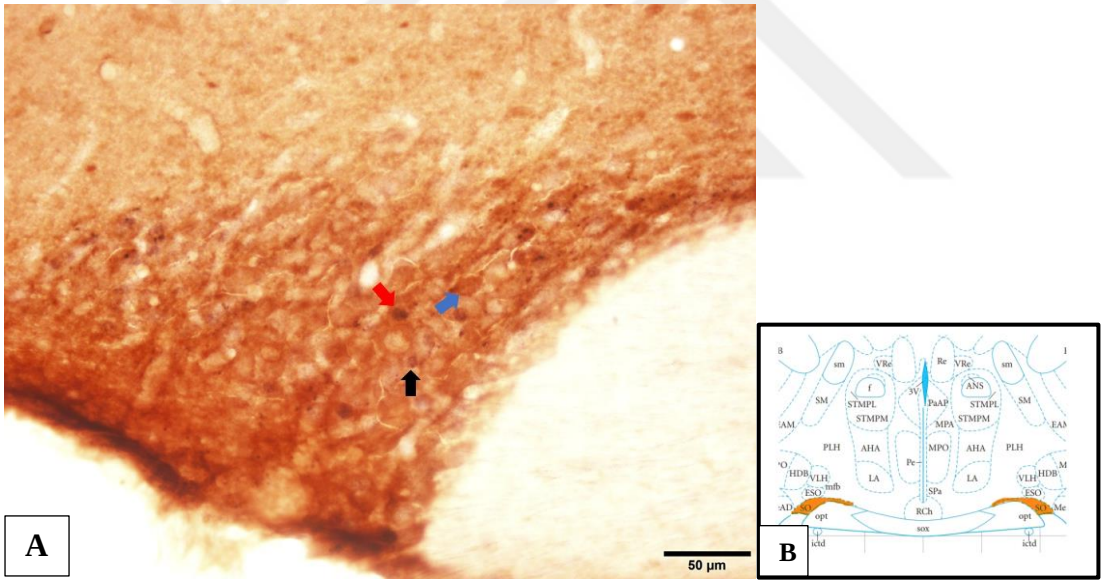
Şekil 15. (A) PNX nöronlarında immünohistokimyasal işaretlemeler. Arkuat çekirdekte (ARC) sadece ER-α eksprese eden nöron çekirdekleri siyah renkli (siyah ok), sadece PNX eksprese eden nöronlar kahverengi renkli (mavi ok) ve ER-α eksprese eden PNX nöronları (kırmızı ok) ile gösterilmiştir. Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre (B) ARC'nin lokalizasyonu.



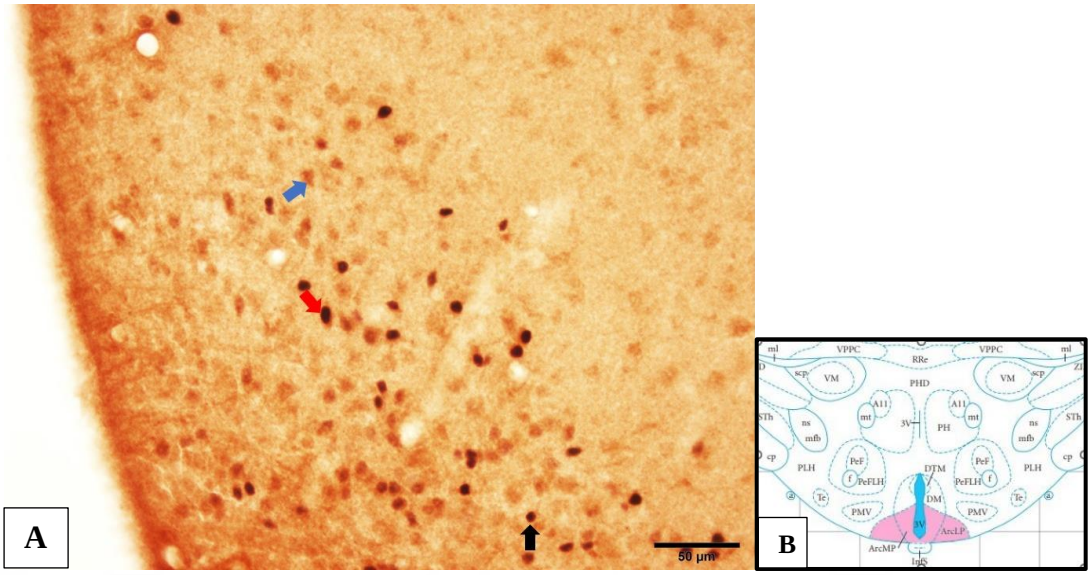
Şekil 16. (A) PNX nöronlarında immünohistokimyasal işaretlemeler. Ventromedial hipotalamik çekirdekte (VMN) sadece ER-α eksprese eden nöron çekirdekleri siyah renkli (siyah ok), sadece PNX eksprese eden nöronlar kahverengi renkli (mavi ok) ve ER-α eksprese eden PNX nöronları (kırmızı ok) ile gösterilmiştir. Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre (B) VMN'nin lokalizasyonu.



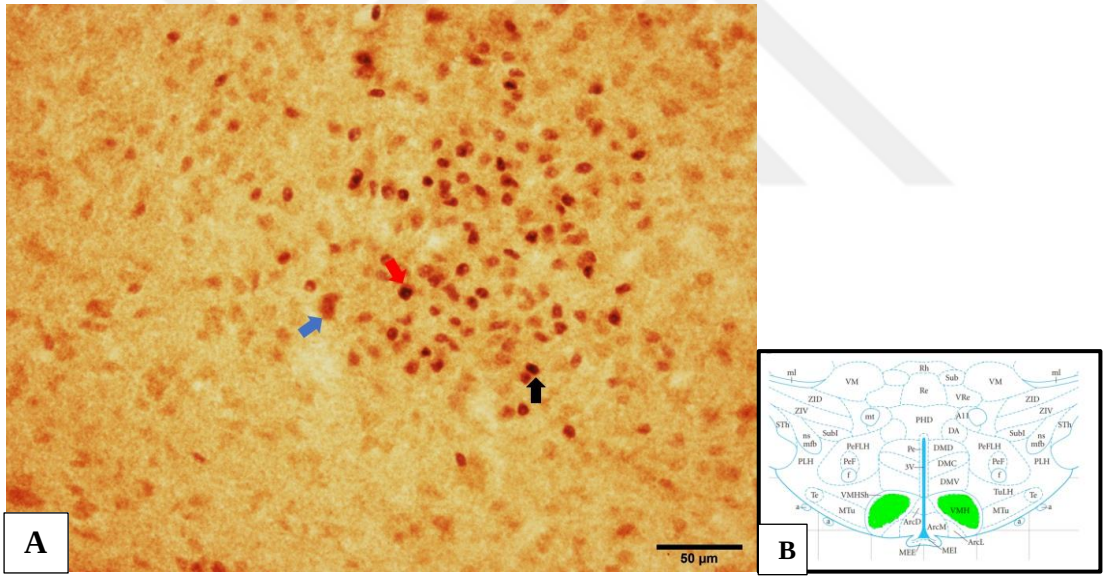
Şekil 17. (A) PNX nöronlarında immünohistokimyasal işaretlemeler. Paraventriküler çekirdekte (PVN) sadece ER-β eksprese eden nöron çekirdekleri siyah renkli (siyah ok), sadece PNX eksprese eden nöronlar kahverengi renkli (mavi ok) ve ER-β eksprese eden PNX nöronları (kırmızı ok) ile gösterilmiştir. Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre (B) PVN'nin lokalizasyonu.



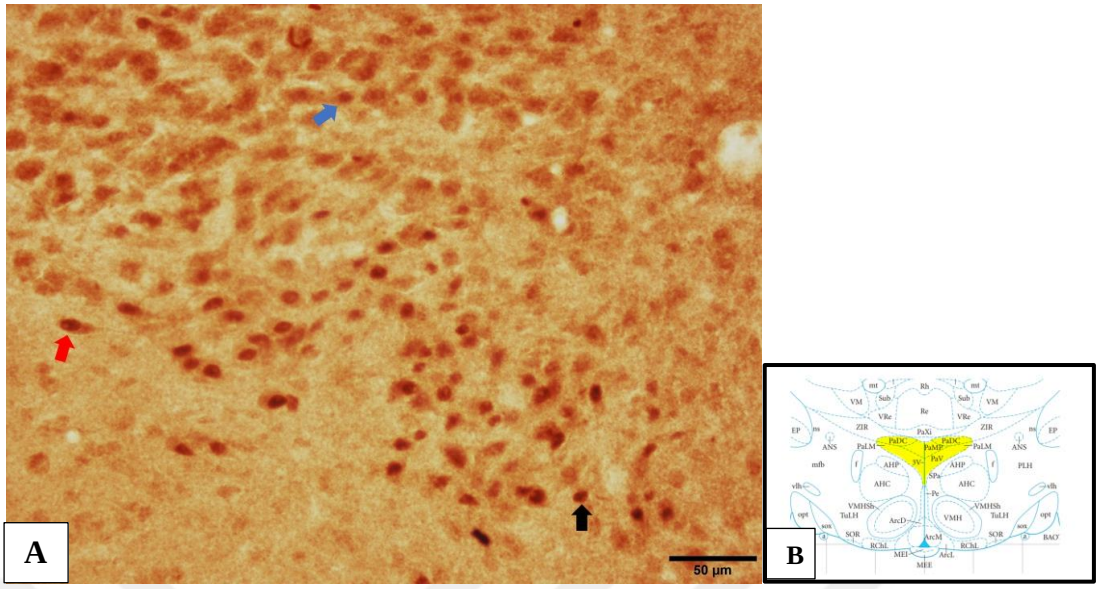
Şekil 18. (A) PNX nöronlarında immünohistokimyasal işaretlemeler. Supraoptik çekirdekte (SON) sadece ER-β eksprese eden nöron çekirdekleri siyah renkli (siyah ok), sadece PNX eksprese eden nöronlar kahverengi renkli (mavi ok) ve ER-β eksprese eden PNX nöronları (kırmızı ok) ile gösterilmiştir. Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre (B) SON'nun lokalizasyonu.



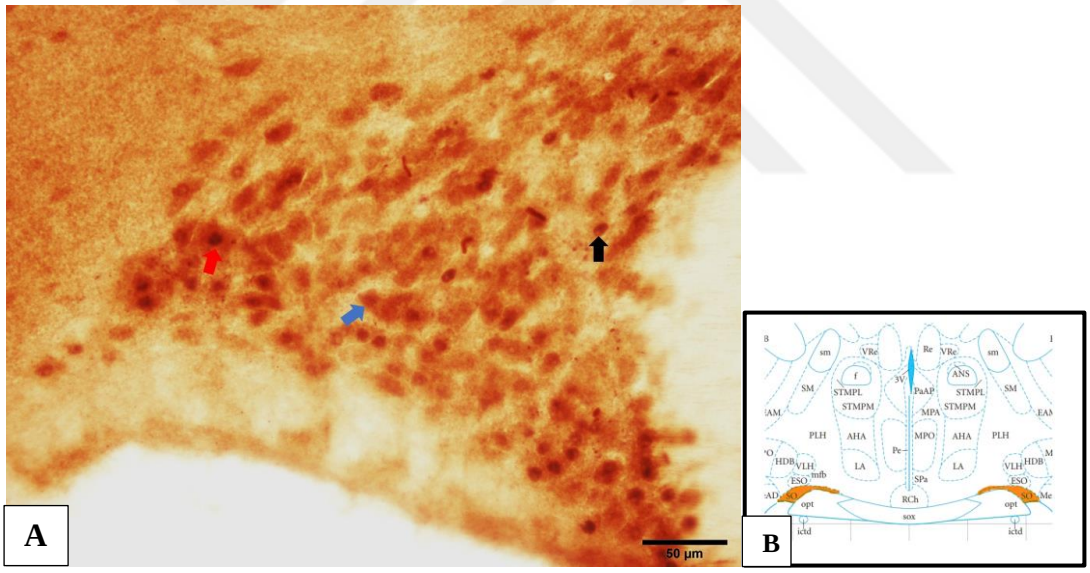
Şekil 19. (A) RSPO-1 nöronlarında immünohistokimyasal işaretlemeler. Arkuat çekirdekte (ARC) sadece ER-α eksprese eden nöron çekirdekleri siyah renkli (siyah ok), sadece RSPO-1 eksprese eden nöronlar kahverengi renkli (mavi ok) ve ER-α eksprese eden RSPO-1 nöronları (kırmızı ok) ile gösterilmiştir. Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre (B) ARC'nin lokalizasyonu.



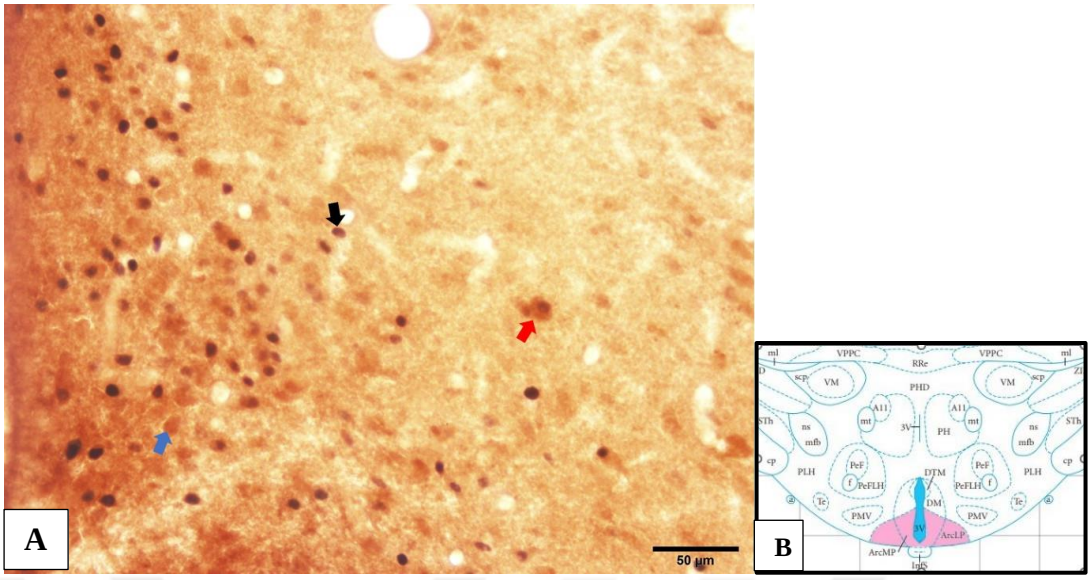
Şekil 20. (A) RSPO-1 nöronlarında immünohistokimyasal işaretlemeler. Ventromedial hipotalamik çekirdekte (VMN) sadece ER-α eksprese eden nöron çekirdekleri siyah renkli (siyah ok), sadece RSPO-1 eksprese eden nöronlar kahverengi renkli (mavi ok) ve ER-α eksprese eden RSPO-1 nöronları (kırmızı ok) ile gösterilmiştir. Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre (B) VMN'nin lokalizasyonu.



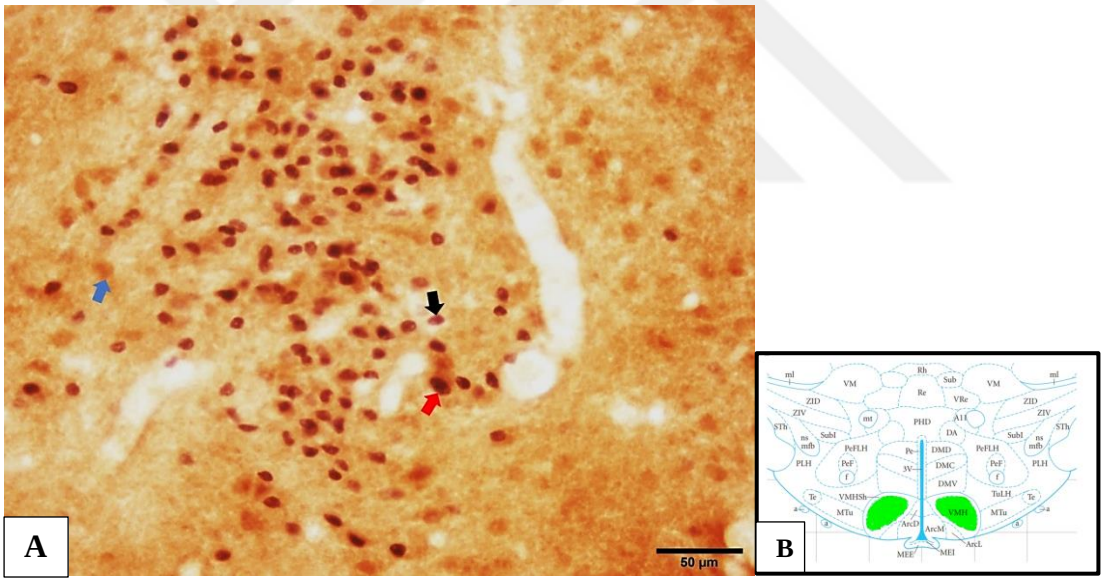
Şekil 21. RSPO-1 nöronlarında immünohistokimyasal işaretlemeler. Paraventriküler çekirdekte (PVN) sadece ER-β eksprese eden nöron çekirdekleri siyah renkli (siyah ok), sadece RSPO-1 eksprese eden nöronlar kahverengi renkli (mavi ok) ve ER-β eksprese eden RSPO-1 nöronları (kırmızı ok) ile gösterilmiştir. Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre (B) PVN'nin lokalizasyonu.



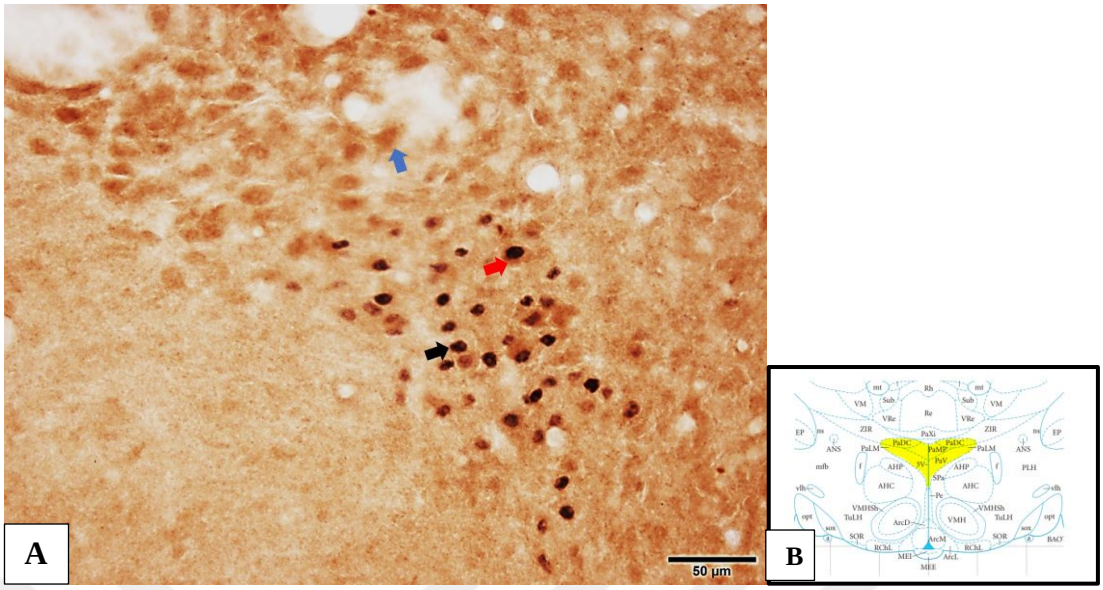
Şekil 22. (A) RSPO-1 nöronlarında immünohistokimyasal işaretlemeler. Supraoptik çekirdekte (SON) sadece ER-β eksprese eden nöron çekirdekleri siyah renkli (siyah ok), sadece RSPO-1 eksprese eden nöronlar kahverengi renkli (mavi ok) ve ER-β eksprese eden RSPO-1 nöronları (kırmızı ok) ile gösterilmiştir. Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre (B) SON'nun lokalizasyonu.



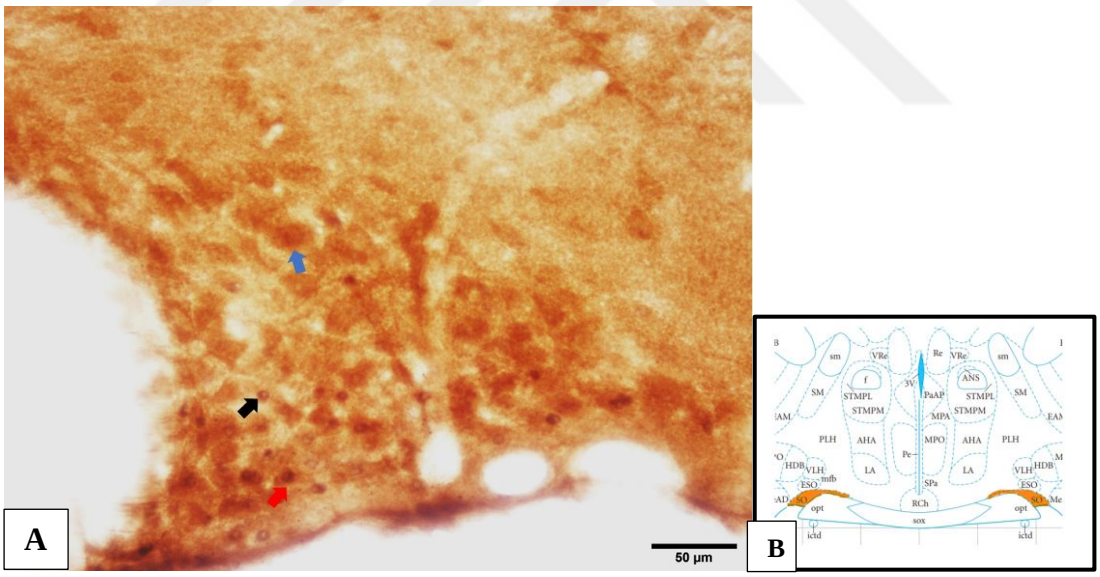
Şekil 23. (A) RSPO-3 nöronlarında immünohistokimyasal işaretlemeler. Arkuat çekirdekte (ARC) sadece ER-α eksprese eden nöron çekirdekleri siyah renkli (siyah ok), sadece RSPO-3 eksprese eden nöronlar kahverengi renkli (mavi ok) ve ER-α eksprese eden RSPO-3 nöronları (kırmızı ok) ile gösterilmiştir. Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre (B) ARC'nin lokalizasyonu.



Şekil 24. (A) RSPO-3 nöronlarında immünohistokimyasal işaretlemeler. Ventromedial hipotalamik çekirdekte (VMN) sadece ER-α eksprese eden nöron çekirdekleri siyah renkli (siyah ok), sadece RSPO-3 eksprese eden nöronlar kahverengi renkli (mavi ok) ve ER-α eksprese eden RSPO-3 nöronları (kırmızı ok) ile gösterilmiştir. Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre (B) VMN'nin lokalizasyonu.



Şekil 25. (A) RSPO-3 nöronlarında immünohistokimyasal işaretlemeler. Paraventriküler çekirdekte (PVN) sadece ER-β eksprese eden nöron çekirdekleri siyah renkli (siyah ok), sadece RSPO-3 eksprese eden nöronlar kahverengi renkli (mavi ok) ve ER-β eksprese eden RSPO-3 nöronları (kırmızı ok) ile gösterilmiştir. Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre (B) PVN'nin lokalizasyonu.



Şekil 26. (A) RSPO-3 nöronlarında immünohistokimyasal işaretlemeler. Supraoptik çekirdekte (SON) sadece ER-β eksprese eden nöron çekirdekleri siyah renkli (siyah ok), sadece RSPO-3 eksprese eden nöronlar kahverengi renkli (mavi ok) ve ER-β eksprese eden RSPO-3 nöronları (kırmızı ok) ile gösterilmiştir. Paxinos ve Watson (2007) sıçan atlasına göre (B) SON'nun lokalizasyonu.

4.2. Phoeniksin, RSPO-1, RSPO-3 Nöronlarında Östrojen Reseptörlerinin Varlığı

İki deney grubu kullanılmıştır. İlk grup proöstrusta sakrifiye edilen gruptur. İkinci grup ise ovariektomi uygulanmış ve 14. günün sonunda sakrifiye edilen gruptur. Bu deneklerden elde edilen beyin kesitlerinde yapılan immmünohistokimyasal boyamalar Phoeniksin, RSPO-1, RSPO-3 nöronlarında ER-α ve ER- β varlığını göstermiştir.

4.2.1. Phoeniksin nöronlarında östrojen reseptörlerinin varlığı

VMN'de ER-α içeren Phoeniksin nöronları açısından ovariektomi grubu ve proöstrus grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır. Ancak ARC'de ER-α içeren Phoeniksin nöronları açısından bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur. PVN ve SON'de ise ER-β içeren Phoeniksin nöronları açısından ovariektomi grubu ve proöstrus grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur (Şekil 35).

4.2.1.1. Phoeniksin nöronlarında ER-α ekspresyonu

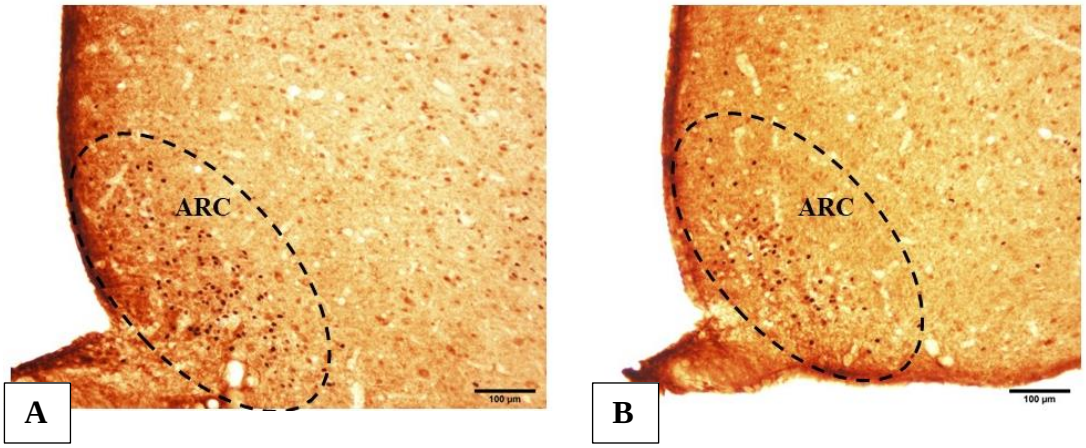
Hipotalamusun ventromedial hipotalamik çekirdek (Şekil 29) ve arkuat çekirdeğinde (Şekil 27) bulunan Phoeniksin nöronlarında ER-α ekspresyonu değerlendirildi.

Ventromedial hipotalamik çekirdekte proöstrus grubundaki deneklerde Phoeniksin nöronlarında ortalama %34,93±6,91'inin, ovariektomi grubundaki deneklerde ise %15,26±2,21'inin ER-α ekspresyonuna sahip olduğu, Arkuat çekirdekte proöstrus grubundaki deneklerde Phoeniksin nöronlarında ortalama %41,47±7,04'ünün, ovariektomi grubundaki deneklerde ise %45,39±3,66'sının ER-α ekspresyonuna sahip olduğu bulundu (Tablo 9).

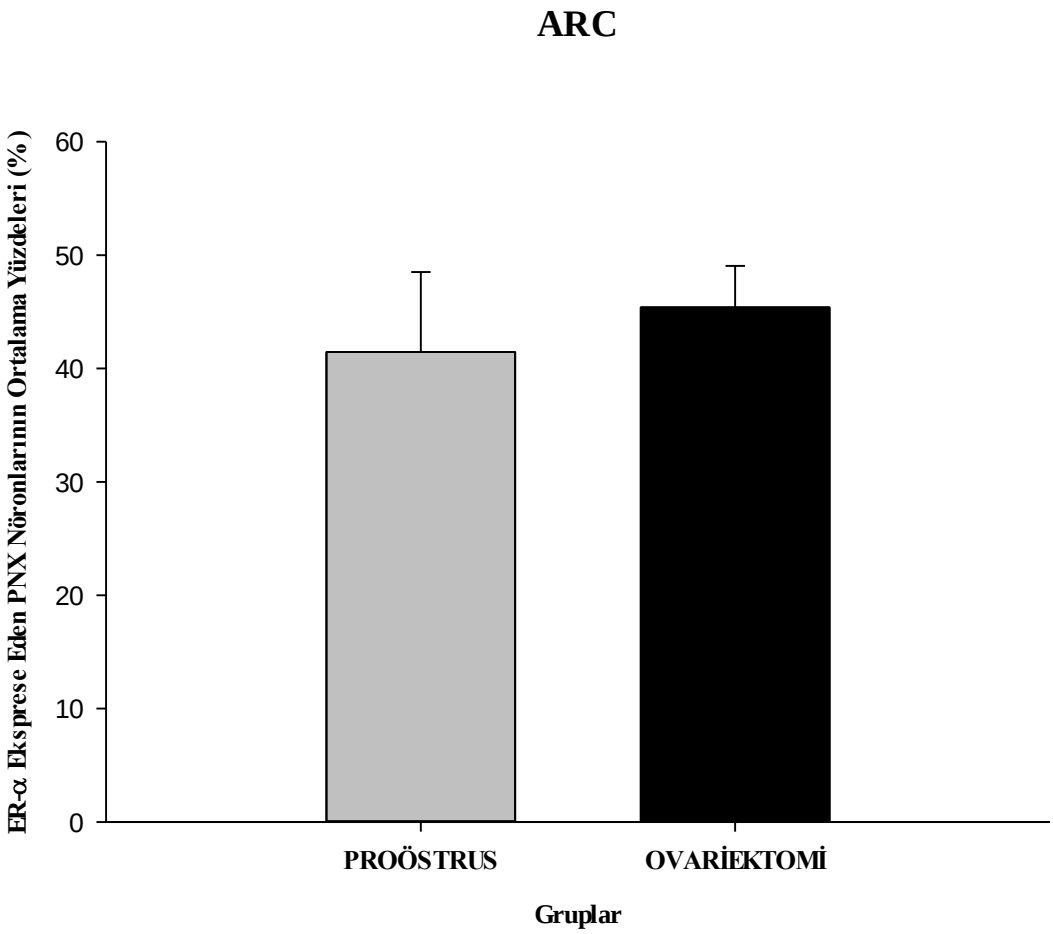
Ventromedial hipotalamik çekirdekte ($p=0,04$) ER-α eksprese eden Phoeniksin nöronları açısından proöstrus grubu ve ovariektomi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır ancak arkuat çekirdekte ($p=0,63$) istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur (Şekil 28 ve Şekil 30).

Tablo 9. ER-α eksprese eden PNX nöronlarının ortalama sayıları ve yüzdeleri ± SE.

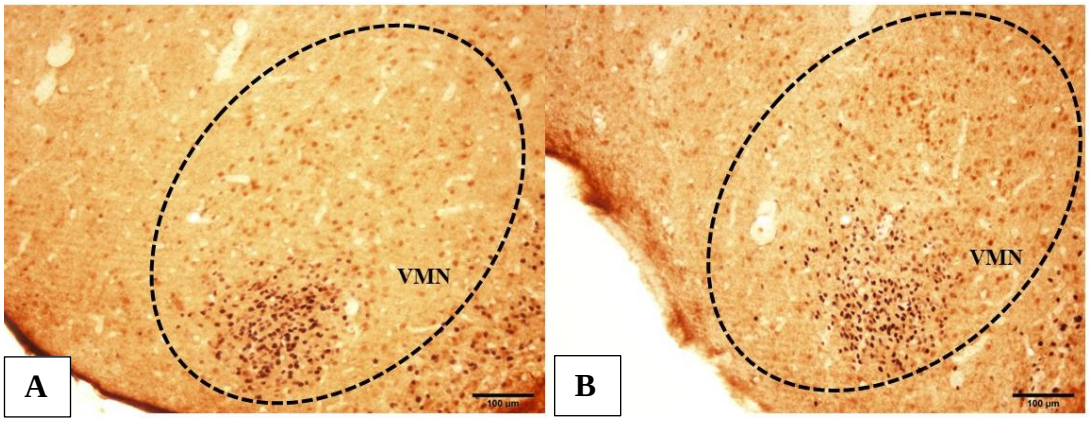
Deney Grupları	Alan	PNX Nöronlarının Ortalama Sayıları	ER-α Eksprese Eden PNX Nöronlarının Ortalama Sayıları	ER-α Eksprese Eden PNX Nöronlarının Ortalama Yüzdeleri
İntakt proöstrus grubu	ARC	1562,80±55,61	648,80±109,40	41,47±7,04
	VMN	1766,40±163,17	650,00±170,88	34,93±6,91
Ovariektomi grubu	ARC	1595,60±143,74	713,40±61,92	45,39±3,66
	VMN	1499,40±100,23	223,20±28,82	15,26±2,21



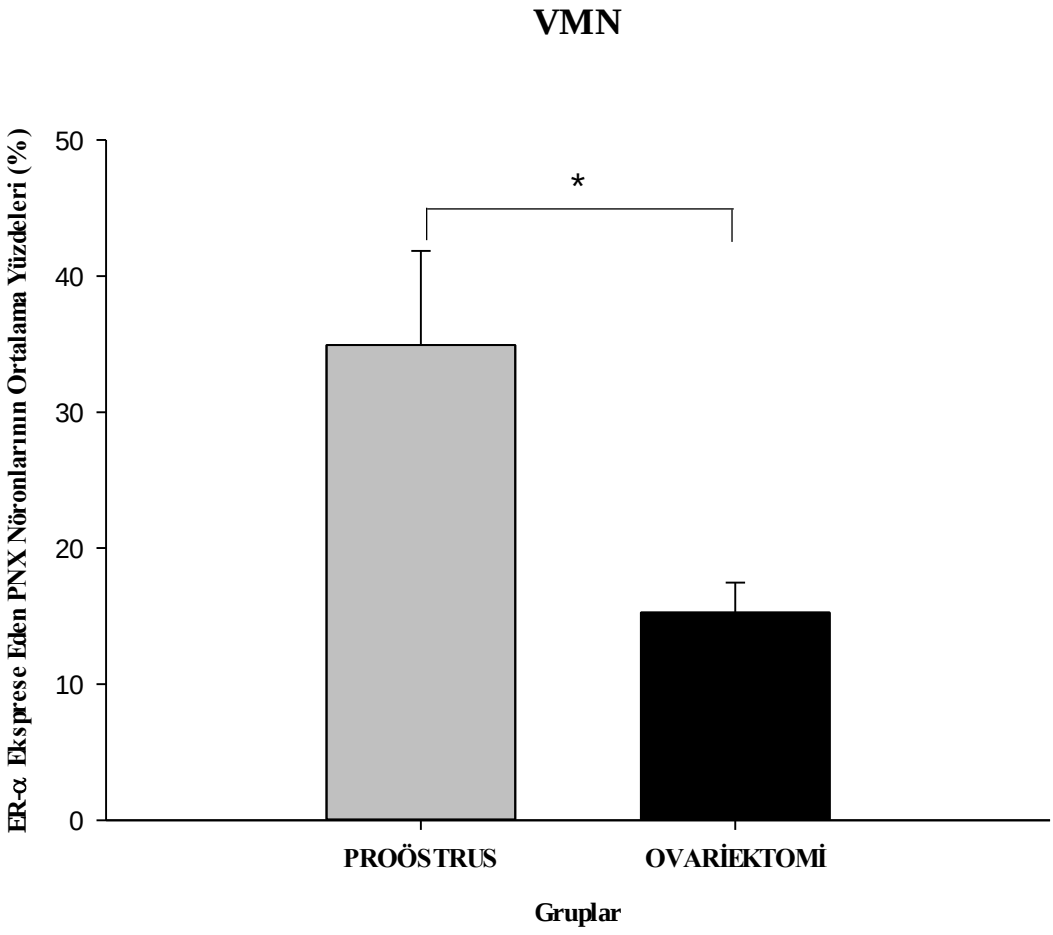
Şekil 27. Arkuat çekirdekte (ARC) Phoeniksin nöronlarında ER-α'nın ekspresyonu. (**A**) Proöstrus Grubu. (**B**) Ovariektomi Grubu



Şekil 28. Arkuat çekirdekte (ARC) PNX nöronlarında ER-α ekspresyonu.



Şekil 29. Ventromedial hipotalamik çekirdekte (VMN) Phoeniksin nöronlarında ER-α'nın ekspresyonu. (**A**) Proöstrus Grubu. (**B**) Ovariektomi Grubu



Şekil 30. Ventromedial hipotalamik çekirdekte (VMN) PNX nöronlarında ER-α ekspresyonu (*p<0,05).

4.2.1.2. Phoeniksin nöronlarında ER- β ekspresyonu

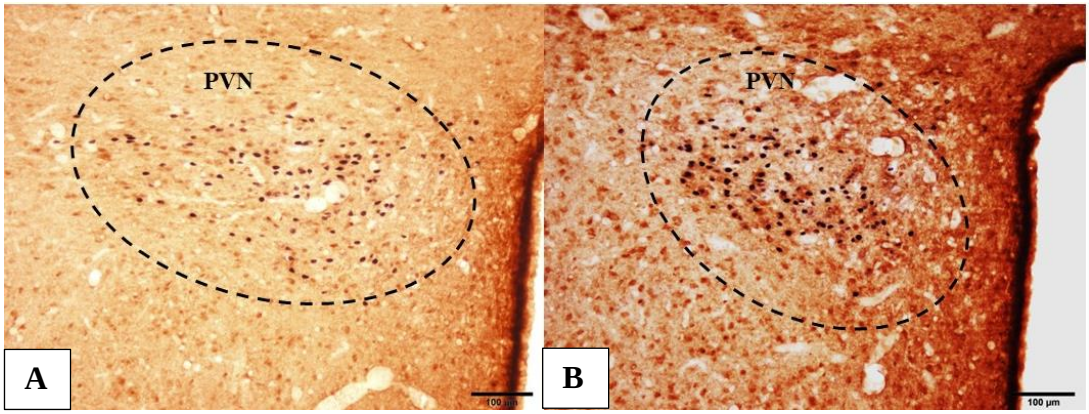
Hipotalamusun paraventriküler çekirdek (Şekil 31) ve supraoptik çekirdeğinde (Şekil 33) bulunan Phoeniksin nöronlarında ER-β ekspresyonu değerlendirildi.

Paraventriküler çekirdekte proöstrus grubundaki deneklerde Phoeniksin nöronlarında ortalama %15,88±5,99'unun, ovariektomi grubundaki deneklerde ise %25,12±4,28'inin ER-β ekspresyonuna sahip olduğu, supraoptik çekirdekte proöstrus grubundaki deneklerde Phoeniksin nöronlarında ortalama %19,80±6,87'sinin, ovariektomi grubundaki deneklerde ise %16,24±4,21'inin ER-β ekspresyonuna sahip olduğu bulundu (Tablo 10).

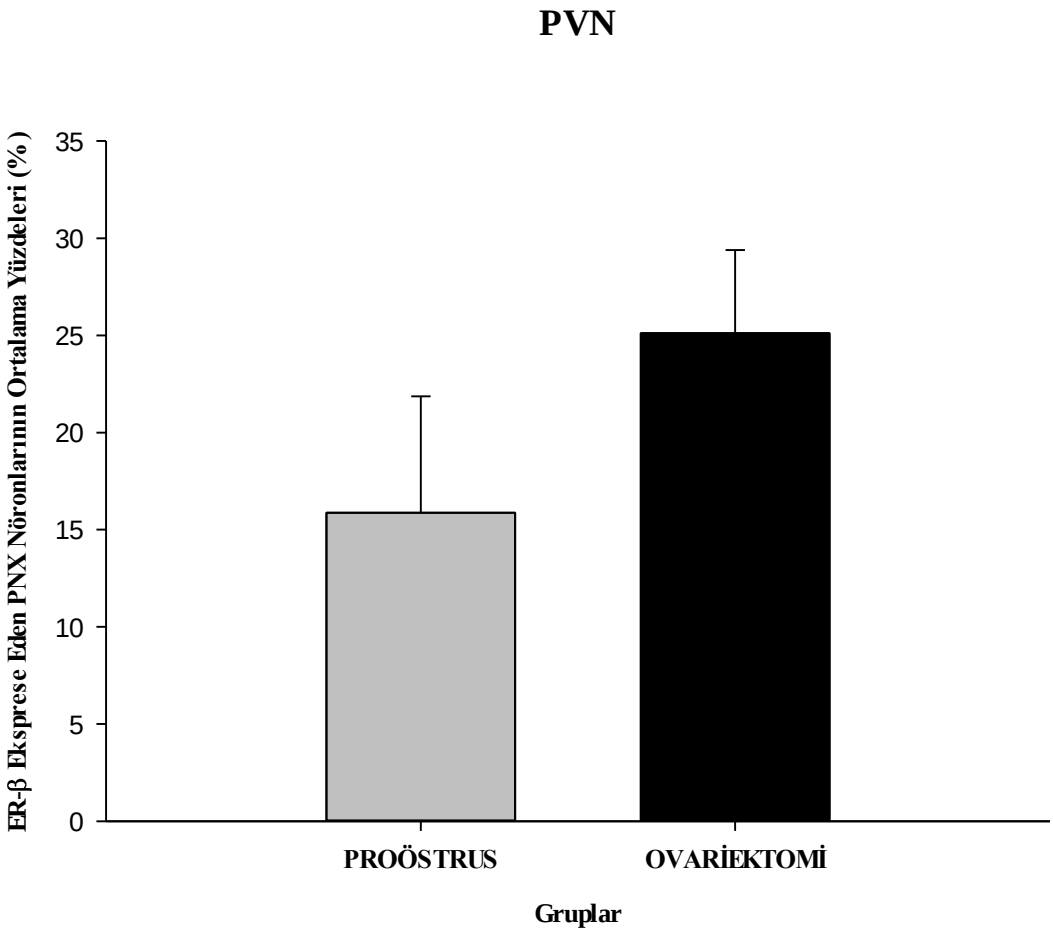
Paraventriküler çekirdekte (p=0,24) ve supraoptik çekirdekte (p=0,67) ER-β eksprese eden Phoeniksin nöronları açısından proöstrus grubu ve ovariektomi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur (Şekil 32 ve Şekil 34).

Tablo 10. ER- β eksprese eden PNX nöronlarının ortalama sayıları ve yüzdeleri ± SE.

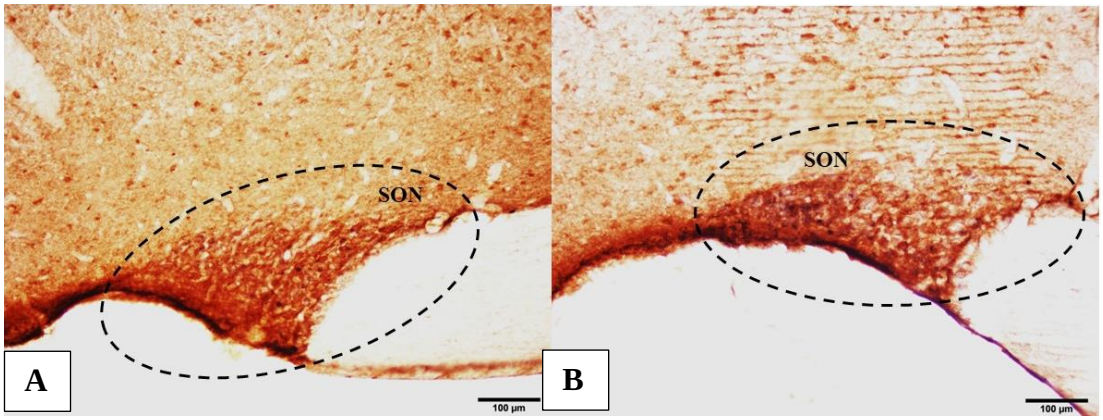
Deney Grupları	Alan	PNX Nöronlarının Ortalama Sayıları	ER- β Eksprese Eden PNX Nöronlarının Ortalama Sayıları	ER- β Eksprese Eden PNX Nöronlarının Ortalama Yüzdeleri
İntakt proöstrus grubu	PVN	901,20±144,54	114,60±29,11	15,88±5,99
	SON	839,80±67,71	155,80±50,22	19,80±6,87
Ovariektomi grubu	PVN	717,00±101,96	164,80±15,59	25,12±4,28
	SON	627,00±43,09	98,80±22,64	16,24±4,21



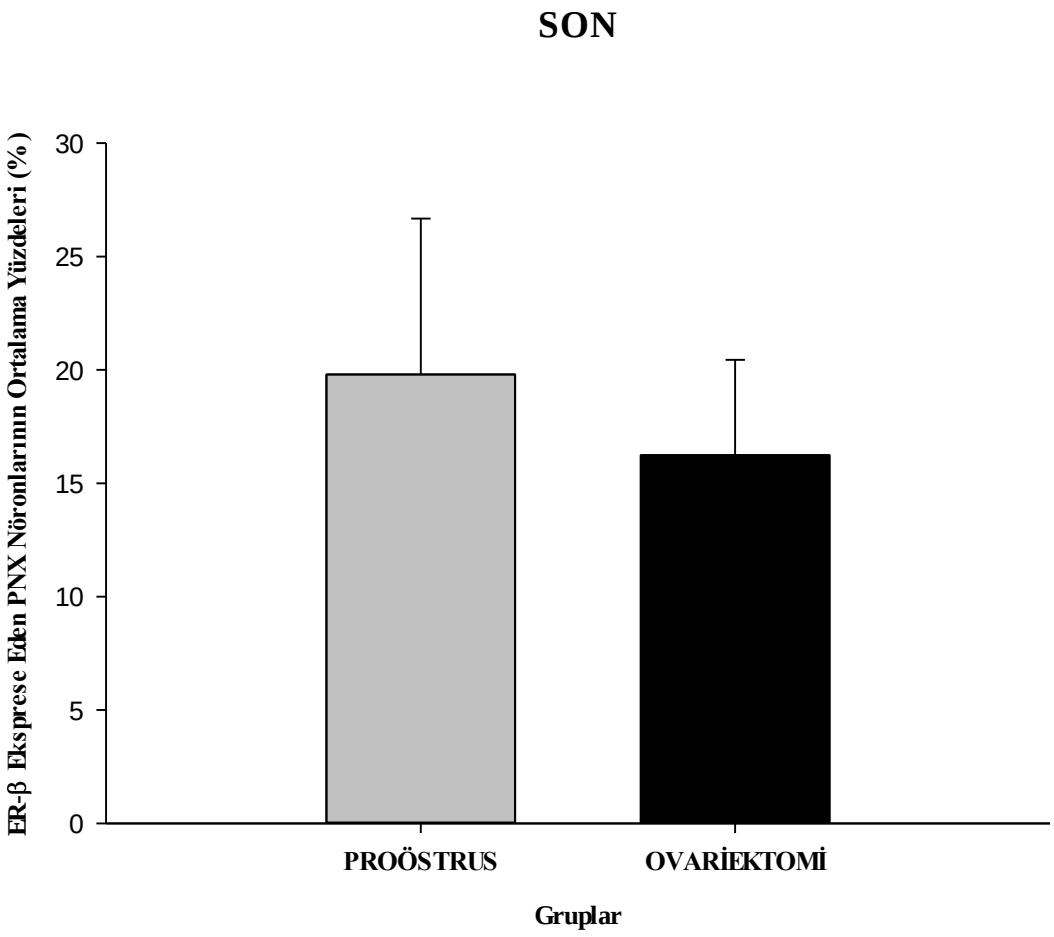
Şekil 31. Paraventriküler çekirdekte (PVN) Phoeniksin nöronlarında ER- β'nın ekspresyonu. (**A**) Proöstrus Grubu. (**B**) Ovariektomi Grubu.



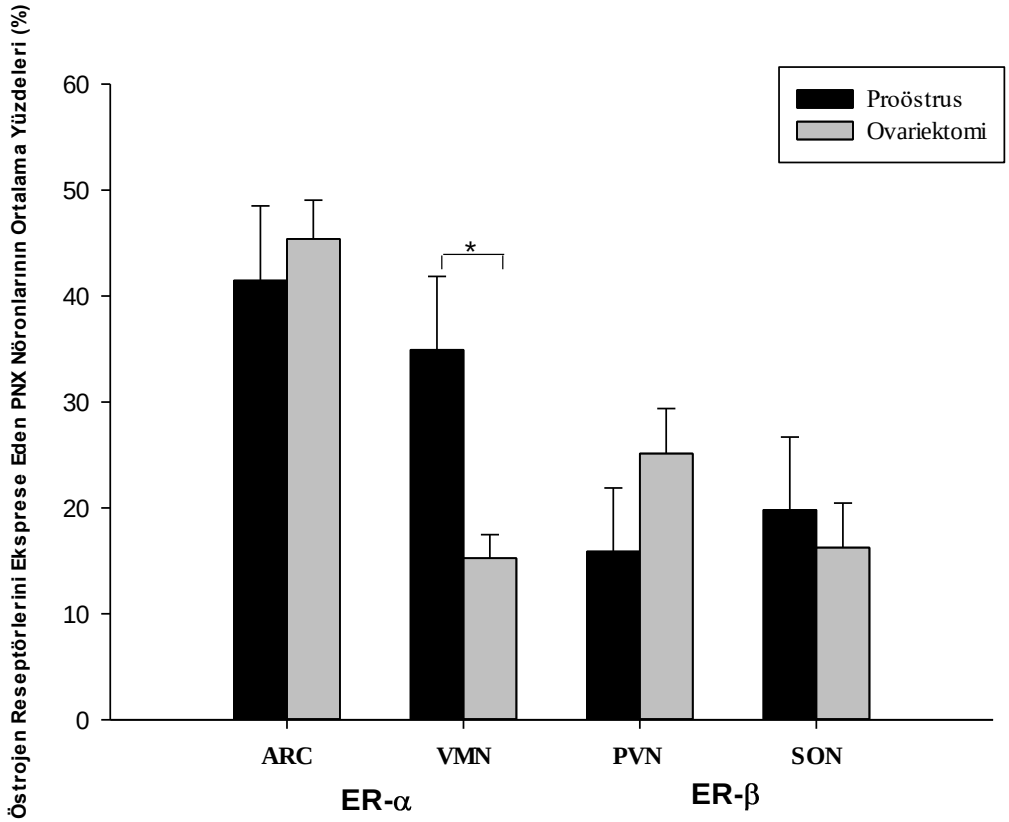
Şekil 32. Paraventriküler çekirdekte (PVN) PNX nöronlarında ER-β ekspresyonu.



Şekil 33. Supraoptik çekirdekte (SON) Phoeniksin nöronlarında ER- β'nın ekspresyonu. (**A**) Proöstrus Grubu. (**B**) Ovariektomi Grubu.



Şekil 34. Supraoptik çekirdekte (SON) PNX nöronlarında ER-β ekspresyonu.



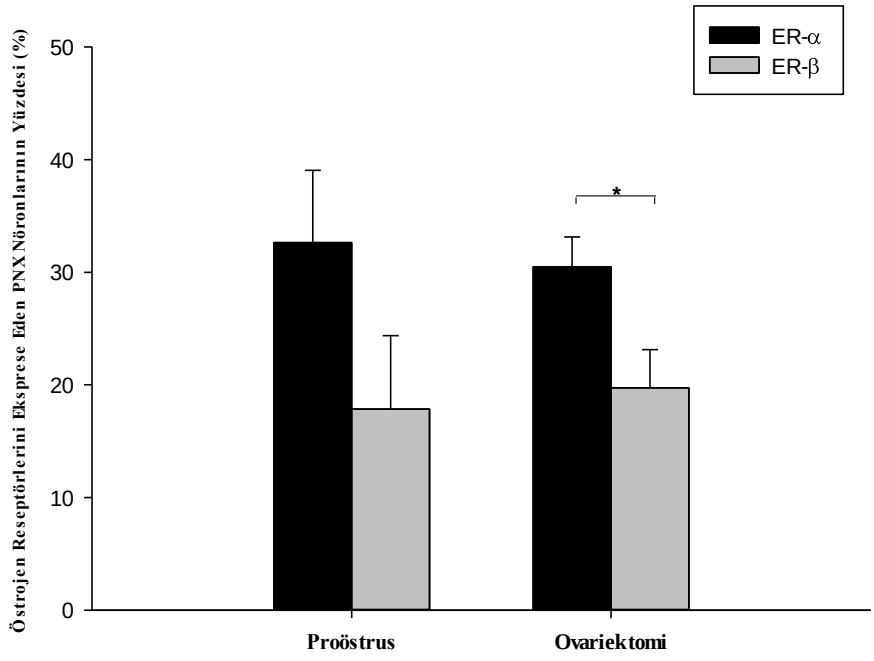
Şekil 35. Ovariektomi ve proöstrus gruplarında ARC, VMN, PVN ve SON'deki östrojen reseptörü eksprese eden PNX nöronlarının yüzdelerinin karşılaştırılması (*p<0,05)

4.2.1.3. Hipotalamustaki phoeniksin nöronlarında östrojen reseptörlerinin ekspresyonunun gruplar arası karşılaştırılması

Proöstrus grubundaki deneklerin hipotalamusunda ER- α eksprese eden PNX nöronlarının ortalama yüzdeleri %32,63±6,42; ER-β eksprese eden PNX nöronlarının ortalama yüzdeleri %17,85±6,53'tür (Tablo 11).

Ovariektomi grubundaki deneklerde ise ER- α eksprese eden PNX nöronlarının ortalama yüzdeleri %30,48±2,67; ER-β eksprese eden PNX nöronlarının ortalama yüzdesi %19,74±3,40'tır (Tablo 11).

Proöstrus grubunda ER-α eksprese eden Phoeniksin nöronları ve ER-β eksprese eden Phoeniksin, nöronlarının yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur (p=0,145). Ancak ovariektomi grubunda bu nöronların yüzdeleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (p=0,038) (Şekil 36).



Şekil 36. Hipotalamustaki Phoeniksin Nöronlarında Östrojen Reseptörlerinin Ekspresyonunun Gruplar Arası Karşılaştırılması (*p<0,05)

Tablo 11. Hipotalamusta ER-α ve ER- β eksprese eden RSPO-1 nöronlarının yüzdeleri ± SE.

Deney Grupları	Hipotalamusta ER- α Eksprese Eden PNX Nöronlarının Ortalama Yüzdeleri	Hipotalamusta ER- β Eksprese Eden PNX Nöronlarının Ortalama Yüzdeleri
Proöstrus	32,63±6,42	17,85±6,53
Ovariektomi	30,48±2,67	19,74±3,40

4.2.2. RSPO-1 nöronlarında östrojen reseptörlerinin varlığı

VMN ve ARC'de ER-α içeren RSPO-1 nöronları açısından ovariektomi grubu ve proöstrus grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur. PVN ve SON'de ise ER-β içeren RSPO-1 nöronları açısından her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur (Şekil 45).

4.2.2.1. RSPO-1 nöronlarında ER-α ekspresyonu

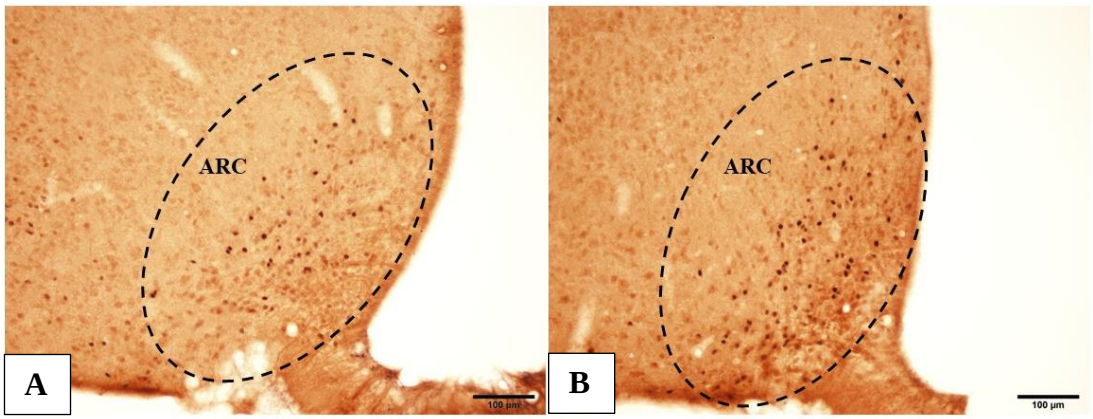
Hipotalamusun ventromedial hipotalamik çekirdek (Şekil 39) ve arkuat çekirdeğinde (Şekil 37) bulunan RSPO-1 nöronlarında ER-α ekspresyonu değerlendirildi.

Ventromedial hipotalamik çekirdekte proöstrus grubundaki deneklerde RSPO-1 nöronlarında ortalama %72,55±6,61'inin, ovariektomi grubundaki deneklerde ise %66,74±4,68'inin ER-α ekspresyonuna sahip olduğu, Arkuat çekirdekte proöstrus grubundaki deneklerde RSPO-1 nöronlarında ortalama %48,52±3,96'sının, ovariektomi grubundaki deneklerde ise %61,94±5,48'inin ER-α ekspresyonuna sahip olduğu bulundu (Tablo 12).

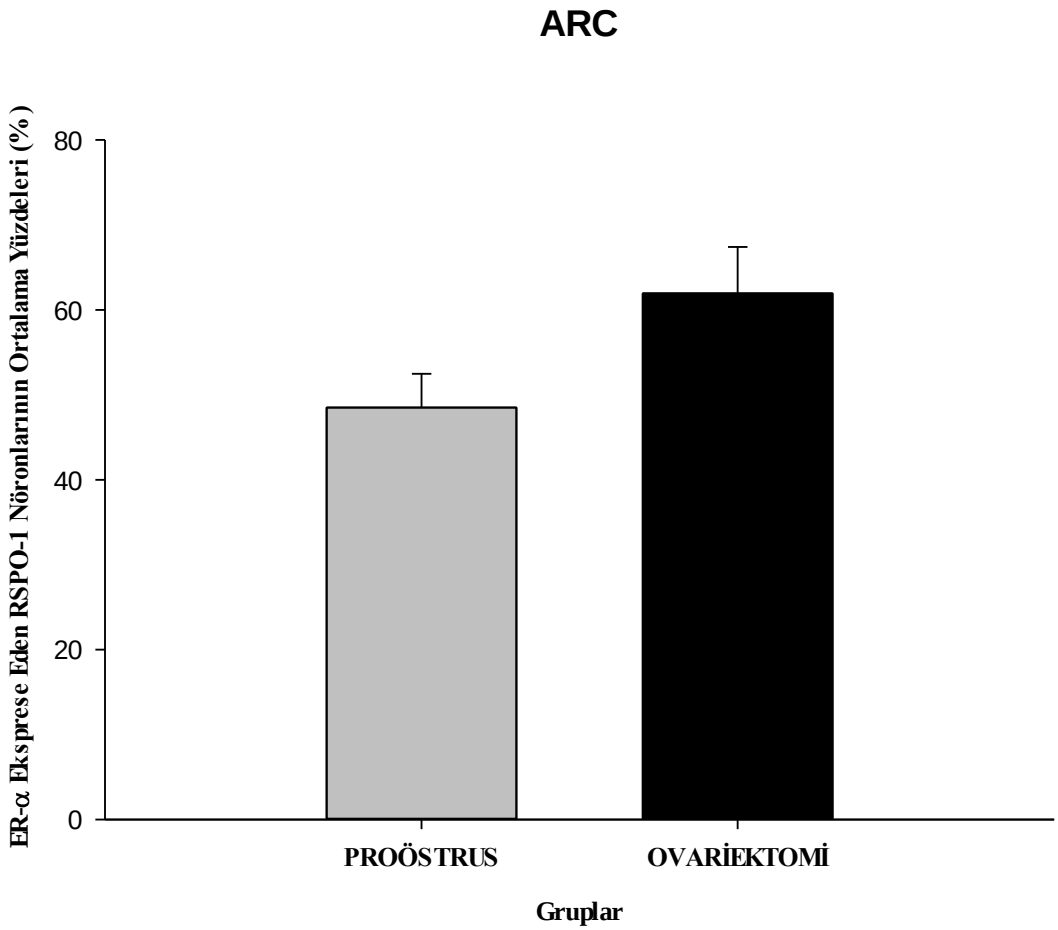
Ventromedial hipotalamik çekirdek (p=0,31) ve arkuat çekirdekte (p=0,49) ER-α eksprese eden RSPO-1 nöronları açısından proöstrus grubu ve ovariektomi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur (Şekil 38 ve Şekil 40).

Tablo 12. ER-α eksprese eden RSPO-1 nöronlarının ortalama sayıları ve yüzdeleri ± SE.

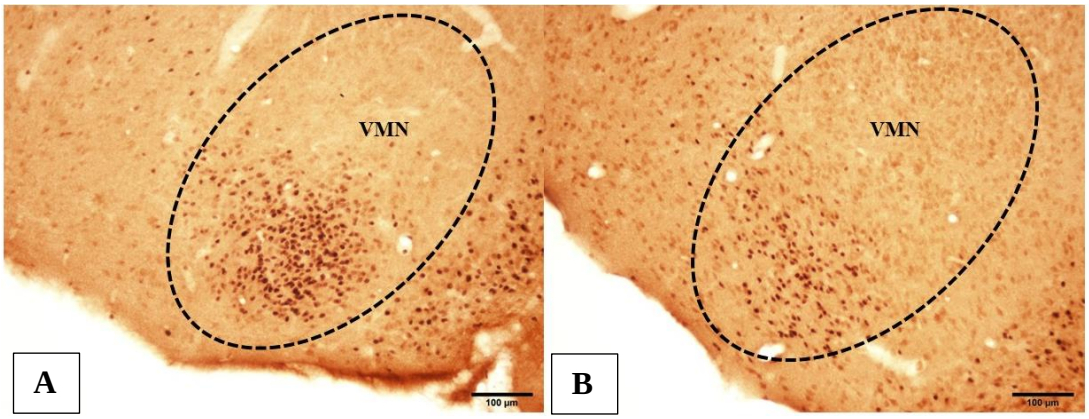
Deney Grupları	Alan	RSPO-1 Nöronlarının Ortalama Sayıları	ER-α Eksprese Eden RSPO-1 Nöronlarının Ortalama Sayıları	ER-α Eksprese Eden RSPO-1 Nöronlarının Ortalama Yüzdeleri
İntakt proöstrus grubu	ARC	2107,20±246,28	1047,80±175,07	48,52±3,96
	VMN	1812,20±113,07	1305,60±128,54	72,55±6,61
Ovariektomi grubu	ARC	1793,80±40,38	1113,40±105,51	61,94±5,48
	VMN	1629,60±187,85	1114,00±187,97	66,74±4,68



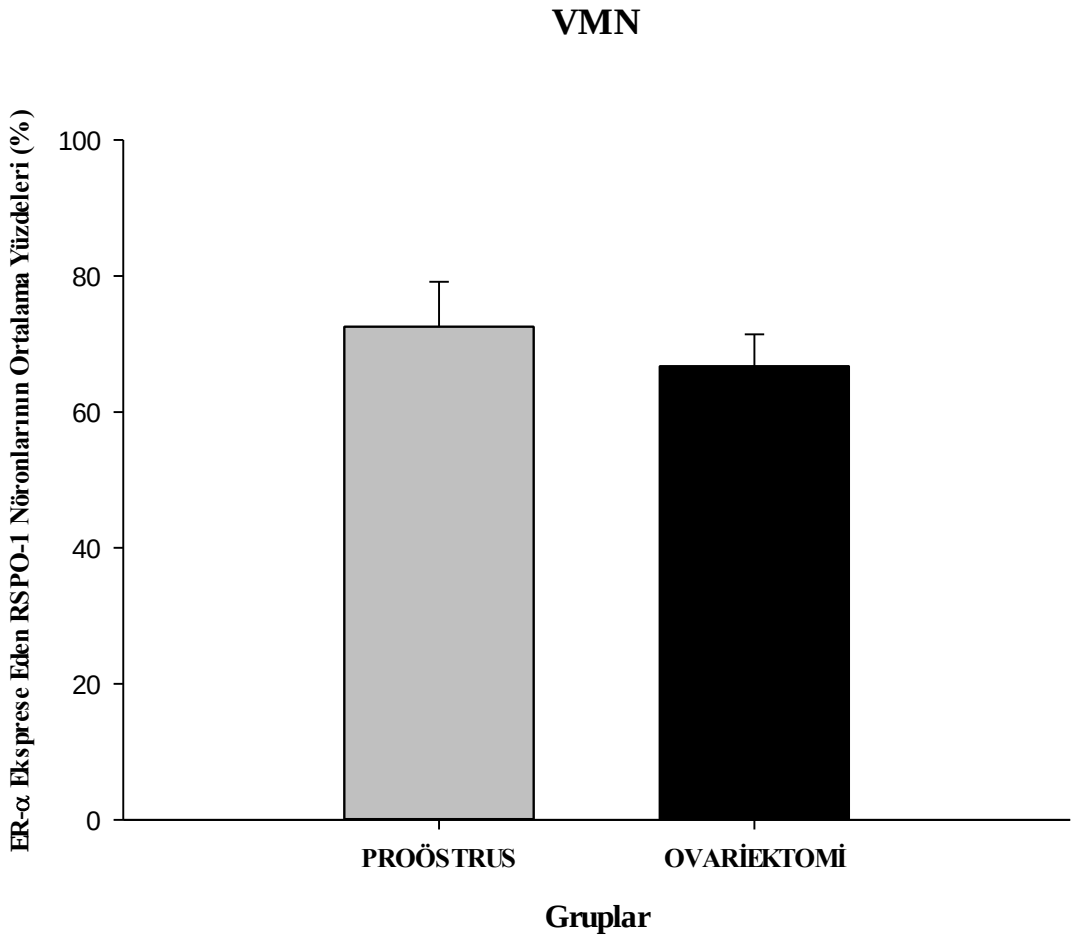
Şekil 37. Arkuat çekirdekte (ARC) RSPO-1 nöronlarında ER-α'nın ekspresyonu. (**A**) Proöstrus Grubu. (**B**) Ovariektomi Grubu



Şekil 38. Arkuat çekirdekte (ARC) RSPO-1 nöronlarında ER-α ekspresyonu.



Şekil 39. Ventromedial hipotalamik çekirdekte (VMN) RSPO-1 nöronlarında ER-α'nın ekspresyonu. (**A**) Proöstrus Grubu. (**B**) Ovariektomi Grubu



Şekil 40. Ventromedial hipotalamik çekirdekte (VMN) RSPO-1 nöronlarında ER-α ekspresyonu.

4.2.2.2. RSPO-1 nöronlarında ER- β ekspresyonu

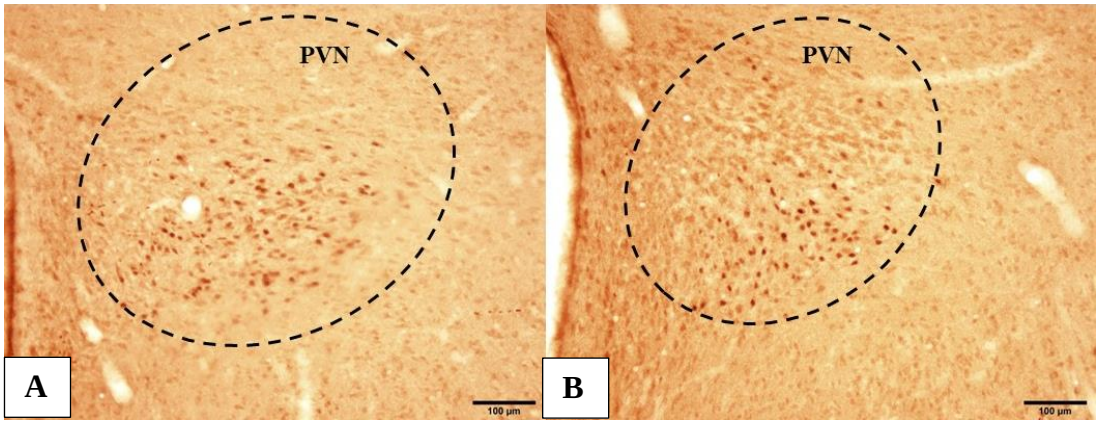
Hipotalamusun paraventriküler çekirdek (Şekil 40) ve supraoptik çekirdeğinde (Şekil 42) bulunan RSPO-1 nöronlarında ER-β ekspresyonu değerlendirildi.

Paraventriküler çekirdekte proöstrus grubundaki deneklerde RSPO-1 nöronlarında ortalama %41,66±7,76'sının, ovariektomi grubundaki deneklerde ise %32,55±4,12'sinin ER-β ekspresyonuna sahip olduğu, supraoptik çekirdekte proöstrus grubundaki deneklerde RSPO-1 nöronlarında ortalama %39,58±7,94'ünün, ovariektomi grubundaki deneklerde ise %23,30±9,97'sinin ER-β ekspresyonuna sahip olduğu bulundu (Tablo 13).

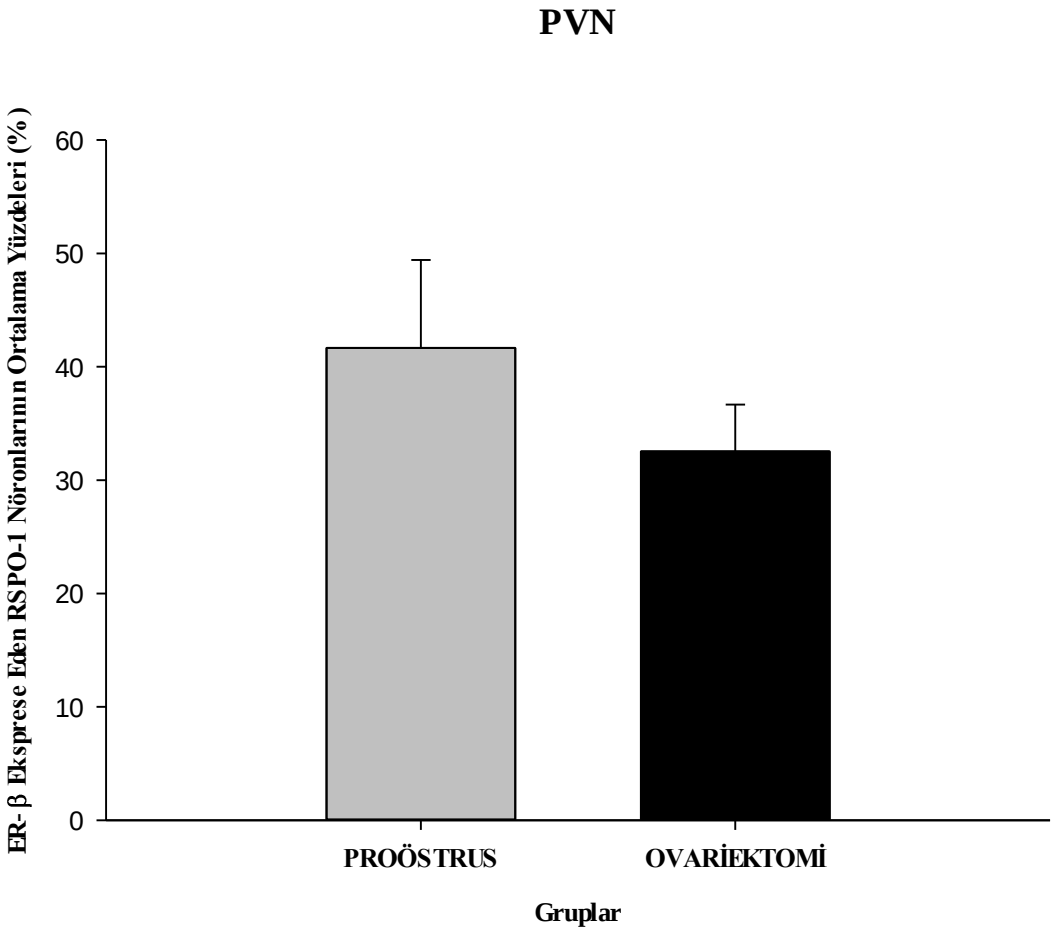
Paraventriküler çekirdekte (p=0,33) ve supraoptik çekirdekte (p=0,24) ER-β eksprese eden RSPO-1 nöronları açısından proöstrus grubu ve ovariektomi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur (Şekil 41 ve Şekil 43).

Tablo 13. ER- β eksprese eden RSPO-1 nöronlarının ortalama sayıları ve yüzdeleri ± SE.

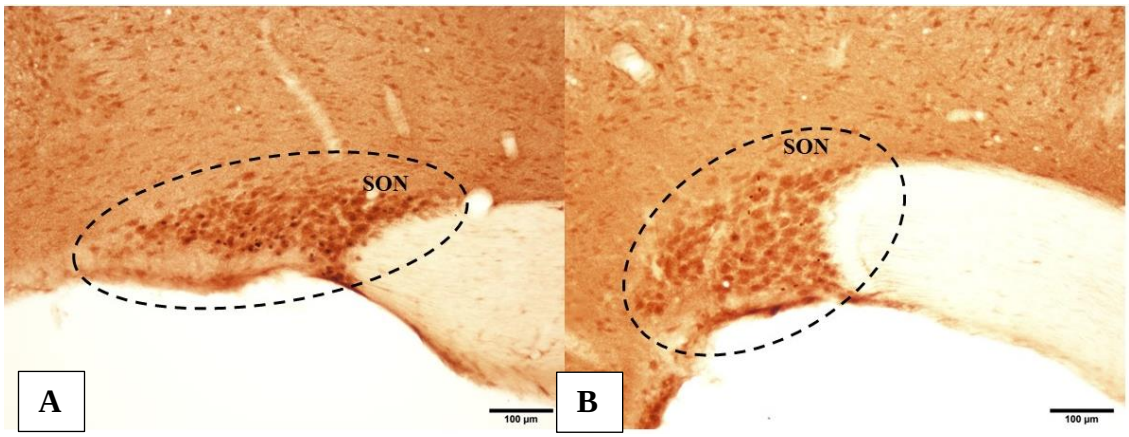
Deney Grupları	Alan	RSPO-1 Nöronlarının Ortalama Sayıları	ER- β Eksprese Eden RSPO-1 Nöronlarının Ortalama Sayıları	ER- β Eksprese Eden RSPO-1 Nöronlarının Ortalama Yüzdeleri
İntakt proöstrus grubu	PVN	878,00±68,47	377,40±83,21	41,66±7,76
	SON	757,60±44,09	296,60±56,05	39,58±7,94
Ovariektomi grubu	PVN	948,80±87,59	321,60±67,25	32,55±4,12
	SON	672,80±49,57	162,60±76,88	23,30±9,97



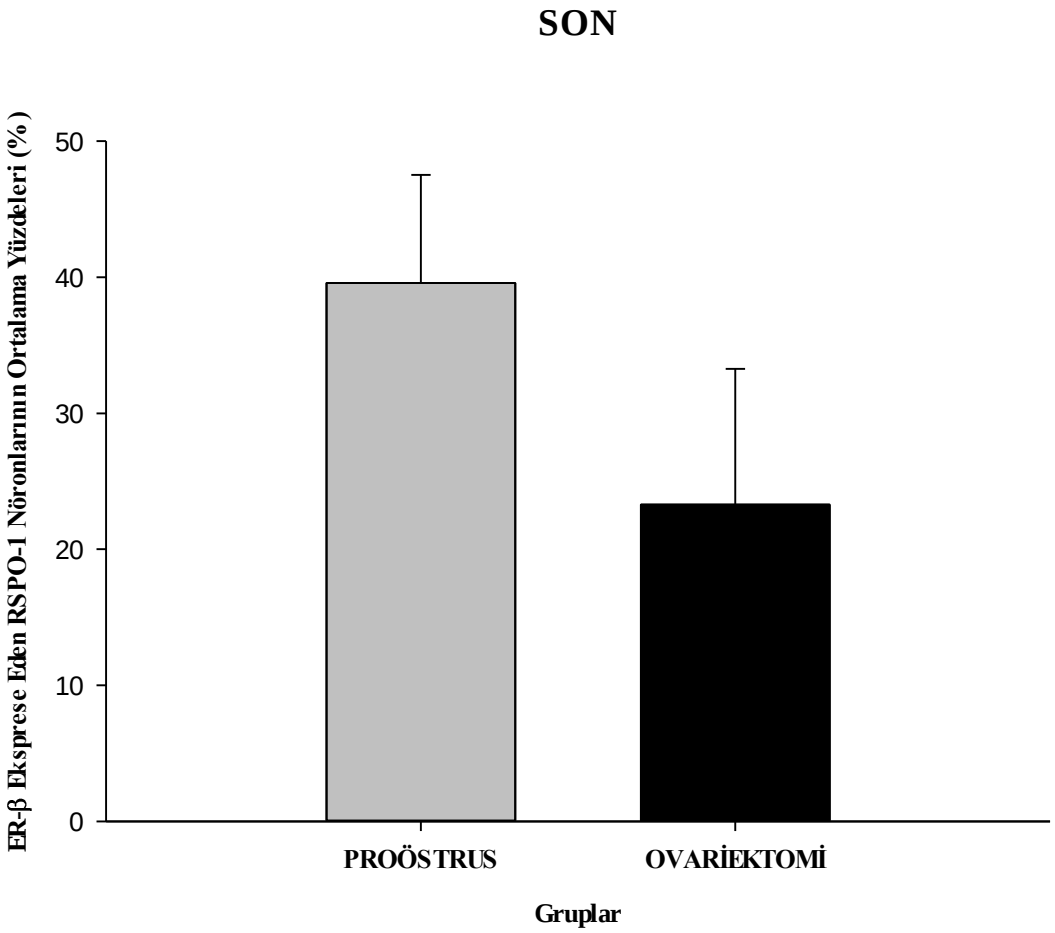
Şekil 41. Paraventriküler çekirdekte (PVN) RSPO-1 nöronlarında ER- β'nın ekspresyonu. (**A**) Proöstrus Grubu. (**B**) Ovariektomi Grubu



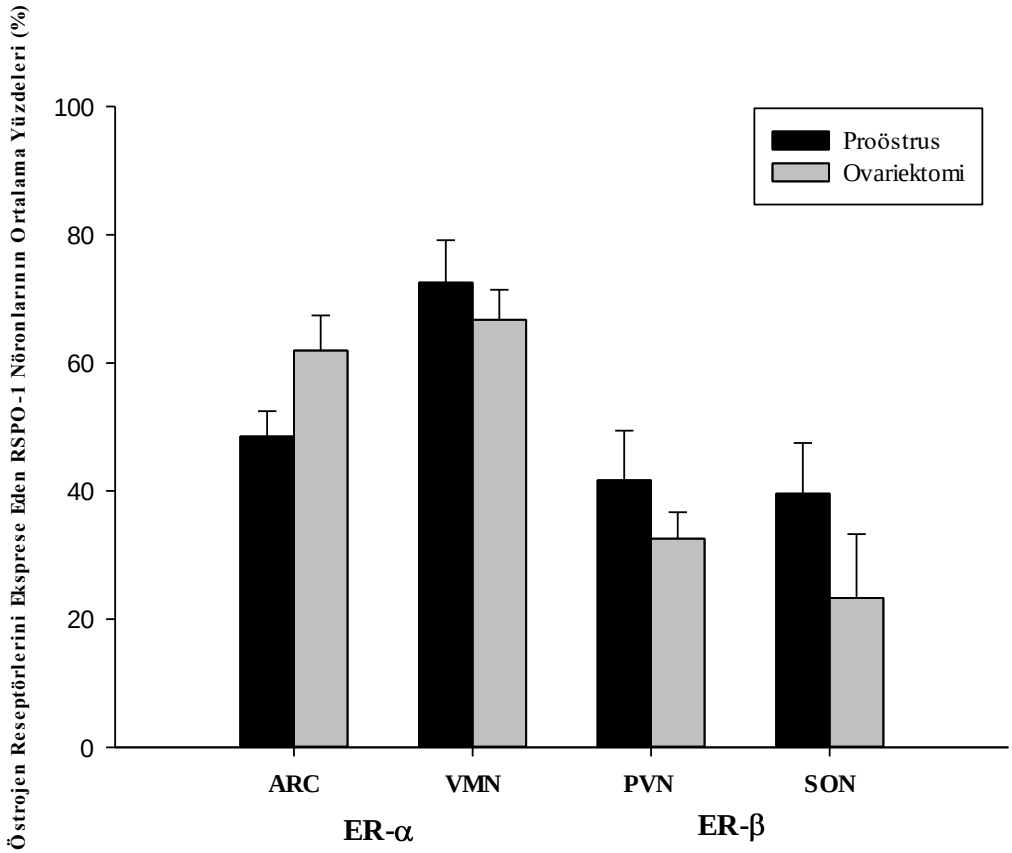
Şekil 42. Paraventriküler çekirdekte (PVN) RSPO-1 nöronlarında ER-β ekspresyonu.



Şekil 43. Supraoptik çekirdekte (SON) RSPO-1 nöronlarında ER- β'nın ekspresyonu. (**A**) Proöstrus Grubu. (**B**) Ovariektomi Grubu



Şekil 44. Supraoptik çekirdekte (SON) RSPO-1 nöronlarında ER-β ekspresyonu.



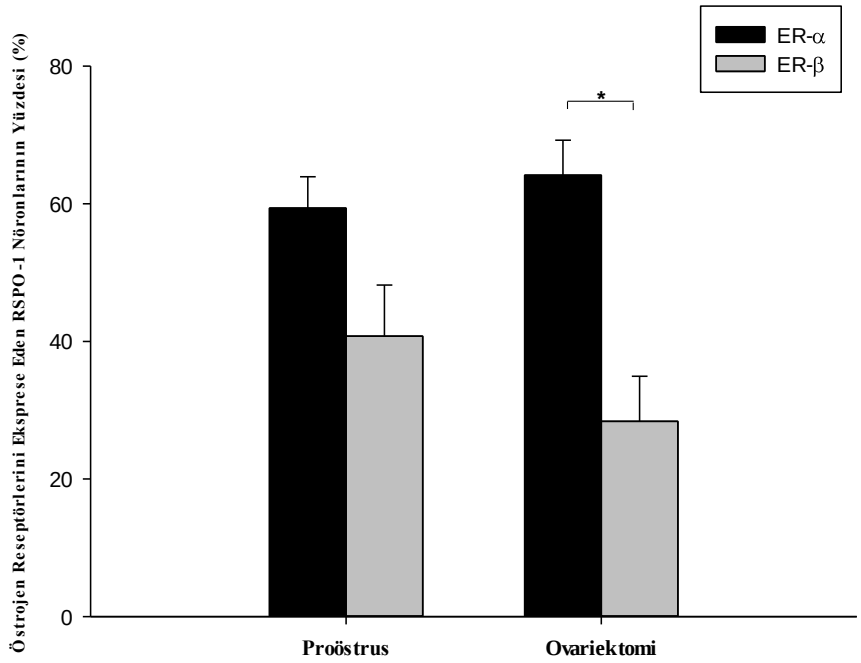
Şekil 45. Ovariektomi ve proöstrus gruplarında ARC, VMN, PVN ve SON'deki östrojen reseptörü eksprese eden PNX nöronlarının yüzdelerinin karşılaştırılması (*p<0,05)

4.2.2.3. Hipotalamustaki RSPO-1 nöronlarında östrojen reseptörlerinin ekspresyonunun gruplar arası karşılaştırılması

Proöstrus grubundaki deneklerin hipotalamusunda ER- α eksprese eden RSPO-1 nöronlarının ortalama yüzdeleri %59,37±4,56; ER-β eksprese eden RSPO-1 nöronlarının ortalama yüzdeleri %40,77±7,41'tür (Tablo 14).

Ovariektomi grubundaki deneklerde ise ER- α eksprese eden RSPO-1 nöronlarının ortalama yüzdeleri %64,17±5,08; ER-β eksprese eden RSPO-1 nöronlarının ortalama yüzdesi %28,37±6,54'tır (Tablo 14).

Proöstrus grubunda ER-α eksprese eden RSPO-1 nöronları ve ER-β eksprese eden RSPO-1 nöronlarının yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur (p=0,056). Ancak ovariektomi grubunda bu nöronların yüzdeleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (p=0,003) (Şekil 46).



Şekil 46. Hipotalamustaki RSPO-1 Nöronlarında Östrojen Reseptörlerinin Ekspresyonunun Gruplar Arası Karşılaştırılması (*p<0,05)

Tablo 14. Hipotalamusta ER-α ve ER- β eksprese eden RSPO-1 nöronlarının yüzdeleri ± SE.

Deney Grupları	Hipotalamusta ER- α Eksprese Eden RSPO-1 Nöronlarının Ortalama Yüzdeleri	Hipotalamusta ER- β Eksprese Eden RSPO-1 Nöronlarının Ortalama Yüzdeleri
Proöstrus	59,37±4,56	40,77±7,41
Ovariektomi	64,17±5,08	28,37±6,54

4.2.3. RSPO-3 nöronlarında östrojen reseptörlerinin varlığı

SON'de ER-β içeren RSPO-3 nöronları açısından ovariektomi grubu ve proöstrus grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır. Ancak PVN'de ER-β içeren RSPO-3 nöronları açısından bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur. ARC ve VMN'de ise ER- α içeren RSPO-3 nöronları açısından ovariektomi grubu ve proöstrus grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur (Şekil 55).

4.2.3.1. RSPO-3 nöronlarında ER-α ekspresyonu

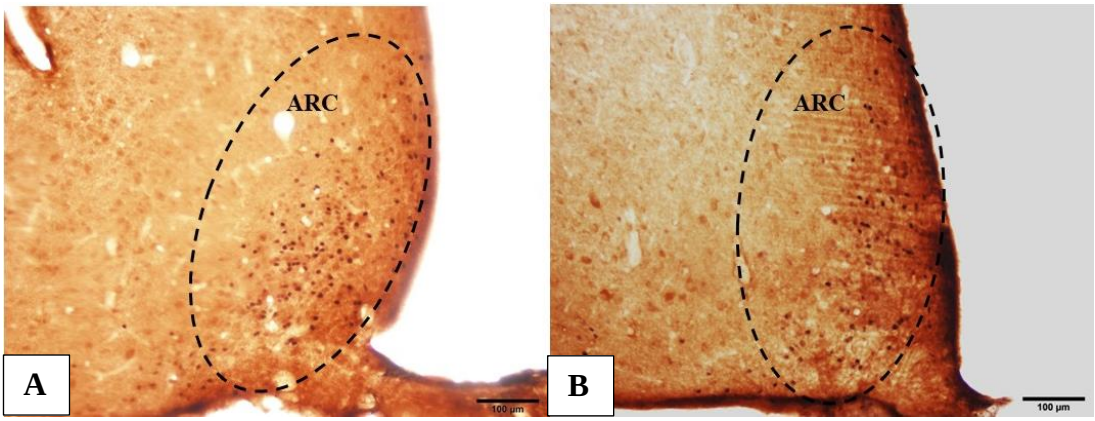
Hipotalamusun ventromedial hipotalamik çekirdek (Şekil 47) ve arkuat çekirdeğinde (Şekil 45) bulunan RSPO-3 nöronlarında ER-α ekspresyonu değerlendirildi.

Ventromedial hipotalamik çekirdekte proöstrus grubundaki deneklerde RSPO-3 nöronlarında ortalama 56,25±2,75'inin, ovariektomi grubundaki deneklerde ise %65,55±4,71'inin ER-α ekspresyonuna sahip olduğu, Arkuat çekirdekte proöstrus grubundaki deneklerde RSPO-3 nöronlarında ortalama %61,77±3,18'inin, ovariektomi grubundaki deneklerde ise %65,55±4,71'inin ER-α ekspresyonuna sahip olduğu bulundu (Tablo 15).

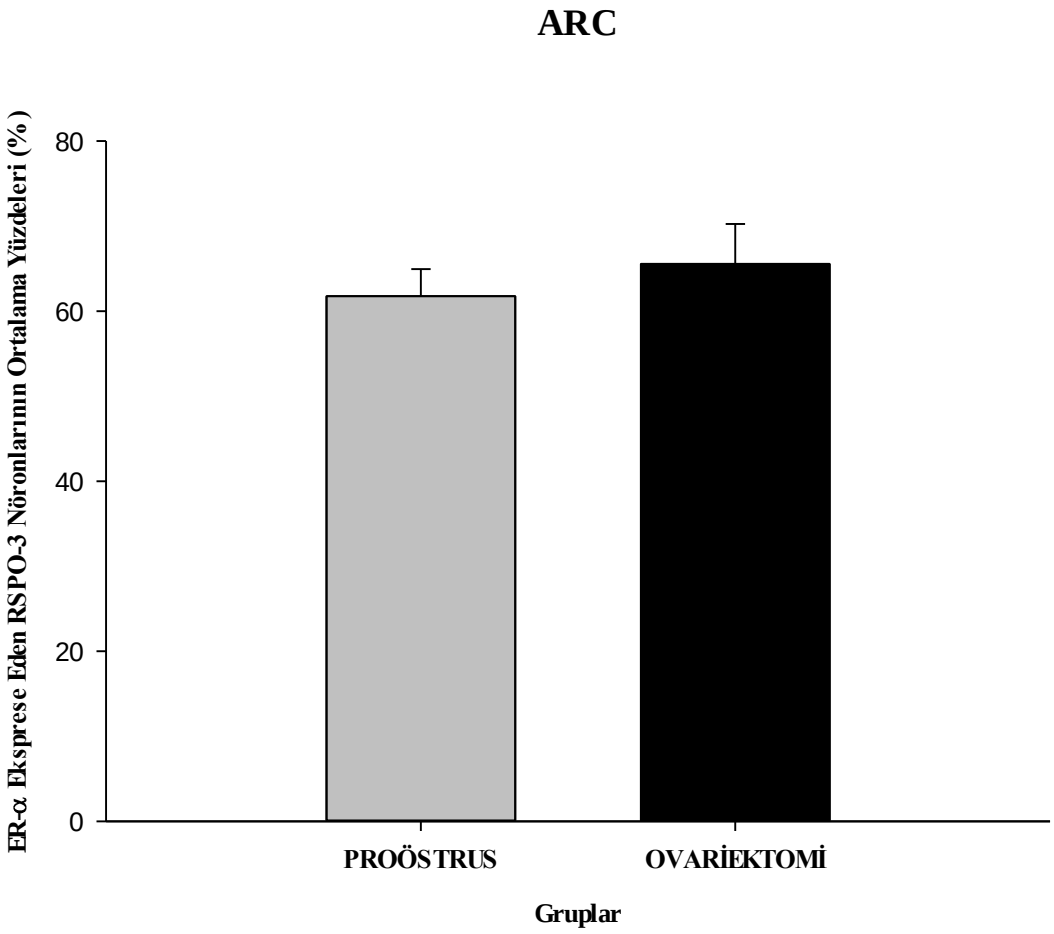
Ventromedial hipotalamik çekirdek (p=0,70) ve arkuat çekirdekte (p=0,54) ER-α eksprese eden RSPO-3 nöronları açısından proöstrus grubu ve ovariektomi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur (Şekil 46 ve Şekil 48).

Tablo 15. ER-α eksprese eden RSPO-3 nöronlarının ortalama sayıları ve yüzdeleri ± SE.

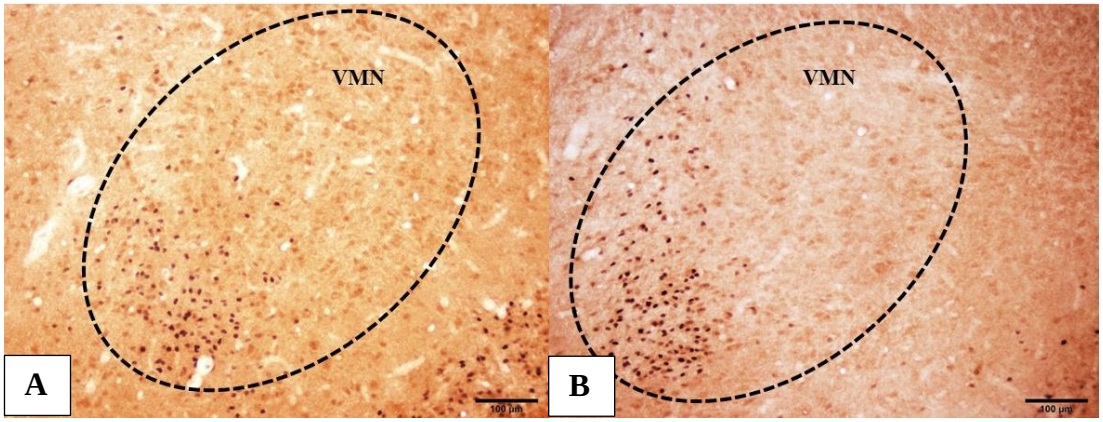
Deney Grupları	Alan	RSPO-3 Nöronlarının Ortalama Sayıları	ER-α Eksprese Eden RSPO-3 Nöronlarının Ortalama Sayıları	ER-α Eksprese Eden RSPO-3 Nöronlarının Ortalama Yüzdeleri
İntakt proöstrus grubu	ARC	2023,00±212,21	1249,33±142,93	61,77±3,18
	VMN	2467,67±253,50	1375,33±92,64	56,25±2,75
Ovariektomi grubu	ARC	1575,67±92,59	1041,33±136,02	65,55±4,71
	VMN	1813,67±192,48	1095,00±98,33	61,08±5,07



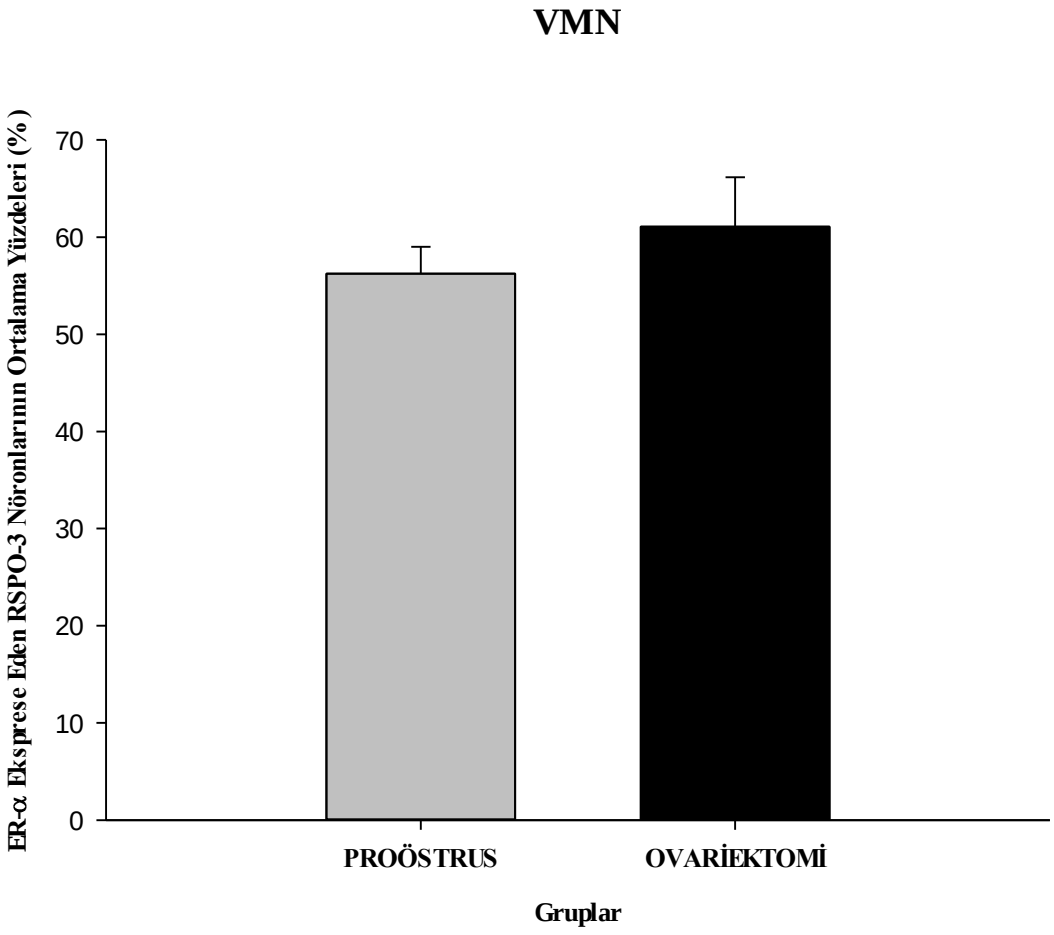
Şekil 47. Arkuat çekirdekte (ARC) RSPO-3 nöronlarında ER-α'nın ekspresyonu. (**A**) Proöstrus Grubu. (**B**) Ovariektomi Grubu



Şekil 48. Arkuat çekirdekte (ARC) RSPO-3 nöronlarında ER-α ekspresyonu.



Şekil 49. Ventromedial hipotalamik çekirdekte (VMN) RSPO-3 nöronlarında ER-α'nın ekspresyonu. (**A**) Proöstrus Grubu. (**B**) Ovariektomi Grubu



Şekil 50. Ventromedial hipotalamik çekirdekte (VMN) RSPO-3 nöronlarında ER-α ekspresyonu.

4.2.3.2. RSPO-3 nöronlarında ER- β ekspresyonu

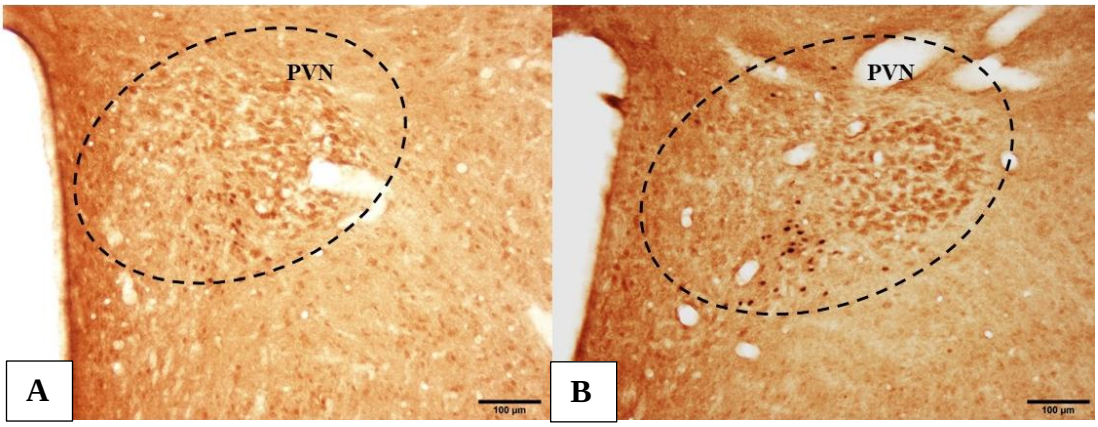
Hipotalamusun paraventriküler çekirdek (Şekil 51) ve supraoptik çekirdeğinde (Şekil 53) bulunan RSPO-3 nöronlarında ER-β ekspresyonu değerlendirildi.

Paraventriküler çekirdekte proöstrus grubundaki deneklerde RSPO-3 nöronlarında ortalama %26,43±4,57'sinin, ovariektomi grubundaki deneklerde ise %21,62±10,36'sının ER-β ekspresyonuna sahip olduğu, supraoptik çekirdekte proöstrus grubundaki deneklerde RSPO-3 nöronlarında ortalama %25,99±4,58'inin, ovariektomi grubundaki deneklerde ise %4,07±1,92'sinin ER-β ekspresyonuna sahip olduğu bulundu (Tablo 16).

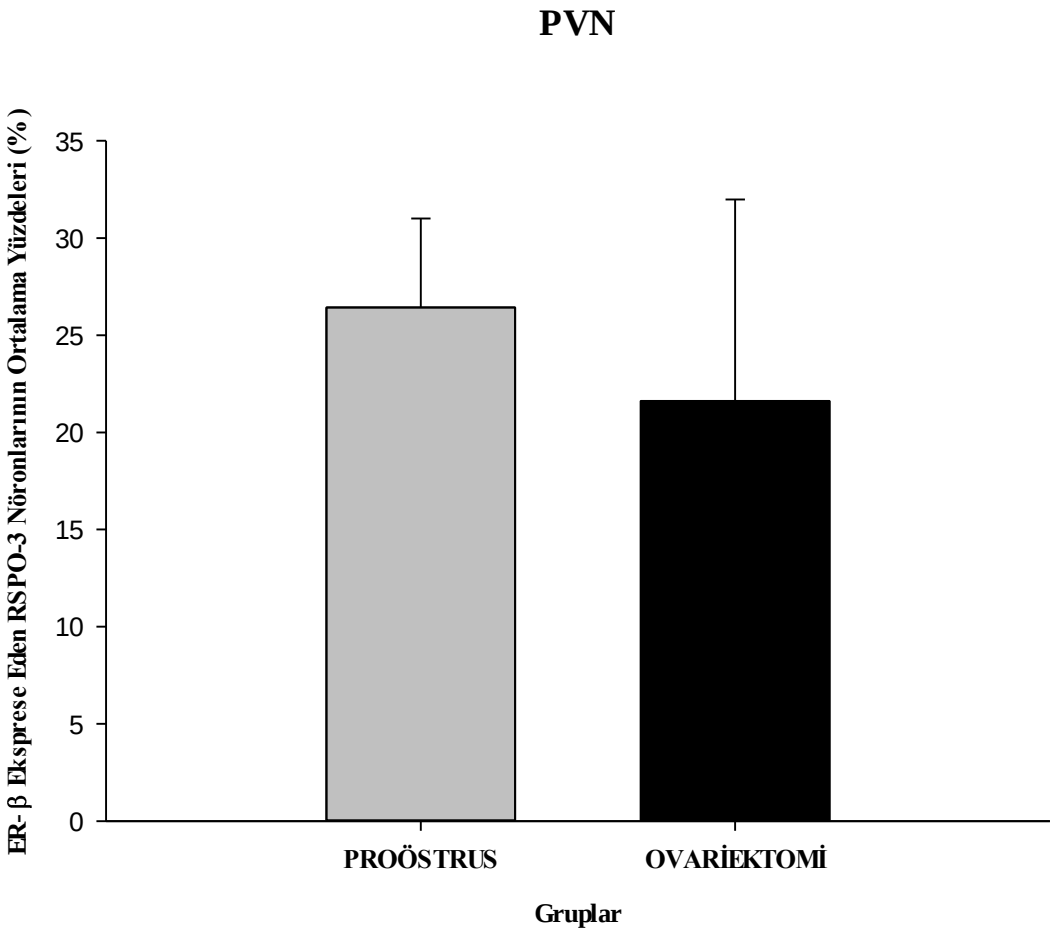
Paraventriküler çekirdekte (p=0,70) ER-β eksprese eden RSPO-3 nöronları açısından proöstrus grubu ve ovariektomi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ancak supraoptik çekirdekte (p=0,01) istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır (Şekil 52 ve Şekil 54).

Tablo 16. ER- β eksprese eden RSPO-3 nöronlarının ortalama sayıları ve yüzdeleri ± SE.

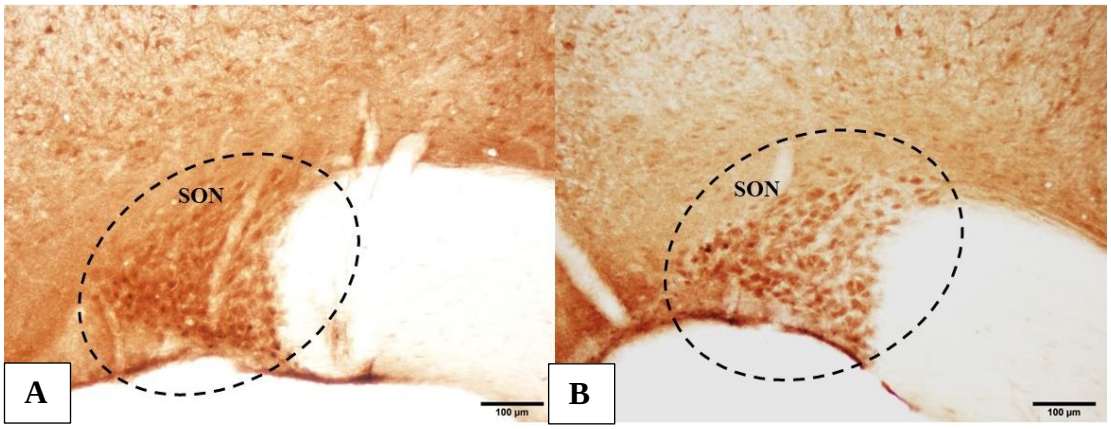
Deney Grupları	Alan	RSPO-3 Nöronlarının Ortalama Sayıları	ER- β Eksprese Eden RSPO-3 Nöronlarının Ortalama Sayıları	ER- β Eksprese Eden RSPO-3 Nöronlarının Ortalama Yüzdeleri
İntakt proöstrus grubu	PVN	552,00±37,63	149,33±36,83	26,43±4,57
	SON	598,33±27,17	156,67±31,86	25,99±4,58
Ovariektomi grubu	PVN	543,33±87,51	120,00±70,49	21,62±10,36
	SON	743,00±3,06	30,33±14,44	4,07±1,92



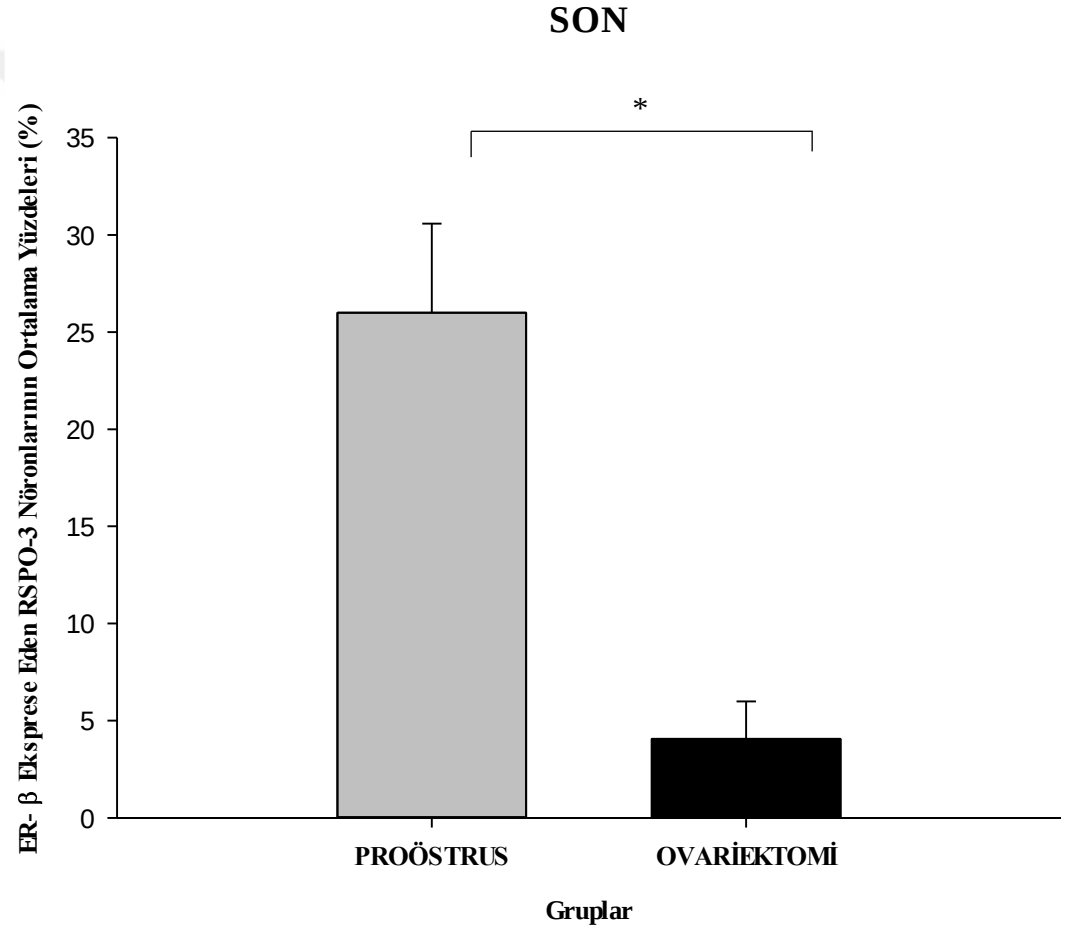
Şekil 51. Paraventriküler çekirdekte (PVN) RSPO-3 nöronlarında ER- β'nın ekspresyonu. (**A**) Proöstrus Grubu. (**B**) Ovariektomi Grubu



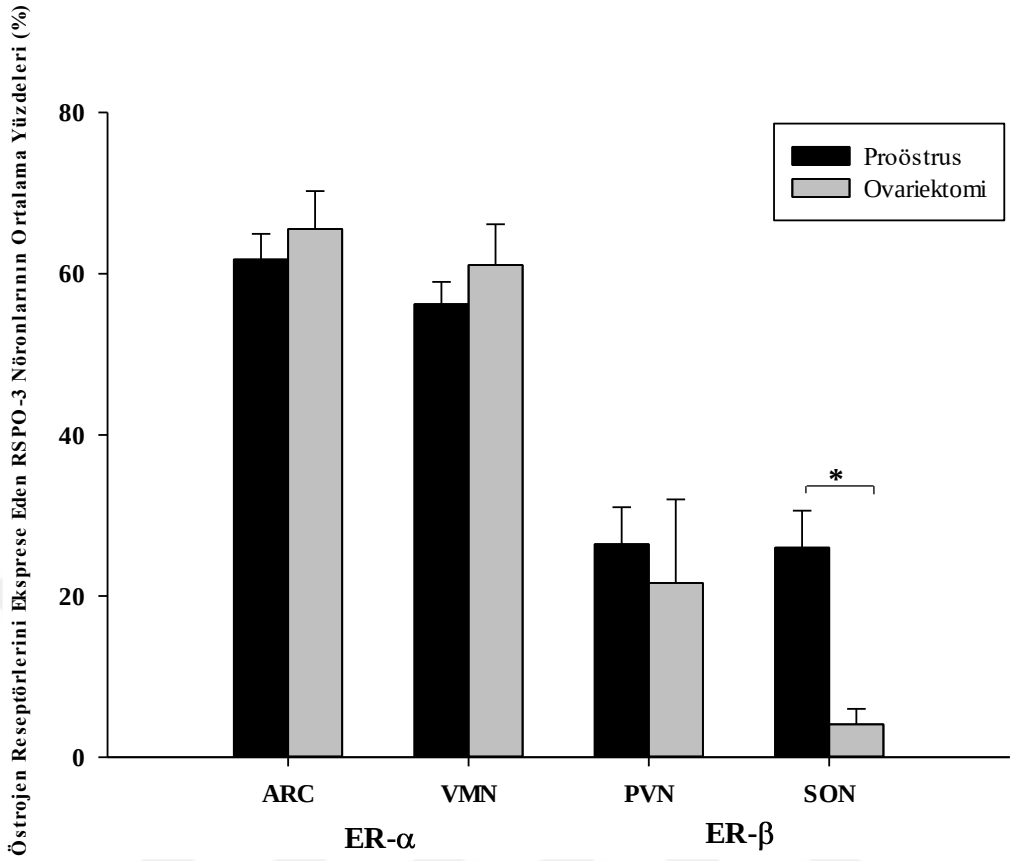
Şekil 52. Paraventriküler çekirdekte (PVN) RSPO-3 nöronlarında ER-β ekspresyonu.



Şekil 53. Supraoptik çekirdekte (SON) RSPO-3 nöronlarında ER- β'nın ekspresyonu. (**A**) Proöstrus Grubu. (**B**) Ovariektomi Grubu



Şekil 54. Supraoptik çekirdekte (SON) RSPO-3 nöronlarında ER-β ekspresyonu (*p<0,05).



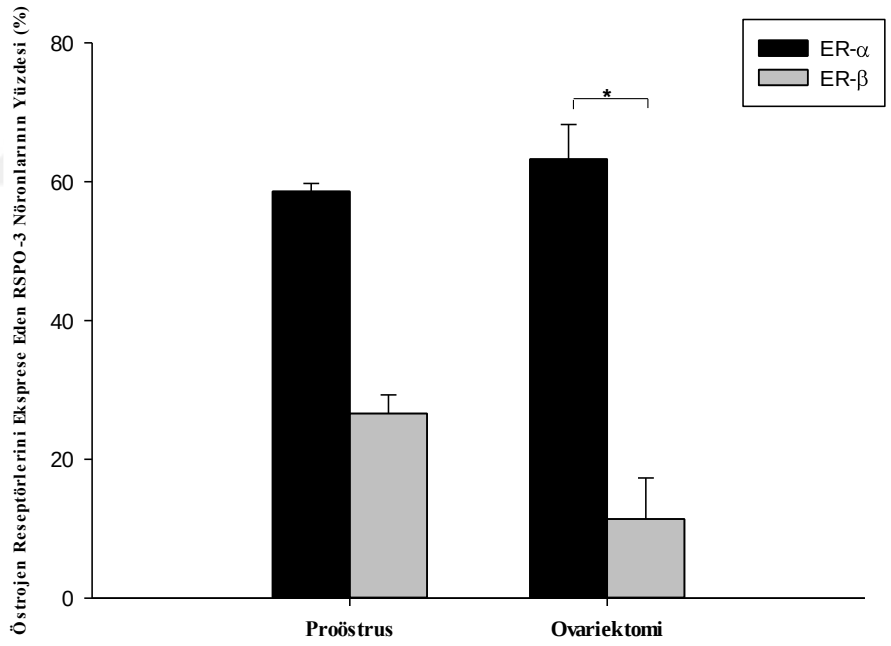
Şekil 55. Ovariektomi ve proöstrus gruplarında ARC, VMN, PVN ve SON'deki östrojen reseptörü eksprese eden RSPO-3 nöronlarının yüzdelerinin karşılaştırılması (*p<0,05)

4.2.3.3. Hipotalamustaki RSPO-3 nöronlarında östrojen reseptörlerinin ekspresyonunun gruplar arası karşılaştırılması

Proöstrus grubundaki deneklerin hipotalamusunda ER- α eksprese eden RSPO-3 nöronlarının ortalama yüzdeleri %58,66±1,14; ER-β eksprese eden RSPO-3 nöronlarının ortalama yüzdeleri %26,59±2,68'tür (Tablo17).

Ovariektomi grubundaki deneklerde ise ER- α eksprese eden RSPO-3 nöronlarının ortalama yüzdeleri %63,27±4,99; ER-β eksprese eden RSPO-3 nöronlarının ortalama yüzdesi %11,40±5,91'tır (Tablo17).

Proöstrus grubunda ER-α eksprese eden RSPO-3 nöronları ve ER-β eksprese eden RSPO-3 nöronlarının yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur (p=0,100). Ancak ovariektomi grubunda bu nöronların yüzdeleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (p=0,003) (Şekil 56).



Şekil 56. Hipotalamustaki RSPO-3 Nöronlarında Östrojen Reseptörlerinin Ekspresyonunun Gruplar Arası Karşılaştırılması (*p<0,05)

Tablo 17. Hipotalamusta ER-α ve ER- β eksprese eden RSPO-3 nöronlarının yüzdeleri ± SE.

Deney Grupları	Hipotalamusta ER- α Eksprese Eden RSPO-3 Nöronlarının Ortalama Yüzdeleri	Hipotalamusta ER- β Eksprese Eden RSPO-3 Nöronlarının Ortalama Yüzdeleri
Proöstrus	58,66±1,14	26,59±2,68
Ovariektomi	63,27±4,99	11,40±5,91

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu yüksek lisans tez çalışmasında "Phoeniksin, RSPO-1, RSPO-3 nöronlarında östrojen reseptörlerinin varlığı'' literatürde ilk kez gösterilmiştir.

Östrojenler, üreme çağındaki kadınlarda gluteofemoral subkutanöz adipoz dokuyu arttırır ve merkezi adipoz doku kütlesini azaltarak kardiyovasküler hastalıklara karşı koruma sağlar ancak menopozdan sonra östrojen seviyesinin düşmesi toplam adipoz dokuyu arttırır ve yağsız vücut kütlesini azaltır (Leeners, Geary, Tobler, & Asarian, 2017). Bu da östrojen seviyesi ile adipoz doku arasında bir ilişkinin olduğunu gösterir.

OVX sıçanların, sham grubuna göre daha fazla yediği ve daha hızlı kilo aldığı bildirilmiştir. Ancak östrodiol (E2) tedavisi OVX sıçanlarda besin alımını ve vücut ağırlığı artışını azaltmıştır. Yapılan çalışmalar östrojen reseptörlerinden ER-α'nın östrojenlerin besin alımı ve vücut ağırlığı artışı üzerindeki zayıflatıcı etkilerine aracılık ettiğini ER-β'nın ise besin alımı ve vücut ağırlığı artışı üzerinde bir etkisinin olmadığını göstermiştir (Roesch, 2006). Bu bilginin ışığında östrojen reseptörleri ile besin alımı arasında bir bağlantı olabileceği düşülmüştür.

Bu tez çalışmasında PNX, RSPO-1, RSPO-3 nöronlarının besin alımını baskılamasında östrojen reseptörlerinin etkisi araştırılmıştır ve elde edilen veriler tartışılmıştır.

Hipotalamusta, ER-α arkuat çekirdek ve ventromedial çekirdekte eksprese edilirken ER-β anterior periventriküler çekirdek, paraventriküler çekirdek, supraoptik çekirdek, medial tuberal çekirdek ve medial mamiller çekirdekte eksprese edilir. ER-α ve ER-β birlikte medial preoptik alan, bed nükleus ve stria terminaliste eksprese edilirler (Shughrue ve ark., 1996). Bu tez çalışmasındaki sonuçlar da literatür bilgisiyle örtüşmektedir.

Östrojen reseptörleri çoğunlukla santral sinir sisteminde bulunur. Hipotalamus, östrojenlerin enerji dengesi üzerinde en fazla etkiye sahip olduğu bölgedir. Ventromedial çekirdek (VMN) ve arkuat çekirdek (ARC) besin alımının kontrolü ve enerji harcanmasında görevli hipotalamustaki çekirdeklerdir. Besin alımında görevli hormon ve sinyallere cevap verirler. Hipotalamusta VL VMN ve ARC'yi içeren lezyon oluşturulması sonucunda besin alımının arttığı ve enerji harcanmasının azaldığı gösterilmiştir. VL VMN ve ARC'de östrojen reseptör varlığı yapılan çalışmalarca

bildirilmiştir (Brown, Gent, Davis, & Clegg, 2010). Bu da östrojen reseptörleri ve ARC ve VL VMN'deki anoreksijenik nöronlar arasında bir bağlantının olabileceğini düşündürmüştür.

ARC'de AgRP (agouti-ilişkili peptit) ve NPY (nöropeptit Y) gibi besin alımını arttıran peptitleri içeren oreksijenik nöronlar ve POMC (proopiomelanokortin) gibi besin alımını azaltan peptitleri içeren anoreksijenik nöronlar bulunur (Mahboobifard ve ark., 2022).

PVN besin alımında önemli bir hipotalamik çekirdektir (Wellman, 2000). Östrojen reseptörü beta (ER- β), fare hipotalamik paraventriküler çekirdeğinde (PVN) baskın bir östrojen reseptörüdür ve PVN'nin nöroendokrin aktiviteleri östrojenin regülasyonunu sağlar ancak ER- β 'nın PVN'deki görevi belirsizliğini korumaktadır (Zhang, Su, & Cai, 2004). Östrojen reseptörü beta'nın dişi sıçanın paraventriküler ve supraoptik çekirdeklerinin prolaktin nöronlarında eksprese edildiği daha önce yapılan çalışmalarla bildirilmiştir (Lucio-Oliveira, & Franci, 2012).

Yapılan başka bir çalışmada ise GnRH nöronlarında ER-β varlığı ortaya konmuştur. Bu nöronlarda ER-β'nın olmaması durumunda ise dişi farelerin üreme fonksiyonunda bozukluklar meydana geldiği bildirilmiştir (Novaira ve ark., 2018).

GnRH nöronlarını regüle eden kisspeptin nöronlarının ise ER-α eksprese ettiği yapılan çalışmalarca bildirilmiştir (Uenoyama, Inoue, Nakamura, & Tsukamura, 2021).

Ana bilim dalımızda yapılan bir tez çalışmasında ise nesfatin-1 nöronlarının dişi ve erkek sıçanlarda ER-α ve ER-β'yı eksprese ettiği gösterilmiştir (Oy, 2018).

Bu çalışma ise besin alımının kontrolünde görevli olan ARC (ER-α için), VMN (ER-α için), SON (ER-β için) ve PVN'deki (ER-β için) anoreksijenik etkisinin olduğu bilinen Phoeniksin, RSPO-1, RSPO-3 nöronları incelenmiştir.

Phoeniksin nöronlarının VMN'de proöstrus grubunda yaklaşık yüzde otuz beşinin ovariektomi grubunda yaklaşık yüzde on beşinin, ARC'de proöstrus grubunda yaklaşık yüzde kırk birinin ovariektomi grubunda yaklaşık yüzde kırk beşinin ER-α ifade ettiği, PVN'de proöstrus grubunda yaklaşık yüzde on beşinin ovariektomi grubunda yaklaşık yüzde yirmi beşinin SON'de ise proöstrus grubunda yaklaşık yüzde on dokuzunun ovariektomi grubunda yaklaşık yüzde on altısının ER-β ifade ettiği bulunmuştur.

RSPO-1 nöronlarının VMN'de proöstrus grubunda yaklaşık yüzde yetmiş ikisinin ovariektomi grubunda yaklaşık yüzde altmış altı, ARC'de proöstrus grubunda yaklaşık yüzde kırk sekizinin ovariektomi grubunda yaklaşık yüzde altmış birinin ER-α ifade ettiği, PVN'de proöstrus grubunda yaklaşık yüzde kırk birinin ovariektomi grubunda yaklaşık yüzde otuz ikisinin SON'de ise proöstrus grubunda yaklaşık yüzde otuz dokuzunun ovariektomi grubunda yaklaşık yüzde yirmi üçünün ER-β ifade ettiği bulunmuştur.

RSPO-3 nöronlarının VMN'de proöstrus grubunda yaklaşık yüzde elli altısının ovariektomi grubunda yaklaşık yüzde altmış birinin, ARC'de proöstrus grubunda yaklaşık yüzde altmış birinin ovariektomi grubunda yaklaşık yüzde altmış altısının ER-α ifade ettiği, PVN'de proöstrus grubunda yaklaşık yüzde yirmi altısının ovariektomi grubunda yaklaşık yüzde yirmi birinin SON'de ise proöstrus grubunda yaklaşık yüzde yirmi beşinin ovariektomi grubunda yaklaşık yüzde dördünün ER-β ifade ettiği bulunmuştur.

Proöstrus grubundaki deneklerin hipotalamusundaki PNX nöronları yaklaşık yüzde otuz iki ER- α eksprese eder, RSPO-1 nöronlarının yaklaşık yüzde elli altısı ER- α eksprese eder RSPO-3 nöronlarının ortalama yüzde elli sekizi ER- α eksprese eder. PNX nöronlarının yaklaşık yüzde on yedisi ER- β eksprese eder, RSPO-1 nöronlarının yaklaşık yüzde kırkı ER- β eksprese eder RSPO-3 nöronlarının ortalama yüzde yirmi sekizi ER- β eksprese eder.

Ovariektomi grubundaki deneklerin hipotalamusundaki PNX nöronları yaklaşık yüzde otuz ER- α eksprese eder, RSPO-1 nöronlarının yaklaşık yüzde atmış yedisi ER- α eksprese eder RSPO-3 nöronlarının ortalama yüzde atmış üçü ER- α eksprese eder; PNX nöronlarının yaklaşık yüzde on dokuzu ER- β eksprese eder, RSPO-1 nöronlarının yaklaşık yüzde yirmi sekizi ER- β eksprese eder RSPO-3 nöronlarının ortalama yüzde on biri ER- β eksprese eder.

Bu da Phoeniksin, RSPO-1, RSPO-3 nöronlarının etkilerini östrojen reseptörleri üzerinden gösterebileceğini düşündürmüştür. Farklı bölgelerdeki aynı nöronların etkilerini farklı östrojen reseptörleri üzerinden gösterebilir. Ek olarak aynı bölgedeki farklı nöronların etkilerini aynı östrojen reseptörleri üzerinden gösterebilir. Hipotalamusun tamamı değerlendirildiğinde ise proöstrus gruplarında ER-α ve ER-β eksprese eden PNX, RSPO-1 ve RSPO-3 nöronlarının yüzdeleri arasında istatistiksel

olarak anlamlı fark olmasa da ovariektomi grubunda ER-α ve ER-β eksprese eden PNX, RSPO-1 ve RSPO-3 nöronlarının yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır. Bu da ovariektominin ER-α ve ER-β eksprese eden PNX, RSPO-1 ve RSPO-3 nöronları üzerinde bir etkisinin olduğunu göstermektedir. Bu durum östrojen seviyesinin düşmesinden, cerrahiye bağlı sebeplerden ya da başka nedenlerden kaynaklanabilir. Bu tez çalışmasını gerçekleştirirken bazı OVX deneklerin ER-α ve ER-β seviyesinde önemli değişiklikler gözlenirken, bazı OVX deneklerde önemli bir değişiklik olmamıştır. Bu durumda östrojen seviyesine ek olarak başka nedenlerinde östrojen reseptör sayısını etkileyebileceğini düşündürmüştür.

POMC nöronlarının ekspresyonu östrojen seviyeleri ile paraleldir; en yüksek ekspresyonu östrojenin en yüksek olduğu proöstrustadır (Bohler, Tracer, Merriam, & Petersen, 1991). Menapoz ya da ovariektomi durumunda POMC nöronlarının ekspresyonu azalır ancak E2 tedavisi uygulanan sıçanların POMC nöronlarında beta-endorfin (POMC nöronlarında üretilen bir nöropeptit) ve POMC mRNA düzeyi artar. Bu da POMC nöronlarının metabolik ve üreme ile ilişkili olduğunu düşündürür.

Öte yandan E2, hipotalamik NPY ekspresyonu üzerinde inhibitör etkiyi indükler. AgRP ve NPY'nin hipotalamik ekspresyonu, östrus döngüsü boyunca beslenme düzenindeki döngüsel değişikliklere göre değişir. Ek olarak, NPY mRNA ekspresyon seviyeleri OVX sıçanlarda yükselirken, E2 tedavisinden sonra düşer (Mahboobifard ve ark., 2022).

Bohler ve ark. yaptıkları çalışmada POMC nöronları ile östrojen seviyeleri arasında pozitif bir korelasyon olduğunu bildirmişlerdir ancak bu tez çalışmasında PNX, RPSO-1 VE RSPO-3 nöronlarının ekspresyonu ölçülmemiştir. Yapılan tez çalışması sadece VMN de yer alan ER-α eksprese eden PNX nöronlarının ve SON'de yer alan ER-β eksprese eden RSPO-3 nöronlarının ovariektomi grubuna kıyasla proöstrus grubunda anlamlı olarak arttığını göstermektedir.

ER-α'nın metabolik düzenleyici etkisi ER-β'dan baskındır. Farmakolojik çalışmalara ve genetik modellere göre östrojenler öncelikli olarak enerji dengesini ER-α yoluyla düzenler. Farmakolojik verilere göre ER-α agonisti propilpirazoletriol (PPT) güçlü bir anorektik etkiye sahipken, ER-β agonisti diarilpropionitril (DPN) bu etkiye sahip değildir.

ER-α'daki bozukluklar dişi ve erkek farelerde hiperfaji, yağlanmada artış, hipometabolizm ve insülin direncine sebep olur. Benzer olarak aromataz enziminin delesyonu dişi ve erkek farelerde obeziteye neden olurken obez insanlarda da aromataz enziminde yetersizlik olduğu bulunmuştur. ER-β 'nın ise obezite ve ona bağlı herhangi bir metabolik değişiklikle bağlantısı olmadığı gösterilmiştir (Mahboobifard ve ark., 2022).

Yapılan tez çalışması da ER-β'nın besin alımı ile ilişkili hipotalamus çekirdeklerinde (SON ve PVN) varlığı gösterilmiştir. Ek olarak anoreksijenik etkisinin olduğu bilinen Phoeniksin, RSPO-1, RSPO-3 nöronları ile kolokalizasyonu da gösterilmiştir.

Östrojenin artması durumunda östrojen reseptörlerinin sayısının azaldığı, östrojenin azalması durumunda ise östrojen reseptörlerinin arttığı bilinmektedir. Mohamed ve ark. yaptıkları çalışmada OVX'ten sonraki 14.günde östrojenin düştüğünü ileri sürmüşlerdir. OVX grubu sham grubu ile kıyaslandığında OVX grubunun uterus ve böbrekteki ER-α seviyeleri sham grubuna kıyasla anlamlı olarak artmıştır. Yine OVX grubunun sham grubuna oranla serebral kortekste ve beyin sapında daha yüksek ER-α seviyeleri içerdiği bulunmuştur ancak beyin sapındaki artış istatiksel olarak anlamlı değildir. (Mohamed, & Abdel-Rahman, 2000). Yine yapılan başka bir çalışmada OVX'ten sonraki 14.günde, sıçan uterin ER mRNA seviyelerinde 3 kat artışın olduğu bildirilmiştir (Rosser, Chorich, Howard, Zamorano, & Mahesh, 1993).

Yapılan tez çalışmasında bu bilgiden faydalanılarak sıçanların 14.günde sakrifiye edilmesine karar verilmiştir.

PNX, hipotalamusta periventriküler çekirdek (Pe), paraventriküler çekirdek (PVN), ventromedial çekirdek (VMN), supraoptik çekirdek (SON), lateral hipotalamik alan (LHA), arkuat çekirdek (ARC) ve median eminens (ME)'te bulunur(Billert ve ark., 2020). Sunulan tez çalışmasında bulunan sonuçlar da literatürler uyumludur.

BPA (bisfenol A), PNX ekspresyonunu azaltırken yağ asitlerinden palmitoleat, DHA (dokosaheksaenoik asit) ve oleat PNX ekspresyonunu arttırır. Diğer taraftan cAMP (Siklik adenozin 3',5'-monofosfat), NO (nitrik oksit), PKC (protein kinaz C), leptin ve östrojen (E2)'nin PNX ekspresyonuna etkisi yoktur (McIlwraith, Loganathan, & Belsham, 2018).

Puberte ve gebeliğin 3.trimesterinde GPR173 reseptörü up-regüle olurken östrus döngüsünün farklı evrelerinde GPR173 reseptörünün miktarında dalgalanmalar görülür (Haddock, Almeida-Pereira, Stein, Yosten, & Samson, 2020).

Yapmış olduğumuz çalışmada östrojen reseptörleri ile Phoeniksin nöronlarının arasında direkt bir ilişkinin olabileceğini ortaya koymuştur ancak yapılan diğer çalışmalar PNX reseptörleri ile östrojen seviyeleri arasında bir ilişkinin olabileceğini öne sürmüştür.

Sıçan hipotalamik nükleusunda nesfatin-1 nöronları ile PNX nöronları kolokalizasyon gösterildiği yapılan çalışmalarca bildirilmiştir (Friedrich ve ark., 2019). Bu iki peptitin karşıt işlevselliğinin olması nesfatin-1' e karşı PNX' in dengeleyici bir rolü olduğunu düşündürmüştür (Friedrich, & Stengel, 2021).

Yurtseven ve ark. yaptıkları çalışmada RSPO-1 eksprese eden nöronların, supraoptik çekirdek (SON), suprakiazmatik çekirdek (SCh), anterior paraventriküler çekirdek (PVN), periventriküler hipotalamik çekirdek (PeV), anterior hipotalamik alan, magnoselüler preoptik çekirdek (MCPO), lateral hipotalamik alan (LHA) bulunurken az sayıda arkuat çekirdekte (ARC) bulunduğunu immünohistokimyasal olarak göstermiştir (Yurtseven Gok ve ark., 2023). Yapılan tez çalışmasında ise RSPO-1 nöronlarının ventromedial çekirdekte de bulunduğu immünohistokimyasal olarak gösterilmiştir.

Fadrozol kaynaklı östrojen yolu blokajları olan erkek ve dişi gonadal hücreleri arasında RSPO-1 ekspresyonu açısından fark olmadığı yani östradiol kaynaklı östrojen uyarımının RSPO-1 ekspresyonunu değiştirmediği yapılan çalışmalarca bildirilmiştir. Ayrıca gonadal hücrelerde RSPO-1'in aşırı ekspresyonu, akış aşağı hedef genleri olan Wnt aile üyesi 4 (WNT4) ve Catenin beta 1'in (CTNNB1) ve bir östrojen yolu geni olan östrojen reseptörü α'nın (ER-α) mRNA ekspresyonunu indüklediği bildirilmiştir (Zheng ve ark., 2023).

Bu bilgilere dayanarak RSPO-1'in seviyesinin ovaryumda ER- α seviyesini arttırdığını ama östrojen seviyesinin RSPO-1 üzerinde bir etkisinin olmadığı söylenebilir. Ancak hipotalamustaki seviyesi bildirilmemiştir. Bu tez çalışmasında ise hipotalamusta OVX grubu (östrojenin düşük olduğu grup) ve proöstrus grubu (östrojenin yüksek olduğu grup) arasında ER-α açısından istatistiksel olarak anlamlı bir sonucun olmadığı bulunmuştur.

RSPO-3 eksprese eden nöronlar, SON, SCh, PVN, Pev, ARC, VMN, LHA, zona inserta (ZI) ve anterior parvisellüler çekirdekte bulunur (Yurtseven Gök ve ark., 2023). Bu tez çalışmasında da literatürle uyumlu sonuçlar bulunmuştur.

RSPO-1 VMN'de eksprese edilir RSPO-3 ise PVN'de eksprese edilir ve ikisininde açlık ile down-regüle olduğu yapılan çalışmalarca bildirilmiştir. (Li ve ark., 2014).

Önceki çalışmalar abdominal cerrahinin bazı beyin çekirdeklerinde Phoeniksin immünoreaktivitesinde önemli değişikliklere neden olduğu ve aynı çalışmada bazı nöronlarda c-Fos aktivayonunu arttırdığı bildirilmiştir (Friedrich ve ark., 2023). Yapılan tez çalışmasında OVX'in Phoeniksin immünreaktivitesinde etkisine bakılmamıştır ancak OVX'in Phoeniksin immünoreaktivitesini arttırabileceğini ve/veya östrojen reseptörleri üzerinde etkisinin olabileceği düşünülmüştür.

Bu tez çalışmasında PNX, RSPO-1 ve RSPO-3 nöronlarındaki östrojen reseptörleri literatürde ilk kez gösterilmiştir. Hipotalamustaki PNX, RSPO-1 ve RSPO-3 nöronlarının östrojen sinyallerini ER-α ve ER-β yardımıyla algılayıp yanıt verebileceği düşünülmüştür. Östrojenin yüksek olduğu proöstrus ve östrojenin düşük olduğu ovariektomi grubu için hipotalamusun farklı çekirdeklerinde değerlendirmeler yapılmıştır. Ek olarak ER-α ve ER-β eksprese eden PNX, RSPO-1 ve RSPO-3 nöronlarının yüzdesi de proöstrus ve ovariektomi grubu için değerlendirilmiştir. Ancak bu bilgiler östrojen ve besin alımı arasındaki ilişkiyi açıklamak için yetersizdir bu nedenle östrojen sinyallerinin besin alımı üzerindeki etkilerini anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

6. KAYNAKLAR

Allen, E., & Doisy, E. A. (1923). An Ovarian Hormone: Preliminary Report on Its Localization, Extraction and Partial Purification, and Action in Test Animals. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 81(10), 819-821. https://doi.org/10.1001/jama.1983.03340190083041

Altunkaynak, B. Z., Ünal, D., Aksak, S., & Ünal, B. (2012). Östrojen hormonu ve menopoz. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Dergisi*, 29(4), 252-256. https://doi.org/10.5835/jecm.omu.29.04.001

Barton, M., Filardo, E. J., Lolait, S. J., Thomas, P., Maggiolini, M., & Prossnitz, E. R. (2018). Twenty years of the G protein-coupled estrogen receptor GPER: Historical and personal perspectives. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 176, 4-15. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.03.021

Billert, M., Rak, A., Nowak, K. W., & Skrzypski, M. (2020). Phoenixin: More than Reproductive Peptide. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 8378. https://doi.org/10.3390/ijms21218378

Bohler, H. C. L., Tracer, H., Merriam, G. R., & Petersen, S. L. (1991). Changes in proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid levels in the rostral periarcuate region of the female rat during the estrous cycle. *Endocrinology*, 128(3), 1265-1269. https://doi.org/10.1210/endo-128-3-1265

Brown, L. M., Gent, L., Davis, K., & Clegg, D. J. (2010). Metabolic impact of sex hormones on obesity. *Brain Research*, C. 1350, ss. 77-85. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.04.056

Caldwell, J. D., & Jirikowski, G. F. (2014). Sex hormone binding globulin and corticosteroid binding globulin as major effectors of steroid action. *Steroids*, 81, 13-16. https://doi.org/10.1016/j.steroids.2013.11.010

Carmeci, C., Thompson, D. A., Ring, H. Z., Francke, U., & Weigel, R. J. (1997). Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics*, 45(3), 607-617. https://doi.org/10.1006/geno.1997.4972

Carruth L.L., & Shahbazi M. (2015). *Estrogen Effects on Traumatic Brain Injury*. USA: Academic Press. https://doi.org/10.1016/c2014-0-00097-4

Challet, E. (2019). The circadian regulation of food intake. *Nature Reviews Endocrinology*, 15(7), 393-405. https://doi.org/10.1038/s41574-019-0210-x

Clarke, S. A., & Dhillo, W. S. (2019). Phoenixin and Its Role in Reproductive Hormone Release. *Seminars in Reproductive Medicine*, 37(4), 191-196. https://doi.org/10.1055/s-0039-3400964

Constantin, S. (2011). Physiology of the GnRH neuron: Studies from embryonic GnRH neurons. *Journal of neuroendocrinology*, 23(6), 542-553.

Cooper, A. J., Gupta, S. R., Moustafa, A. F., & Chao, A. M. (2021). Sex/Gender Differences in Obesity Prevalence, Comorbidities, and Treatment. *Current Obesity Reports*, 10(4), 458-466. https://doi.org/10.1007/s13679-021-00453-x

Cora, M. C., Kooistra, L., & Travlos, G. (2015). Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse:Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicologic Pathology*, 43(6), 776-793. https://doi.org/10.1177/0192623315570339

Crovesy, L., & Rosado, E. L. (2019). Interaction between genes involved in energy intake regulation and diet in obesity. *Nutrition*, 37(4), 191-196.

https://doi.org/10.1016/j.nut.2019.06.027
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
Dudás Bertalan. (2013). *The Human Hypothalamus Anatomy, Functıons And Dısorders*. New York: Nova Science Publishers.
Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Grandien, K., Lagercrantz, S., Lagercrantz, J., Fried, G., … Gustafsson, J. Å. (1997). Human estrogen receptor β-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82(12), 4258-4265. https://doi.org/10.1210/jcem.82.12.4470
Escande, A., Pillon, A., Servant, N., Cravedi, J. P., Larrea, F., Muhn, P., … Balaguer, P. (2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochemical Pharmacology*, 71(10), 1459-1469. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.02.002
Feng, Y., & Gregor, P. (1997). Cloning of a novel member of the G protein-coupled receptor family related to peptide receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 231(3), 651-654. https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6161
Filardo, E. J., & Thomas, P. (2012). Minireview: G protein-coupled estrogen receptor-1, GPER-1: Its mechanism of action and role in female reproductive cancer, renal and vascular physiology. *Endocrinology*, 153(7), 2953-2962. https://doi.org/10.1210/en.2012-1061
Filardo, E. J., Quinn, J. A., Bland, K. I., & Frackelton, J. (2000). Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Molecular Endocrinology*, 14(10), 1649-1660. https://doi.org/10.1210/mend.14.10.0532
Freeman M.E., Grattan D.R., & Houpt T.A. (2008). *Neuroscience In Medicine*. USA: Humana Press.
Friedrich T., Goebel-Stengel, M., Schalla, M. A., Kobelt, P., Rose, M., & Stengel, A. (2023). Abdominal surgery increases activity in several phoenixin immunoreactive nuclei. *Neuroscience Letters*, 1(792), 136938. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2022.136938
Friedrich, T. & Stengel, A. (2021). Role of the novel peptide phoenixin in stress response and possible interactions with nesfatin-1. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9156. https://doi.org/10.3390/ijms22179156
Friedrich, T., Schalla, M. A., Scharner, S., Kühne, S. G., Goebel-Stengel, M., Kobelt, P., … Stengel, A. (2019). Intracerebroventricular injection of phoenixin alters feeding behavior and activates nesfatin-1 immunoreactive neurons in rats. *Brain Research*, 15(1715), 188-195. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.03.034
Fuentes, N., & Silveyra, P. (2019). *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. USA: Academic Press. https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.01.001
Goldman, J. M., Murr, A. S., & Cooper, R. L. (2007). The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 80(2), 84-97. https://doi.org/10.1002/bdrb.20106
Gosden, J. R., Middleton, P. G., & Rout, D. (1986). Localization of the human oestrogen receptor gene to chromosome 6q24→q27 by in situ hybridization.

Cytogenetics and Cell Genetics, 43(3-4), 218-220. https://doi.org/10.1159/000132325

Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J. M., Argos, P., & Chambon, P. (1986). Human oestrogen receptor cDNA: Sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*, 320(6058), 134-139. https://doi.org/10.1038/320134a0

Gülmez, C., & Atakişi, O. (2019). Yeni Hormonlar: R-Spondin-1, Nesfatin-1 ve İrisin. *Caucasian Journal Of Science*, 6(1), 37-50.

Haddock, C. J., Almeida-Pereira, G., Stein, L. M., Yosten, G. L. C., & Samson, W. K. (2020). A novel regulator of thirst behavior: Phoenixin. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 318(6), 1027-1035. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00023.2020

Hao, H. X., Jiang, X., & Cong, F. (2016). Control of Wnt receptor turnover by R-spondin-ZNRF3/RNF43 signaling module and its dysregulation in cancer. *Cancers*, 8(6), 54. https://doi.org/10.3390/cancers8060054

Harada, N., Utsumi, T., & Takagi, Y. (1993). Tissue-specific expression of the human aromatase cytochrome P-450 gene by alternative use of multiple exons 1 and promoters, and switching of tissue-specific exons 1 in carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(23), 11312-11316. https://doi.org/10.1073/pnas.90.23.11312

Heitmann, B. L., Westerterp, K. R., Loos, R. J. F., Sørensen, T. I. A., O'Dea, K., Mclean, P., … Westerterp-Plantenga, M. S. (2012). Obesity: Lessons from evolution and the environment. *Obesity Reviews*, 13(10). https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2012.01007.x

Hill, J. O., Wyatt, H. R., & Peters, J. C. (2013). The importance of energy balance. *European Endocrinology*, 9(2), 111-115. https://doi.org/10.17925/ee.2013.09.02.111

Jensen, E. V., Desombre, E. R., Hurst, D. J., Kawashima, T., & Jungblut, P. W. (1967). Estrogen-receptor interactions in target tissues. *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale*, 56(3), 547-569.

Jia, M., Dahlman-Wright, K., & Gustafsson, J. Å. (2015). Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 29(4), 557-568. https://doi.org/10.1016/j.beem.2015.04.008

Jin, Y. R., & Yoon, J. K. (2012). The R-spondin family of proteins: Emerging regulators of WNT signaling. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 44(12), 2278-2287. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.09.006

Kaiya, H. (2021). *Handbook of Hormones: Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research*. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820649-2.00047-4

Kamat, A., Hinshelwood, M. M., Murry, B. A., & Mendelson, C. R. (2002). Mechanisms in tissue-specific regulation of estrogen biosynthesis in humans. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 13(3), 122-128. https://doi.org/10.1016/S1043-2760(02)00567-2

Kazanskaya, O., Glinka, A., del Barco Barrantes, I., Stannek, P., Niehrs, C., & Wu, W. (2004). R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/β-catenin signaling and is required for Xenopus myogenesis. *Developmental Cell*, 7(4), 525-534. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.07.019

Köylü A., Ömeroğlu S., Akarca Dizakar S.Ö., & Demirel M.A. (2021). Sıçanlarda Vajinal Yayma Örneklerinin Sitolojik Değerlendirilmesi. *Manas Journal of Agriculture Veterinary and Life Sciences*, 11(1), 94-99.

Krolick, K. N., & Shi, H. (2022). Estrogenic Action in Stress-Induced Neuroendocrine Regulation of Energy Homeostasis. *Cells*, 11(5). https://doi.org/10.3390/cells11050879

Kuiper, G. G. J. M., Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Nilsson, S., & Gustafsson, J. Å. (1996). Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(12), 5925-5930. https://doi.org/10.1073/pnas.93.12.5925

Kuiper, G. G. J. M., Shughrue, P. J., Merchenthaler, I., & Gustafsson, J. Å. (1998). The estrogen receptor β subtype: A novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 19(4), 253-286. https://doi.org/10.1006/frne.1998.0170

Kumar, R., Zakharov, M. N., Khan, S. H., Miki, R., Jang, H., Toraldo, G., … Jasuja, R. (2011). The Dynamic Structure of the Estrogen Receptor. *Journal of Amino Acids*, 2011. https://doi.org/10.4061/2011/812540

Lainez, N. M., & Coss, D. (2019). Obesity, Neuroinflammation, and Reproductive Function. *Endocrinology (United States)*, 160(11), 2719-2736. https://doi.org/10.1210/en.2019-00487

Le Magnen, J. (1984). Mechanisms of regulation of energy balance. *Reproduction, nutrition, development*, 24(5 B), 671-692. https://doi.org/10.1051/rnd:19840601

Lee, P. C., & Dixon, J. (2017). Pharmacotherapy for obesity. *Australian Family Physician*, 46(7), 90-96. https://doi.org/10.6118/jmm.2014.20.3.90

Leeners, B., Geary, N., Tobler, P. N., & Asarian, L. (2017). Ovarian hormones and obesity. *Human Reproduction Update*, 23(3). https://doi.org/10.1093/humupd/dmw045

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

López, M., & Tena-Sempere, M. (2015). Estrogens and the control of energy homeostasis: A brain perspective. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 26(8), 411-421. https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.06.003

Lovejoy, D. A. (2005). *Neuroendocrinology: An Integrated Approach*. https://doi.org/10.1002/0470027878

Lucio-Oliveira, F., & Franci, C. R. (2012). Effect of the interaction between food state and the action of estrogen on oxytocinergic system activity. *Journal of Endocrinology*, 212(2). https://doi.org/10.1530/JOE-11-0272

Mahboobifard, F., Pourgholami, M. H., Jorjani, M., Dargahi, L., Amiri, M., Sadeghi, S., & Tehrani, F. R. (2022). Estrogen as a key regulator of energy homeostasis and metabolic health. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 156. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113808

Marcelin, G., Silveira, A. L. M., Martins, L. B., Ferreira, A. V. M., & Clément, K. (2019). Deciphering the cellular interplays underlying obesityinduced adipose tissue fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, 129(10), 4032-4040. https://doi.org/10.1172/JCI129192

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*, 15(12), 838.

https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00838
Miller, B. H., & Takahashi, J. S. (2014). Central circadian control of female reproductive function. *Frontiers in Endocrinology*, 22(4), 195. https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00195
Mitchell, C. S., & Begg, D. P. (2021). The regulation of food intake by insulin in the central nervous system. *Journal of Neuroendocrinology*, 33(4). https://doi.org/10.1111/jne.12952
Mohamed, M. K., & Abdel-Rahman, A. A. (2000). Effect of long-term ovariectomy and estrogen replacement on the expression of estrogen receptor gene in female rats. *European Journal of Endocrinology*, 142(3), 307-314. https://doi.org/10.1530/eje.0.1420307
Novaira, H. J., Negron, A. L., Graceli, J. B., Capellino, S., Schoeffield, A., Hoffman, G. E., … Radovick, S. (2018). Impairments in the reproductive axis of female mice lacking estrogen receptor β in gnrh neurons. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 315(5). https://doi.org/10.1152/ajpendo.00173.2018
Ortiz, J. B., Green, T. R. F., Rampal, G., & Rowe, R. K. (2022). Puberty and traumatic brain injury. *Cellular, Molecular, Physiological, and Behavioral Aspects of Traumatic Brain Injury*. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823036-7.00029-3
Oy, C. (2018). *nesfatin nöronlarının besin alımını baskılayıcı işlevi üzerine gonadal steroid hormonların etkisinin immünohistokimyasal olarak araştirilmasi.*[Yayınlanmamış yüksek lisans tezi, Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü].
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
Pałasz, A., Rojczyk, E., Bogus, K., Worthington, J. J., & Wiaderkiewicz, R. (2015). The novel neuropeptide phoenixin is highly co-expressed with nesfatin-1 in the rat hypothalamus, an immunohistochemical study. *Neuroscience Letters*, 592, 17-21. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.02.060
Prossnitz, E. R., & Barton, M. (2014). Estrogen biology: New insights into GPER function and clinical opportunities. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 389(1-2), 71-83. https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.02.002
Rajeswari, J. J., Blanco, A. M., & Unniappan, S. (2020). Phoenixin-20 suppresses food intake, modulates glucoregulatory enzymes, and enhances glycolysis in zebrafish. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 318(5), 917-928. https://doi.org/10.1152/AJPREGU.00019.2020
Revankar, C. M., Cimino, D. F., Sklar, L. A., Arterburn, J. B., & Prossnitz, E. R. (2005). A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*, 142(3), 307-314. https://doi.org/10.1126/science.1106943
Roesch, D. M. (2006). Effects of selective estrogen receptor agonists on food intake and body weight gain in rats. *Physiology and Behavior*, 87(1). https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.08.035
Ross, R., Soni, S., & Houle, S. A. (2020). Negative energy balance induced by exercise or diet: Effects on visceral adipose tissue and liver fat. *Nutrients*, 12(4), 891. https://doi.org/10.3390/nu12040891

Rosser, M., Chorich, L., Howard, E., Zamorano, P., & Mahesh, V. B. (1993). Changes in rat uterine estrogen receptor messenger ribonucleic acid levels during estrogen- and progesterone-induced estrogen receptor depletion and subsequent replenishment. *Biology of Reproduction*, 48(1). https://doi.org/10.1095/biolreprod48.1.89

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., 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

Scheidereit, C., Krauter, P., Von Der Ahe, D., Janich, S., Rabenau, O., Cato, A. C. B., … Beato, M. (1986). Mechanism of gene regulation by steroid hormones. *Journal of Steroid Biochemistry*, 24(1), 19-24. https://doi.org/10.1016/0022-4731(86)90026-9

Schwabe, J. W. R., & Teichmann, S. A. (2004). Nuclear receptors: the evolution of diversity. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, 2004(217). https://doi.org/10.1126/stke.2172004pe4

Sharma, G., Mauvais-Jarvis, F., & Prossnitz, E. R. (2018). Roles of G protein-coupled estrogen receptor GPER in metabolic regulation. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 176, 31-37. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.02.012

Shughrue, P. J., Komm, B., & Merchenthaler, I. (1996). The distribution of estrogen receptor-β mRNA in the rat hypothalamus. *Steroids*, 61(12), 678-681. https://doi.org/10.1016/S0039-128X(96)00222-X

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), 489-496. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00191.2016

Suszka-Świtek, A., Pałasz, A., Filipczyk, Ł., Menezes, I. C., Mordecka-Chamera, K., Angelone, T., … Wiaderkiewicz, R. (2019). The GnRH analogues affect novel neuropeptide SMIM20/phoenixin and GPR173 receptor expressions in the female rat hypothalamic–pituitary–gonadal (HPG) axis. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 46(4), 350-359. https://doi.org/10.1111/1440-1681.13061

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

Treen, A. K., Luo, V., & Belsham, D. D. (2016). Phoenixin activates immortalized GnRH and kisspeptin neurons through the novel receptor GPR173. *Molecular Endocrinology*, 30(8), 872-888. https://doi.org/10.1210/me.2016-1039

Truss, M., & Beato, M. (1993). Steroid hormone receptors: Interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocrine Reviews*, 14(4), 459-479. https://doi.org/10.1210/edrv-14-4-459

Uenoyama, Y., Inoue, N., Nakamura, S., & Tsukamura, H. (2021). Kisspeptin neurons and estrogen–estrogen receptor α signaling: Unraveling the mystery of steroid

feedback system regulating mammalian reproduction. *International Journal of Molecular Sciences*, C. 22. https://doi.org/10.3390/ijms22179229

Ullah, K., ur Rahman, T., Wu, D. D., Lin, X. H., Liu, Y., Guo, X. Y., … Sheng, J. Z. (2017). Phoenixin-14 concentrations are increased in association with luteinizing hormone and nesfatin-1 concentrations in women with polycystic ovary syndrome. *Clinica Chimica Acta*, 471, 243-247. https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.06.013

Wang, D., Huang, B., Zhang, S., Yu, X., Wu, W., & Wang, X. (2013). Structural basis for R-spondin recognition by LGR4/5/6 receptors. *Genes and Development*, 27(12), 1339-1344. https://doi.org/10.1101/gad.219360.113

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 and Molecular Biology*, 226, 36-44. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2018.07.007

Waterson, M. J., & Horvath, T. L. (2015). Neuronal Regulation of Energy Homeostasis: Beyond the Hypothalamus and Feeding. *Cell Metabolism*, 22(6), 962-970. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.026

Wellman, P. J. (2000). Norepinephrine and the control of food intake. *Nutrition*, *16*(10). https://doi.org/10.1016/S0899-9007(00)00415-9

Westwood, F. R. (2008). The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging. *Toxicologic Pathology*, 36(3), 375-384. https://doi.org/10.1177/0192623308315665

Yiğit A.A., Börük G., & Kabakçı R. (2019). Dişi Ratlarda Üreme Fizyolojisi. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 12(2), 163-167.

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.

Zhang, J. Q., Su, B. Y., & Cai, W. Q. (2004). Immunolocalization of estrogen receptor beta in the hypothalamic paraventricular nucleus of female mice during pregnancy, lactation and postnatal development. *Brain Research*, 997(1). https://doi.org/10.1016/j.brainres.2003.10.039

Zheng, M., Liu, X., Meng, Y., Lin, X., Li, J., Zhu, J., … Zhang, J. (2023). Female-Biased Expression of R-spondin 1 in Chicken Embryonic Gonads Is Estrogen-Dependent. *Animals*, 13(13). https://doi.org/10.3390/ani13132240

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

aa	:	Amino asit
AF	:	Aktivasyon fonksiyonu
AGER	:	Agranüler endoplazmik retikulum
ARC	:	Arkuat çekirdek/ Arkuat nükleus
AVP	:	Arginin Vasopressin
AVPV	:	Anteroventral periventriküler çekirdek/Anteroventral periventriküler nükleus
BPA	:	Bisfenol A
BR	:	Bazik amino asit'ten zengin domain
C/EBP- β	:	CCAAT/enhancer binding protein-β
cAMP	:	Siklik adenozin monofosfat
cDNA	:	Complementary DNA/ Tamamlayıcı DNA
COX1	:	Cytochrome c oxidase subunit I
CTNNB1	:	Catenin beta 1'in
DAB	:	Diaminobenzidin
DBD:	:	DNA-binding domain
DEHYUAM	:	Deney Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi
DHA	:	Dokosaheksaenoik asit
DHT	:	Dihidrotestesteron
DMN	:	Dorsomedial çekirdek/ dorsomedial nükleus
DPN	:	Diarilpropionitril
E2	:	Estradiol
ERE	:	Estrogen response element, östrojen yanıt elementi
ERKs	:	Ekstrasellüler sinyal- regüle eden kinazlar
ER-α	:	Östrojen reseptör-alfa
ER-β	:	Östrojen reseptör-beta
FSH	:	Follicle-stimulating hormone/Folikül stimüle edici hormon
FU-like CR	:	Komşu sistein açısından zengin furin benzeri domain
GnRH	:	Gonadotropin-releasing hormone/Gonadotropin salgılatıcı hormon
GnRH-R	:	Gonadotropin-releasing hormone receptor
GPCR	:	G-protein-Coupled Receptor / G proteini kenetli reseptör
GPER1	:	G protein kenetli östrojen reseptörü
GPR173	:	G-protein-Coupled Receptor 173
GPR27	:	G-protein-Coupled Receptor 27
GPR30	:	G protein-coupled receptor 30
GPR85	:	G-protein-Coupled Receptor 85
H_2O_2	:	Hidrojen peroksit
HCl	:	Hidroklorik Asit
HPG aks	:	Hipotalamohipofizer gonadal aks
İ.s.v.	:	İntraserebroventriküler
KBB	:	Kan beyin bariyeri
LBD	:	Ligand Binding Domain
LGR4/5/6	:	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 4/5/6
LH	:	Luteinizan hormon
LHA	:	Lateral hipotalamik alan
MAPK	:	Mitojenin akifleştirdiği protein kinaz
MCF-7	:	Michigan Cancer Foundation-7

MCPO	:	Magnosellüler preoptik çekirdek/Magnosellüler preoptik nükleus
ME	:	Median eminens
MTOC1	:	Mitochondrially encoded cytochrome c oxidase I
Ni-DAB	:	Nikel-Diaminobenzidin
NO	:	Nitrik oksit
NPY	:	Nöropeptit Y
NTD	:	Amino-terminal domain
NTS	:	Nükleus traktus solitorius
NUCB2	:	Nucleobindin2
Oct-1	:	Organic cation transporter-1
OVLT	:	Lamina terminalisin organum vasculosum'u
OVX	:	Ovariektomi
Pe	:	Periventriküler çekirdek/ Periventriküler nükleus
PeV	:	Periventriküler çekirdek/Periventriküler nükleus
PFA	:	Paraformaldehit
PKA	:	Protein kinaz A
PKC	:	Protein kinaz C
PKOS	:	Polikistik over sendromu
PNX	:	Phoeniksin
POA	:	Preoptik alan
POMC	:	Proopiomelanokortin
PPT	:	Propilpirazoletriol
PVN	:	Paraventriküler çekirdek/ Paraventriküler nükleus
RNF43	:	Ring finger protein 43
RSPO-1	:	roof plate-spesifik spondin-1
RSPO-2	:	roof plate-spesifik spondin-2
RSPO-3	:	roof plate-spesifik spondin-3
RSPO-4	:	roof plate-spesifik spondin-4
SCh	:	Suprakiazmatik çekirdek/Suprakiazmatik nükleus
SON	:	Supraoptik çekirdek/ Supraoptik nükleus
SREB1	:	super conserved receptor expressed in the brain 1
SREB2	:	super conserved receptor expressed in the brain 2
SREB3	:	super conserved receptor expressed in the brain 3
SRY	:	Sex-determining region Y gene
Swim20	:	Small integral membrane protein 20
TSR	:	Trombospondin tip I tekrar domaini
VMN	:	Ventromedial çekirdek/ Ventromedial nükleus
WNT4	:	Wnt aile üyesi 4
ZI	:	Zona inserta
ZNRF3	:	Zinc And Ring Finger 3

8. EKLER

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

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN ADI	*Anoreksijenik peptit sentezleyen nöronlarda östrojen reseptör ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak belirlenmesi*
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ KURUMU	Prof. Dr. Özhan EYİGÖR BUÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD
	YARDIMCI ARAŞTIRICILAR	Yüksek Lisans Öğr. Nergis COŞKAN
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Nergis COŞKAN'ın Yüksek Lisans Tez Projesi
	ARAŞTIRMANIN SÜRESİ	01 Şubat 2023 – 01 Kasım 2023
	KULLANILACAK HAYVAN TÜRÜ VE SAYISI	20 Adet Dişi Sıçan

	Belge Adı	Tarihi
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	ARAŞTIRMA BAŞVURU FORMU	**02.12.2022**

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No : 2022 - 17 / 04**	**Tarih: 13.12.2022**
	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		Düşünceler
				Kabul	Ret	
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

Yüksek lisans eğitimim boyunca ve tezimin her aşamasında desteğini, tecrübesini ve bilgisini benden esirgemeyen birlikte çalışmaktan onur duyduğum çok değerli tez danışmanım ve Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Özhan EYİGÖR'e sonsuz teşekkür ederim.

Tez dönemimde ve ders dönemimde bilgisini, tecrübesini ve sabrını benden esirgemeyen görüş ve önerileriyle her zaman destek olan Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. F. Zehra MİNBAY'ya teşekkür ederim.

Eğitimim süresince bilgisini, desteğini ve ilgisini esirgemeyen disiplinli oluşuyla örnek olan Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Semiha ERSOY'a teşekkür ederim.

Benden bilgi ve desteğini esirgemeyen Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Berrin AVCI'ya teşekkür ederim.

İhtiyacım olduğunda yardımlarını esirgemeyerek destek olan ve eğitimimdeki emeklerinden dolayı Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Dr. Öğr. Üyesi Duygu GÖK YURTSEVEN'e ve Sayın Doç. Dr. Sema SERTER KOÇOĞLU'na teşekkür ederim.

Tezim sırasında her zaman bana destek olan, yardımlarını esirgemeyen başta Yüksek Lisans Öğrencisi Bahar POMAK ADALI, Yüksek Lisans Öğrencisi Miray BERBER, Yüksek Lisans Öğrencisi Talha Yasin DURDU ve Biyo. Ayşe AKBAŞ olmak üzere Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı'ndaki asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmamdaki desteklerinden dolayı Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Bu süreçte beni yalnız bırakmayan, destekleyen, cesaretlendiren ve bana inanan Bursa Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Zooloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Dr. Öğr. Üyesi Rahşen S. KAYA, Melisa BİLGİSEVER, Reyhan YÜKSEKDAĞ, Esra BELİK Özgenur AK ve Berk ESKİMÜFTÜLER'e teşekkür ederim.

Son olarak beni bugünlere getiren, desteğini esirgemeyen, her koşulda yanımda olan ve motive eden annem Gülhan COŞKAN'a ve babam İbrahim COŞKAN'a sonsuz teşekkür ederim.

10. ÖZGEÇMİŞ

Lise öğrenimini Ahmet Kırmızı Koleji'nde tamamladı. 2016 yılında Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve 2020 yılında mezun oldu. 2020 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalında yüksek lisansa başladı.