

İntraserebroventriküler Nesfatin-1 Enjeksiyonun Erkek Sıçanlarda Serum Ghrelin, Leptin, Orexin-A ve Asprosin Düzeylerine Etkisi

The Effect of Intracerebroventricular Nesfatin-1 Injection on Serum Ghrelin, Leptin, Orexin-A, and Asprosin Levels in Male Rats

Fatmanur SELİM¹, Ömer Faruk KALKAN¹, Ali Yavuz UZUN², Ahmet ALVER³, Zafer ŞAHİN¹

ÖZ

Hipotalamik alanlarda üretilen nesfatin-1, anoreksijenik bir peptittir. Nesfatin-1'in bu anoreksijenik etkisinde hipotalamo-hipofizer-adrenal (HPA) aks aktivasyonu yanı sıra stres yanıtı da rol oynar. Nesfatin-1'in leptin, ghrelin, orexin-A ve asprosin gibi açlık-tokluk üzerinde önemli rol oynayan nöropeptitler üzerinde nasıl bir etkiye sahip olduğu tam olarak aydınlatılmamıştır. Bu çalışmada, nesfatin-1'in CRH1, CRH2 ve oksitosin reseptör antagonistleriyle etkileşiminin, serum ghrelin, leptin, asprosin ve oreksin-A düzeyleri üzerindeki etkilerini araştırmak hedeflenmiştir. Çalışmada toplam 42 adet erkek sıçan kullanılmış ve rastgele 6 gruba ayrılmıştır; (her grup için n=7): sham (kontrol), nesfatin-1, nesfatin-1 (25pmol) + P234 (1 nmol), nesfatin-1 + antalarmin (0,1 µg), nesfatin-1 + astressin (1 µg) 2B, nesfatin-1 + atosiban (300 ng). Tüm antagonistler intraserebroventriküler (ICV) yolla enjekte edilmiştir. Hayvanlar anestezi (1.25 g/kg, intraperitoneal) altına alındıktan 30 dakika sonra dekapitasyonla sakrifiye edilmiştir. Serum örnekleri toplanmış ve leptin, ghrelin, orexin-A ve asprosin seviyeleri ELISA ticari kitleri ile ölçülmüştür. Nesfatin-1 tek başına uygulaması serum leptin, ghrelin, orexin-A ve asprosin seviyelerini değiştirmemiştir (p>0.05). Nesfatin-1'in P234 ile uygulaması orexin-A ve ghrelin seviyelerini azaltırken leptin seviyesini artırmıştır (p<0.05). Nesfatin-1'in antalarmin, astressin-2B ve atosiban ile uygulanması serum orexin-a seviyesini azaltmıştır (p<0.05). Elde edilen bulgular, nesfatin-1'in açlık-tokluk düzenleyici nöropeptidler üzerindeki etkilerinin, reseptör düzeyindeki etkileşimler aracılığıyla modüle edildiğini göstermektedir. Özellikle CRH1, CRH2 ve oksitosin reseptörlerinin antagonizmi sonrasında gözlenen orexin-A düzeylerindeki düşüş, nesfatin-1'in oreksijenik sistemler üzerinde dolaylı inhibitör etkiler gösterebileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Nesfatin-1, Ghrelin, Leptin, Oreksin-A, Asprosin

ABSTRACT

Nesfatin-1 is an anorexigenic peptide produced in hypothalamic regions. The anorexigenic effect of nesfatin-1 involves not only the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis but also the stress response. Although nesfatin-1 is known to influence appetite-regulating neuropeptides, its specific effects on leptin, ghrelin, orexin-A, and asprosin have yet to be fully characterized. This study was conducted to explore how nesfatin-1 interacts with CRH1, CRH2, and oxytocin receptor antagonists to affect the serum concentrations of these neuropeptides. In this study, a total of 42 animals were used and randomly divided into 6 groups (n=7 per group): sham (control), nesfatin-1, nesfatin-1 (25 pmol) + P234 (1 nmol), nesfatin-1 + antalarmin (0.1 µg), nesfatin-1 + astressin-2B (1 µg), and nesfatin-1 + atosiban (300 ng). All antagonists were administered via the intracerebroventricular (ICV) route. The animals were sacrificed by decapitation 30 minutes after anesthesia (1.25 g/kg, intraperitoneal). Serum samples were collected, and levels of leptin, ghrelin, orexin-A, and asprosin were measured using commercial ELISA kits. Administration of nesfatin-1 alone did not significantly alter serum leptin, ghrelin, orexin-A or asprosin levels (p>0.05). Co-administration of nesfatin-1 with P234 reduced orexin-A and ghrelin levels while increasing leptin levels (p<0.05). Co-administration of nesfatin-1 with antalarmin, astressin-2B, or atosiban resulted in a significant decrease in serum orexin-A levels (p<0.05). These findings suggest that the effects of nesfatin-1 on neuropeptides regulating hunger and satiety are modulated through receptor-level interactions. In particular, the observed decrease in orexin-A levels following antagonism of CRH1, CRH2, and oxytocin receptors indicates that nesfatin-1 may exert indirect inhibitory effects on orexigenic systems.

Keywords: Nesfatin-1, Ghrelin, Leptin, Orexin-A, Asprosin

Önemli Noktalar

- * Nesfatin-1 tek başına erkek ratlarda serum leptin, ghrelin, oreksin-A veya asprosin düzeylerini değiştirmedir.
- * Nesfatin-1'in CRH1, CRH2 ve oksitosin reseptör antagonistleri ile birlikte uygulanması ise oreksin-A düzeylerini anlamlı şekilde azalttı ve bu durumun reseptör aracılı bir modülasyonu işaret ettiğini gösterdi.

Çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onaylanmıştır (31.05.2022 tarihli ve 53488718-475 sayılı karar nr: 2022/18)

¹ MSc, Fatmanur SELİM, Fizyoloji, fatmanurozturk@gmail.com, ORCID: 0000-0001-5567-3462

² Dr.Öğr.Üyesi, Ömer Faruk KALKAN, Fizyoloji, KTÜ Tıp Fakültesi, ofkalkan@ktu.edu.tr, ORCID: 0000-0002-7574-1183

³ Öğr.Gör.Dr, Ali Yavuz UZUN, Anatomi, KTÜ Tıp Fakültesi, aliavuzuzun@ktu.edu.tr, ORCID: 0000-0003-2020-0192

⁴ Prof.Dr, Ahmet ALVER, Tıbbi Biyokimya, KTÜ Tıp Fakültesi, alver61@yahoo.com, ORCID: 0000-0002-9617-6689

⁵ Doç.Dr, Zafer ŞAHİN, Fizyoloji, KTÜ Tıp Fakültesi, zafersahin55@yahoo.com, ORCID: 0000-0001-7982-7155

İletişim / Corresponding Author: Ömer Faruk KALKAN
e-posta/e-mail: ofkalkan@ktu.edu.tr

Geliş Tarihi / Received: 26.06.2025
Kabul Tarihi/Accepted: 18.08.2025

GİRİŞ

Nesfatin-1, nükleobindin-2 öncüsünden (NUCB2) türetilen bir anoreksijenik peptittir. Nesfatin-1, gıda alımı, bağırsak hareketliliğinin düzenlenmesi, enerji tüketimi, stres cevabı ve lipid metabolizmasının düzenlenmesi gibi birçok fizyolojik süreçte rol alır.¹ NUCB2 öncelikli olarak mide beyaz yağ dokusundan ve mide mukozasında eksprese edilir. Daha az olmak üzere pankreas ve testis gibi organlarda da eksprese edilmektedir. İlave olarak merkezi sinir sistemi yapılarında da (hipotalamus, beyin sapı vb.) bulunur.² Nesfatin-1'in santral enjeksiyonun yiyecek alımını azalttığı yapılan çalışma ile gösterilmiştir.³ Bu durum Nesfatin-1'in beslenme üzerinde negatif etkili molekül olduğunu göstermektedir.

Nesfatin-1 anoreksijenik etkisini hipotalamik paraventriküler çekirdek (PVN) içindeki nöronlar ve arkuat çekirdek içindeki nöronların uyarılabilirliğini etkileyerek göstermektedir.^{4,5} Ayrıca yapılan çalışmalarda nesfatin-1'in anoreksijenik bu etkiyi kortikotropin salgılatıcı hormon 2 (CRH2) ve oksitosin reseptörü ile ortaya çıkarabileceği ön görülmüştür.^{6,7}

Besin alımının kontrolü leptin, ghrelin, asprosin, oreksin A/B' nin de içinde bulunduğu oreksijenik ve anoreksijenik nöropeptitler aracılığıyla düzenlenir.⁸

Leptin yağ depolarıyla orantılı olarak yağ dokusundan salgılanır ve merkezi etki göstererek gıda alımını azaltır ve enerji

harcamasını artırır.⁹ Ghrelin ise mideden salgılanır ve besin alımını ve iştahı artırıcı etki gösterir.¹⁰ Fibrilin 1'in (FBN1) geni tarafından kodlanan asprosin açlık sırasında yağ dokusundan salgılanarak metabolik etkiler göstermektedir.¹¹ Oreksin-A ise hipotalamik nöronlardan sentezlenerek gıda alımını artırır.¹² Yapılan bir çalışmada nesfatin-1 peptidinin G proteine bağlı reseptörle etkileşime girerek Ca^{2+} artışına yol açarak hücresel etki gösterdiği bulunmuştur.¹³ Nesfatin-1'in iştahı azaltıcı etkisi literatürde iyi şekilde tanımlanmıştır. Bu peptidin iştah üzerine olan etkisinde stres yanıtı ve HPA aksının aktive edilmesinin önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Nesfatin-1'in stresle ilişkili etkilerinde yalnızca CRH1 ve CRH2 reseptörleri değil, aynı zamanda oksitosin reseptörü de etkili olmaktadır.^{6,7,14} Ancak, nesfatin-1'in bu reseptörler aracılığıyla oluşturduğu sinyallerin ghrelin, leptin, oreksin-A ve asprosin gibi açlık-toklukla ilişkili peptitlerin düzeylerine nasıl etki ettiği henüz açıklığa kavuşmamıştır. Bu bağlamda, çalışmamız nesfatin-1'in CRH1, CRH2 ve oksitosin reseptörleriyle etkileşiminin bu hormonların serum düzeylerine olan etkilerini incelemeyi amaçlamaktadır. Bu amaçla çalışmamızda sıçanlarda CRH2 reseptör antagonisti astressin-2B ve CRH1 reseptör antagonisti antalarmin, oksitosin reseptör antagonisti atosiban ve kisspeptin reseptör antagonisti P234 kullanılarak, bahsedilen yolaklar irdelenmiştir.

MATERYAL VE METOT

Hayvanlar

Çalışmada Wistar albino türü 42 erkek sıçan (250-300gram ağırlığında, 3-4 aylık) kullanılmıştır. Deney hayvanları KTÜ Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden alınmıştır. Deney süresince hayvanlar sabit sıcaklık (21 ± 2 °C) ve 12 saat gece ve 12 saat gündüz (ışık açılışı saati 07.00) olacak bir ortamda tutulmuştur.

Araştırma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun

31.05.2022 tarihli ve 53488718-475 sayılı 2022/18 numaralı kararıyla onaylanarak gerçekleştirilmiştir.

Deney Prosedürü

Hayvanlar rastgele 6 gruba ayrılmıştır. Bunlar: sham (kontrol), nesfatin-1, nesfatin-1 + p234, nesfatin-1 + antalarmin HCl, nesfatin-1 + astressin-2B, nesfatin-1 + atosiban grubudur. Her grupta 7 hayvan bulunmaktadır.

Sham (kontrol) grubuna, lateral ventriküle 2 µl/dakika hızla toplam 2 dakika süresince (toplamda 4 µl) yapay beyin omurilik sıvısı (BOS) enjekte edilmiştir. Nesfatin-1 grubuna, 25 pmol dozundaki nesfatin-1, yapay BOS içinde çözülerek 4 µl hacminde lateral ventrikül içerisine uygulanmıştır. Nesfatin-1 + P234 grubunda, önce 25 pmol dozunda nesfatin-1, 2 µl hacminde yapay BOS içinde enjekte edilmiş, bu işlemin 5 dakika sonrasında ise 1 nmol dozunda P234, 2 µl hacminde verilmiştir. Nesfatin-1 + antalarmin HCl grubunda, nesfatin-1 uygulamasından 5 dakika önce 0,1 µg dozunda antalarmin enjeksiyonu yapılmış ve ardından nesfatin-1 uygulanmıştır. Nesfatin-1 + astressin-2B grubunda ise, nesfatin-1 uygulamasından 5 dakika önce 1 µg dozunda astressin-2B enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir.¹⁵ Bu işlemin ardından nesfatin-1 enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Nesfatin-1 + atosiban grubunda ise, nesfatin-1 uygulamasından 5 dakika önce 300 ng/sıçan dozunda atosiban verilmiştir¹⁶. Ardından 50 pmol dozunda nesfatin-1 enjekte edilmiştir. Enjeksiyonun ardından geçen 30 dakikalık sürenin sonunda, hayvanlar servikal dislokasyon yöntemiyle sakrifiye edilerek deney sonlandırılmıştır.

Santral Enjeksiyon Protokolü

Deney hayvanlarının deneyden 12 saat öncesinde yem alımı durdurulmuştur ancak suya erişimi serbest bırakılarak kan şekeri ölçülmüştür. Açlık kan şekeri normal değerinin dışında sonuç veren hayvanlar çalışmadan çıkarılmıştır. Enjeksiyon sonrası 30. dakikada numuneleri toplamak için deney sonlandırılmıştır. Süre olarak 30 dakikalık bir zaman diliminin belirlenmiş olmasının gerekçesi nesfatin-1'in plazma yarı ömrü dikkate alınmasıdır.¹⁷

Sıçanlar, periton içine uygulanan üretan (1.25 g/kg) ile anestezi altına alındıktan sonra, stereotaksik cihaza yerleştirilmiştir. Anestezinin yeterliliği kontrol edildikten sonra, bistüri kullanılarak kafa derisi açılmış ve kafatası, üzerindeki yumuşak dokulardan temizlenmiştir. Bregma noktası belirlendikten sonra, kafa stereotaksik cihazın tutucusuna klips yardımıyla sabitlenmiş ve kılavuz kanül aracılığıyla enjeksiyon için gerekli

koordinatlar saptanmıştır. Rat beyin atlası referans alınarak lateral ventriküle ait koordinatlar (lateral: 1.70 mm, anteroposterior: -0.72 mm, ventral: 4 mm) belirlenmiş ve bu noktanın kafatasındaki izdüşümü işaretlenmiştir¹⁸. Daha sonra, bu bölge tur motoruyla delinmiş ve enjeksiyonlar Hamilton enjektörü kullanılarak lateral ventriküle uygulanmıştır.

Serum Örneklerinin Toplanması ve Biyokimyasal Analizler

Enjeksiyonların ardından belirtilen sürenin geçmesiyle birlikte, anestezi altındaki hayvanlar dekapitasyon yöntemiyle sakrifiye edilmiştir. Vücut kanı, cam bir huni aracılığıyla sarı kapaklı vakumlu tüplere alınmıştır. Toplanan bu kan örnekleri, soğutmalı santrifüj cihazında 15 dakika boyunca 5000 rpm hızında santrifüj edilerek serumları ayrılmış ve analiz zamanına kadar Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'na ait soğutucularda saklanmıştır. Serum örneklerinde yapılacak ELISA analizleri, ticari kitlerin kullanım talimatlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Serum örneklerindeki asprosin düzeyleri, üretici firmanın (Cloud-Clone, Wuhan, Çin) talimatlarına uygun olarak SEA332Ra katalog numaralı ticari ELISA kiti kullanılarak ölçülmüştür. Analiz gününe kadar -80 °C'de muhafaza edilen serumlar, işlem günü buzluktan çıkarılarak oda sıcaklığında çözündürülmüştür. Standart solüsyon hazırlığında, 500 µL standart örneğe 500 µL dilüent eklenerek 2 kat seyreltilmiştir. Daha sonra standart çözeltiler ve serum örneklerinden 100 µL alınarak ELISA plaklarındaki kuyucuklara yerleştirilmiş ve 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından plak aspire edilmiştir. Detection Reagent A ve B, ilgili dilüentlerle 1:100 oranında seyreltilmiştir. İlk olarak kuyucuklara 100 µL Detection Reagent A eklenmiş ve 37 °C'de 1 saat inkübasyon yapılmıştır. Sonrasında plak üç kez yıkanmıştır. Ardından 100 µL Detection Reagent B ilave edilerek 37 °C'de 30 dakika inkübe edilmiş ve bu kez plak beş kez yıkanmıştır. Yıkama işlemi tamamlandıktan

sonra, her kuyucuğa 90 µL substrat çözeltisi (TMB) eklenmiş ve 37 °C’de karanlık ortamda 10–20 dakika bekletilmiştir. Bu süreçte enzim konjugatının etkisiyle renksiz kromojen, mavi renkli ürüne dönüşmüştür. Ardından 50 µL durdurucu solüsyon eklenerek reaksiyon sonlandırılmış ve mavi renk sarıya dönüşmüştür. Son olarak, standartlar ve serum örneklerinin optik yoğunlukları 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucusu ile ölçülmüştür.

Oreksin-A seviyeleri, üretici firma (Cloud-Clone, Wuhan, Çin) tarafından sağlanan talimatlara uygun şekilde, CEA607Ra katalog numaralı ticari ELISA kiti kullanılarak ölçülmüştür. Numuneler analiz gününe kadar -80 °C’de muhafaza edilmiş, çalışma günü ise buzluktan çıkarılarak oda sıcaklığında çözölmüştür. Örnekler, standart PBS tamponu ile 1:2 oranında seyreltilmiştir (150 µL PBS ve 150 µL örnek). Standartlar ve serum örneklerinden 50 µL alınarak ELISA kuyucuklarına konmuş, üzerine 50 µL Detection Reagent A eklenmiş ve 37 °C’de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından kuyucuklar üç kez yıkanmıştır. Daha sonra Detection Reagent B ilave edilip 37 °C’de 30 dakika inkübasyona bırakılmış ve sonrasında beş kez yıkanmıştır. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra, kuyucuklara 90 µL substrat (TMB) eklenmiş ve 37 °C’de karanlık ortamda 10-20 dakika bekletilmiştir. Bu süreçte enzim konjugatı renksiz kromojeni mavi renge dönüştürmüştür. İnkübasyon sonrasında kuyucuklara 50 µL durdurucu solüsyon eklenmiş ve mavi renk sarıya dönüşmüştür. Son olarak, standart ve serum örneklerinin optik yoğunlukları 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda ölçülmüştür.

Ghrelin düzeyleri, üretici firmanın (Cloud-Clone, Wuhan, Çin) önerileri doğrultusunda CEA991Ra katalog numaralı ticari ELISA kiti kullanılarak ölçülmüştür. Standartlar ve serum örneklerinden 50 µL alınarak ELISA kuyucuklarına yerleştirilmiş, üzerine 50 µL Detection Reagent A eklenmiş ve 37 °C’de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuyucuklar üç kez yıkanmıştır. Ardından 100

µL Detection Reagent B eklenmiş ve 37 °C’de 30 dakika inkübe edilmiştir. Bu inkübasyonun ardından beş kez yıkama işlemi yapılmış ve kuyucuklara 90 µL substrat (TMB) eklenerek 37 °C’de karanlık ortamda 10 dakika bekletilmiştir. Enzim konjugatının etkisiyle renksiz kromojen mavi renkli ürüne dönüşmüştür. Son olarak, 50 µL durdurucu çözeltisi ilave edilerek reaksiyon sonlandırılmış ve mavi renk sarıya dönüştürölmüştür. Standartlar ve serum örneklerinin optik absorbans değerleri 450 nm dalga boyunda ELISA cihazında ölçölmüştür.

Leptin seviyeleri, üretici firmanın (Cloud-Clone, Wuhan, Çin) önerileri doğrultusunda SEA084Ra katalog numaralı ticari ELISA kiti kullanılarak ölçölmüştür. Standart solüsyon, 250 µL standart dilüent ile 250 µL standart karıştırılarak 2 kat seyreltilmiştir. Standart ve serum örneklerinden 100 µL alınarak ELISA kuyucuklarına konmuş ve 37 °C’de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından ELISA plağı aspire edilmiştir. Aspire işleminden sonra kuyucuklara 100 µL Detection Reagent A eklenmiş ve 37 °C’de 1 saat daha inkübe edilmiştir. Ardından üç kez yıkama yapılmıştır. Yıkama işleminin ardından 100 µL Detection Reagent B eklenerek 37 °C’de 30 dakika inkübe edilmiş ve sonrasında beş kez yıkanmıştır. Yıkamanın ardından kuyucuklara 90 µL substrat (TMB) eklenmiş ve 37 °C’de karanlık ortamda 10 dakika bekletilmiştir. Bu inkübasyon sırasında enzim konjugatı renksiz kromojeni mavi renkli ürüne çevirmiştir. İnkübasyon tamamlandıktan sonra, 50 µL durdurucu solüsyon eklenmiş ve mavi renk sarıya dönüşmüştür. Standart ve serum örneklerinin optik absorbans değerleri, 450 nm dalga boyunda ELISA cihazı ile ölçölmüştür.

İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler için Tukey testi uygulanmıştır. p değeri <0.05 olduğunda sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı sayılmıştır. Bulgular ortalama ± standart hata şeklinde ifade edilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Serum Leptin Seviyeleri

Nesfatin-1 uygulaması, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında serum leptin düzeyini önemli ölçüde değiştirmemiştir ($p>0.05$). Nesfatin-1 + P234 uygulaması, nesfatin-1 grubuna kıyasla serum leptin seviyesini anlamlı şekilde artırmıştır. ($p<0.05$). Nesfatin-1 + antalarmin uygulaması nesfatin-1 grubuna kıyasla leptin seviyelerini anlamlı ölçüde değiştirmemiştir ($p>0.05$). Nesfatin-1 + astressin-2B uygulaması nesfatin-1 grubuna kıyasla leptin seviyesini değiştirmemiştir ($p>0.05$). Nesfatin-1 + atosiban uygulaması nesfatin-1 grubuna kıyasla leptin seviyesini anlamlı ölçüde değiştirmemiştir ($p>0.05$) (Şekil 1).

Serum Ghrelin Seviyeleri

Nesfatin-1 uygulaması, kontrol grubuna kıyasla serum ghrelin seviyesini önemli ölçüde değiştirmemiştir ($p>0.05$). Nesfatin-1 + P234 uygulaması, nesfatin-1 grubuna göre kıyasla serum ghrelin seviyesini anlamlı şekilde azaltmıştır ($p<0.05$). Nesfatin-1 + antalarmin uygulaması nesfatin-1 grubuna kıyasla ghrelin seviyelerini anlamlı ölçüde değiştirmemiştir ($p>0.05$). Nesfatin-1 + astressin-2B uygulaması nesfatin-1 grubuna kıyasla ghrelin seviyesini değiştirmemiştir ($p>0.05$). Nesfatin-1 + atosiban uygulaması nesfatin-1 grubuna kıyasla ghrelin seviyesini anlamlı ölçüde değiştirmemiştir ($p>0.05$) (Şekil 2).

Serum Orexin-A seviyeleri

Serum orexin-A seviyeleri deney grupları arasında önemli farklılıklar göstermiştir. Nesfatin-1 uygulaması, kontrol grubuna kıyasla serum orexin-A seviyesini önemli ölçüde değiştirmemiştir ($p>0.05$). Nesfatin-1 + P234 uygulaması, nesfatin-1 grubuna göre kıyasla serum orexin-A seviyesini anlamlı şekilde azaltmıştır ($p<0.05$). Nesfatin-1 + antalarmin uygulaması nesfatin-1 grubuna kıyasla orexin-A seviyelerini anlamlı ölçüde azaltmıştır ($p<0.05$). Nesfatin-1 + astressin-2B uygulaması nesfatin-1 grubuna kıyasla orexin-A seviyesini azaltmıştır ($p>0.05$). Nesfatin-1 + atosiban uygulaması nesfatin-1

grubuna kıyasla leptin seviyesini anlamlı ölçüde azaltmıştır ($p<0.05$). Orexin-A seviyesindeki en fazla düşüş nesfatin-1 + antalarmin grubunda gözlemlenmiştir (Şekil 3).

Serum Asprosin Seviyeleri

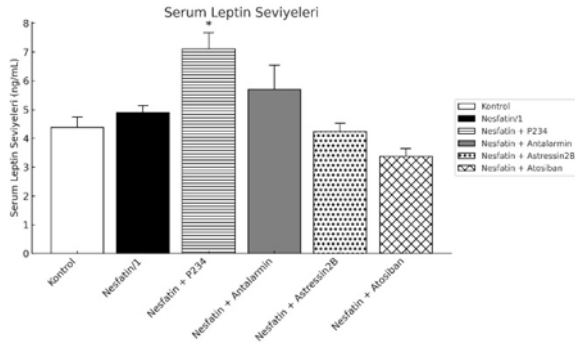
Plazma asprosin seviyeleri gruplar arasında önemli farklılıklar göstermemiştir. Nesfatin-1 uygulaması kontrolle kıyaslandığında anlamlı farklılık göstermemiştir ($p>0.05$). Nesfatin-1 + P234 uygulaması, nesfatin-1 grubuna göre kıyasla serum asprosin seviyesini anlamlı farklılık göstermemiştir. ($p>0.05$). Nesfatin-1 + antalarmin uygulaması nesfatin-1 grubuna kıyasla asprosin seviyelerini anlamlı ölçüde artırmamıştır ($p>0.05$). Nesfatin-1 + astressin-2B uygulaması nesfatin-1 grubuna kıyasla asprosin seviyesini değiştirmemiştir ($p>0.05$). Nesfatin-1 + atosiban uygulaması nesfatin-1 grubuna kıyasla asprosin seviyesini anlamlı ölçüde değiştirmemiştir ($p>0.05$) (Şekil 4).

Bu çalışmada ICV olarak enjekte edilen nesfatin-1'in serum ghrelin, leptin, orexin-A ve seviyeleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Nesfatin-1, kisspeptin reseptör antagonisti (P234), CRH1 ve CRH2 reseptör antagonisti (astressin-2B ve antalarmin HCI), oksitosin reseptör antagonisti (atosiban) ile uygulayarak stres yanıtında rol alan bu moleküllerin nesfatin-1 ile sinyalleşmesini nöropeptiler üzerinde nasıl bir etkiye sahip olduğu araştırılmıştır.

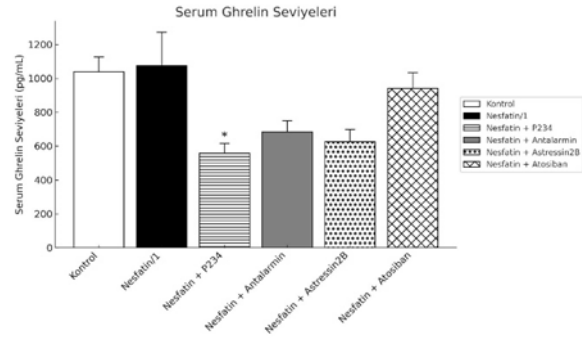
Sonuçlarımız tek başına nesfatin-1 uygulamasının kontrol grubuna kıyasla leptin düzeyine etki etmediğini ancak nesfatin-1'in p234 ile uygulandığında nesfatin-1 grubuna kıyasla leptin düzeyini artırdığını göstermiştir. Daha önceki bir çalışmada, PVN bölgesindeki NUCB2/nesfatin-1'in leptinin anoreksijenik etkisinde önemli bir aracılık rolü oynadığı gösterilmiştir.¹⁹ Literatürde nesfatin-1'in leptinin iştahı baskılayıcı etkisine katkıda bulunduğuna dair bulgular bulunmaktadır. Ancak bizim çalışmamızda yalnızca nesfatin-1 + p234 uygulaması sonrası serum leptin seviyesinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Bu fark, önceki çalışmalarda

leptinin gıda alımı üzerindeki etkisinin ve PVN'deki NUCB2/nesfatin-1 nöronlarının incelenmesine odaklanılırken, bizim araştırmamızda doğrudan serum leptin seviyesinin ölçülmüş olmasına bağlanabilir.

Ayrıca, kullanılan antalarmin HCl, atosiban ve astressin gibi antagonistlerin nesfatin-1'in etkisini tamamen engellememiş olabileceği sonucuna varılabilir.



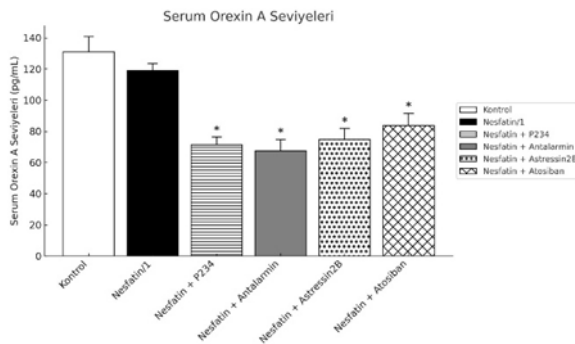
Şekil 1. Farklı deney gruplarında serum Leptin seviyeleri (ng/mL).



Şekil 2. Farklı deney gruplarında serum Ghrelin seviyeleri (pg/mL).

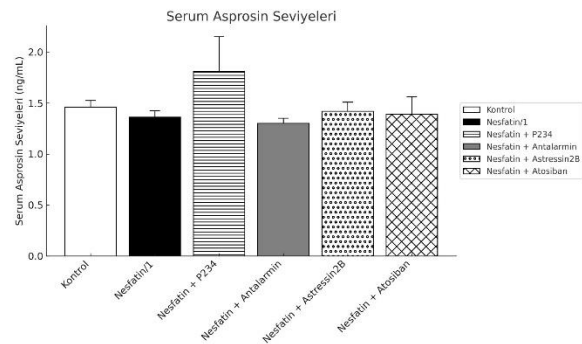
Kontrol grubuna herhangi bir tedavi uygulanmazken, Nesfatin-1 grubuna yalnızca Nesfatin-1 uygulanmıştır. Diğer gruplar Nesfatin-1 + kisspeptin reseptör antagonisti (P234), Nesfatin-1 + Antalarmin (CRH reseptör antagonisti), Nesfatin-1 + Astressin-2B (CRH reseptör 2 antagonisti), Nesfatin-1 + Atosiban (oksitosin/vasopressin reseptör antagonisti) almıştır. Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur. * Nesfatin-1 grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu gösterir ($p < 0,05$).

Kontrol grubuna herhangi bir tedavi uygulanmazken, Nesfatin-1 grubuna yalnızca Nesfatin-1 uygulanmıştır. Diğer gruplar Nesfatin-1 + kisspeptin reseptör antagonisti (P234), Nesfatin-1 + Antalarmin (CRH reseptör antagonisti), Nesfatin-1 + Astressin-2B (CRH reseptör 2 antagonisti), Nesfatin-1 + Atosiban (oksitosin/vasopressin reseptör antagonisti) almıştır. Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur. * Nesfatin-1 grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu gösterir ($p < 0,05$).



Şekil 3. Farklı deney gruplarında serum Orexin-A seviyeleri (pg/mL).

Kontrol grubuna herhangi bir tedavi uygulanmazken, Nesfatin-1 grubuna yalnızca Nesfatin-1 uygulanmıştır. Diğer gruplar Nesfatin-1 + kisspeptin reseptör antagonisti (P234), Nesfatin-1 + Antalarmin (CRH reseptör antagonisti), Nesfatin-1 + Astressin-2B (CRH reseptör 2 antagonisti), Nesfatin-1 + Atosiban (oksitosin/vasopressin reseptör antagonisti) almıştır. Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur. * Nesfatin-1 grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu gösterir ($p < 0,05$).



Şekil 4. Farklı deney gruplarında serum Asprosin seviyeleri (ng/mL).

Kontrol grubuna herhangi bir tedavi uygulanmazken, Nesfatin-1 grubuna yalnızca Nesfatin-1 uygulanmıştır. Diğer gruplar Nesfatin-1 + kisspeptin reseptör antagonisti (P234), Nesfatin-1 + Antalarmin (CRH reseptör antagonisti), Nesfatin-1 + Astressin-2B (CRH reseptör 2 antagonisti), Nesfatin-1 + Atosiban (oksitosin/vasopressin reseptör antagonisti) almıştır. Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur. * Nesfatin-1 grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu gösterir ($p < 0,05$).

Başka bir çalışmada, menopoz öncesi ve sonrası obez ile obez olmayan kadınlarda leptin, nesfatin-1 ve kisspeptinin rollerinin araştırıldığı ve bu üç hormon arasında anlamlı bir korelasyon bulunmadığı bildirilmiştir.²⁰ Bu bulgu, bizim çalışmamızda nesfatin-1 grubu ile nesfatin-1 + antalarmin HCl, nesfatin-1 + atosiban ve nesfatin-1 + astressin-2B gruplarında serum leptin seviyelerinde anlamlı bir değişim gözlemlenmemesi sonucunu desteklemektedir.

Tek başına nesfatin-1 uygulamasının kontrol grubuna kıyasla ghrelin düzeyine etki etmemiştir. Ancak kisspeptin reseptör antagonisti p234 ile uygulandığında nesfatin-1 grubuna kıyasla ghrelin düzeyi azalmıştır. Önceki çalışmalar nesfatin-1'in ghrelin salgılanması üzerinde inhibitör etki yaptığını göstermektedir.²¹⁻²² Literatürde yapılan çalışmalar, nesfatin-1 + p234 grubunun serum ghrelin seviyesinde azalma gözlenmesiyle uyumludur. Ancak diğer gruplarda serum ghrelin seviyesinde anlamlı bir değişim tespit edilmemiştir. Bu durum, önceki çalışmaların nesfatin-1'in ghrelin üzerindeki etkilerini merkezi sinir sistemi düzeyinde incelemesine karşın, bizim çalışmamızda doğrudan serum ghrelin seviyesinin değerlendirilmiş olmasından kaynaklanabilir. Ayrıca, nesfatin-1 ile birlikte uygulanan antagonistlerin nesfatin-1'in etkisini tamamen engelleyememiş olabileceği düşünülmektedir.

Tek başına nesfatin-1 uygulaması kontrol grubuna kıyasla orexin-A düzeyinde değişikliğe neden olmamıştır ancak kisspeptin reseptör antagonisti p234, CRH1 reseptör antagonisti antalarmin, CRH2 reseptör antagonisti astressin-2B ve oksitosin reseptör antagonisti atosiban ile birlikte uygulanması orexin-A düzeyini azaltmıştır. Önceki çalışmalar nesfatin-1'in orexin-A üzerinde aktive edici etkisi olmadığını söylemektedir.²³ Nesfatin-1 enjeksiyonunun serum oreksin-A seviyesinde bir değişiklik yapmadığı gözlenmiştir; bu sonuç literatürdeki bulgularla uyumludur. Ancak, diğer uygulamalarda serum oreksin-A seviyelerinde azalma tespit edilmiştir. Bu durum, nesfatin-1'in antagonistlerle birlikte verilmesinden kaynaklanabilir; antagonistlerin nesfatin-1'in etkisini baskılayarak serum oreksin-A düzeylerindeki değişikliğin ortaya çıkmasına neden olabileceği düşünülmektedir.

Nesfatin-1 tek başına veya kisspeptin reseptör antagonisti p234, CRH1 reseptör antagonisti antalarmin, CRH2 reseptör antagonisti astressin-2B ve oksitosin reseptör antagonisti atosiban ile birlikte uygulanması asprosin seviyesinde değişikliğe neden olmamıştır. Nesfatin-1 ile asprosin arasındaki ilişkiyi araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu doğrultuda, elimizdeki verilere dayanarak nesfatin-1 ile asprosin arasında belirgin bir bağlantı olmadığı ileri sürülebilmektedir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, santral olarak uygulanan nesfatin-1'in iştah düzenleyici peptit hormonlar olan grelin, leptin, oreksin-A ve asprosin düzeyleri üzerinde etkileri olduğu görülmüştür. Elde edilen veriler bu fizyolojik etkinin stres yanıtları üzerinden modüle edildiğini ortaya koymaktadır. CRH1 (antalarmin), CRH2 (astressin-2B), oksitosin (atosiban) ve kisspeptin (P234) reseptör antagonistlerinin her birinin, nesfatin-1'in bu etkilerini anlamlı düzeyde baskıladığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, nesfatin-1'in iştah ve enerji metabolizması üzerindeki etkilerinde CRH, oksitosin ve kisspeptin

sistemlerinin aracı rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Elde edilen veriler, nesfatin-1'in santral düzeyde enerji dengesi ve iştah düzenlemesinde önemli bir nöropeptid olduğunu, bu etkilerin ise çoklu nöropeptiderjik yollarla gerçekleştiğini ortaya koymaktadır. Bu nedenle, nesfatin-1 ve ilişkili nöropeptid sistemlerinin hedeflenmesi, obezite ve yeme bozuklukları gibi metabolik hastalıkların tedavisinde potansiyel yeni bir yaklaşım sunabilir. Gelecekte yapılacak çalışmalarda, bu etkileşimlerin detaylı moleküler mekanizmalarının araştırılması ve

farklı beyin bölgelerindeki etkilerinin incelenmesi önerilmektedir.

Teşekkür/Destekleyen Kuruluş

Bu çalışma KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından (TYL-2022-10361 numaralı proje) desteklenmiştir.

Çıkar Çatışmaları

Yazarlar bu makalenin yayınlanmasıyla ilgili herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

Yazarların katkıları

Araştırma, kavramsallaştırma ve yazma ÖFK ve ZŞ tarafından yapılmıştır. Veri toplama, biyimsel analiz FS, AYU ve AA tarafından yapılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Zhu XX, Meng XY, Chen G, et al. Nesfatin-1 enhances vascular smooth muscle calcification through facilitating BMP-2 osteogenic signaling. *Cell Commun Signal*. 2024;22(1):488.
2. Dore R, Levata L, Lehnert H, Schulz C. Nesfatin-1: functions and physiology of a novel regulatory peptide. *J Endocrinol*. 2017;32(1):45-65.
3. Oh-I S, Shimizu H, Satoh T, Okada S, et al. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature*. 2006;443(7112):709-12.
4. Price CJ, Hoyda TD, Samson WK, et al. Nesfatin-1 influences the excitability of paraventricular nucleus neurones. *J Neuroendocrinol*. 2008;20(2):245-50.
5. Price CJ, Samson WK, Ferguson AV. Nesfatin-1 inhibits NPY neurons in the arcuate nucleus. *Brain Res*. 2008;16(1230):99-106.
6. Nakata M, Gantulga D, Santoso P, et al. Paraventricular NUCB2/nesfatin-1 supports oxytocin and vasopressin neurons to control feeding behavior and fluid balance in male mice. *Endocrinology*. 2016;157(6):2322-32.
7. Stengel A, Goebel M, Wang L, et al. Central nesfatin-1 reduces dark-phase food intake and gastric emptying in rats: differential role of corticotropin-releasing factor2 receptor. *Endocrinology*. 2009(150):4911-9.
8. Güldemir, H. Yüksek yağlı diyetin açlık-tokluk metabolizmasında görevli hormonlar ve nöropeptidler üzerine etkileri. *Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2018;27(3):239-344.
9. Pereira S, Cline DL, Glavas MM, et al. Tissue-specific effects of leptin on glucose and lipid metabolism. *Endocr Rev*. 2021;42(1):1-28.
10. Gray SM, Page LC, Tong J. Ghrelin regulation of glucose metabolism. *J Neuroendocrinol*. 2019;31(7):2705.
11. Li E, Shan H, Chen L, et al. OLFR734 mediates glucose metabolism as a receptor of asprosin. *Cell Metab*. 2019;30(2):319-328.
12. Xia L, Liu HY, Wang BY, et al. A review of physiological functions of orexin: From instinctive responses to subjective cognition. *Medicine (Baltimore)*. 2023;102(26):34206.
13. G. Cristina Brailoiu, Siok L. Dun, Eugen Brailoiu, et al. Nesfatin-1: sıçan beyninde g protein bağlantılı reseptörle dağılım ve etkileşim. *Endokrinoloji*. 2007;148(10):5088-509.
14. Gotoh K, Masaki T, Chiba S, et al. Nesfatin-1, corticotropin-releasing hormone, thyrotropin-releasing hormone, and neuronal histamine interact in the hypothalamus to regulate feeding behavior. *J Neurochem* 2013;124(1):90-9.
15. Bagosi Z, Csabafi K, Palotai M, et al. The effect of urocortin I on the hypothalamic ACTH secretagogues and its impact on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuropeptides*. 2014;48(1):15-20.
16. Benoussaidh A, Maurin Y, Rampin O. Possible neural mediation of the central effects of oxytocin on uterine motility. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;289(3):798-804.
17. Pan W, Hsueh H, Kastin A J. Nesfatin-1 crosses the blood-brain barrier without saturation. *Peptides*. 2007;28(11):2223-8.
18. Paxinos, G, Watson, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 6th edn. Journal of Anatomy. New York: Academic Press.
19. Darambazar G, Nakata M, Okada T, et al. Paraventricular NUCB2/nesfatin-1 is directly targeted by leptin and mediates its anorexigenic effect. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;456(4):913-8.
20. Çelik F, Belviranlı M, Okudan N. Circulating levels of leptin, nesfatin-1 and kisspeptin in postmenopausal obese women. *Arch Physiol Biochem*. 2016; 122(4):195-199
21. Li ZL, Xu L, Sun XR, Guo FF, Gong YL, Gao SL (2013). Central nesfatin-1 influences the excitability of ghrelin-responsive gastric distension neurons in the arcuate nucleus and reduces gastric motility in rats. *Eur J Neurosci* 38:3636-43.
22. Inhoff T, Mönnikes H, Noetzel S, Stengel A, Goebel M, Dinh QT, Riedl A, Bannert N, Wissner AS, Wiedenmann B, Klapp BF, Taché Y, Kobelt P (2008). Desacyl ghrelin inhibits the orexigenic effect of peripherally injected ghrelin in rats. *Peptides* 29:2159-68.
23. Gök Yurtseven D, Minbay Z, Eyigör Ö (2019). Nesfatin-1 ve oreksin a nöronları arasındaki etkileşimin immünohistokimyasal olarak araştırılması. *Uludağ Tıp Derg*. 45: 243-249.