

ÖZGÜN ARAŞTIRMA

Nesfatin-1 ve Oreksin A Nöronları Arasındaki Etkileşimin İmmünohistokimyasal Olarak Araştırılması*

Duygu GÖK YURTSEVEN¹, Zehra MİNBAY², Özhan EYİGÖR²

¹ SANKO Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Gaziantep.

² Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

ÖZET

Nesfatin-1 besin alımını baskılayan, oreksin A ise tetikleyen birbirine zıt etkili iki peptiddir. Bu peptidler hipotalamusta yerleşik olan nöron grupları tarafından sentezlenmekte ve salıverilmektedir. Çalışmamız kapsamında, besin alımının düzenlenmesinde rol oynayan bu iki önemli peptiderjik sistemin birbirleri üzerindeki olası etkileşimi immünohistokimyasal yöntemlerle araştırılmıştır. Bu amaca yönelik olarak, ilgili peptidlerin deneklere verilmesi sonucu diğer peptidi sentezleyen nöronlardaki aktivasyon değişiklikleri incelenmiştir. Bir transkripsiyon faktörü olan c-Fos proteininin yanı sıra, iki farklı hücre içi yolağın aktivasyon belirteci olan fosforile STAT5 (sinyal çevirmicileri ve transkripsiyon aktivatörleri) ve fosforile CREB (c-AMP-yanıtlı element bağlayıcı protein, p-CREB) immün reaktivitesinin varlığı, nöronal aktivasyonun belirlenmesinde kullanılmıştır. Çalışmalarda hipotalamusun supraoptik çekirdeklerinde lokalize nesfatin nöronları ile lateral hipotalamusta lokalize oreksin A nöronları incelenmiştir. Çalışmaların sonucunda nesfatin-1 nöronlarına ait aksonların, oreksin A nöronları üzerinde sinaps oluşturabileceğini düşündürecek şekilde sonlanmalar yaptığı görülmüştür. Ancak nesfatin-1 verilen deneklerin oreksin A nöronlarında c-Fos, pCREB veya pSTAT5 proteinlerinin ekspresyonunda bir değişiklik görülmemiştir. Benzer şekilde oreksin A verilen deneklere ait nesfatin-1 nöronlarında da bu belirteçleri içeren yollara ait bir aktivasyon gözlenmemiştir. Sonuç olarak, nesfatin-1 nöronlarının oreksin A nöronlarıyla sinaps oluşturabileceği, nesfatin-1 ve oreksin A peptidlerinin birbiri üzerinde, c-Fos, CREB ve STAT proteinlerinin rol aldığı hücre içi yolları kullanarak aktive edici etkilerinin olmadığı, ancak her iki peptidi eksprese eden nöronlarda, bu yolların kullanımıyla farklı moleküllerin besin alımının kontrolü doğrultusunda düzenleyici etki gösterebilecekleri düşünülmüştür.

Anahtar Sözcükler: Nesfatin-1. Oreksin A. c-Fos. İmmünohistokimya. Sıçan.

Immunohistochemical Investigation of Interaction between Nesfatin-1 and Orexin A Neurons

ABSTRACT

Nesfatin-1 and orexin A are oppositely acting two peptides, while nesfatin-1 suppresses food intake, orexin A stimulates this function. These peptides are synthesized and secreted by neuron groups located in the hypothalamus. In this study, the possible interactions between these two important peptidergic systems that play a role in the regulation of food intake were investigated by using immunohistochemical methods. As a result of the administration of the related peptides to the animals, the activation changes in the neurons synthesizing the other peptides were investigated. In addition to the c-Fos protein which is a transcription factor, we used different cellular signal pathway activation markers such as phosphorylated STAT5 (signal transducers and transcription activators) as well as p-CREB (c-AMP-responsive element binding protein). In these studies, the nesfatin neurons that are localized in the hypothalamic supraoptic nuclei and orexin neurons that are localized in the lateral hypothalamus were examined. The results showed that the nesfatin-1 axons are found to be juxtapositioned on the orexin neurons in order to form a possible synapse. However expression pattern of the c-Fos, pCREB or pSTAT5 proteins in the orexin A neurons showed no difference following the nesfatin-1 injections. Similarly no activation was assessed in the nesfatin-1 neurons after orexin administration. In conclusion, it is suggested that the nesfatin-1 neurons may form synaptic interactions with orexin A neurons, these two neurons cannot activate each other through c-Fos, CREB or STAT proteins, however other molecules may use these pathways in order to regulate these neurons as well as the food intake mechanism.

Key Words: Nesfatin-1. Orexin A. c-Fos. Immunohistochemistry. Rat.

Geliş Tarihi: 25 Temmuz 2019

Kabul Tarihi: 27 Ağustos 2019

* 15. "International Congress of Histochemistry and Cytochemistry" kongresinde poster bildiri olarak sunulmuştur (18-21 Mayıs 2017, Antalya).

Dr. Özhan EYİGÖR
Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Bursa.
Tel.: 0533 517 78 09
E-posta: oeyigor@uludag.edu.tr

Hipotalamus, çok sayıda nöropeptid ve nörotransmitter sistemin yer aldığı ve organizmanın farklı işlevlerinin düzenlendiği merkezi sinir sistemi bölümüdür. İştahın kontrol edilmesi ve enerji homeostazisinin düzenlenmesi bu işlevler arasındadır ve son yıllarda çok sayıda çalışma bu fonksiyonların düzenlenmesinde yer alan faktörlerin ve nöronal sinyal yollarının belirlenmesine odaklanmıştır. Nesfatin-1 2006 yılında endojen bir protein olarak keşfedilmiş, 82 amino asite sahip, homeostatik beslenmenin kontrolünde rol oynayan

yan anoreksijenik bir peptidtir¹. Yapılan çalışmalarda bu yeni peptidin, periferik ya da merkezi yolla deneklere uygulandığında tokluğu indüklediği ve vücuda besin alımını güçlü bir şekilde engellediği gösterilmiştir²⁻⁵. Etkileri dolayısıyla “tokluk molekülü” olarak da adlandırılan nesfatin-1, ilk defa hipotalamus ve soliter traktusta (NTS) yerleşik nöronlarda belirlenmiştir¹.

NEFA/nükleobindin2 (NUCB2) prekürsör proteininden türeyen nesfatin peptidleri içerisinde, özellikle nesfatin-1’in besin alımı üzerindeki baskılayıcı etkisi gösterilmiştir. Wistar cinsi erkek sıçanlarda yapılan doz bağımlı çalışmalarda, bu molekülün intraserebroventriküler (i.c.v.) enjeksiyonu ile vücutta yiyecek alımının ve vücut ağırlığının azaldığı gösterilmiştir¹. Fareler^{6,7}, sıçanlar^{8,9,10} ve kırmızı balık (goldfish)¹¹ üzerinde yapılan çoğu araştırmada ise, nesfatin-1’in üçüncü, dördüncü ve lateral beyin ventriküllerine, sisterna magna’ya, hipotalamik çekirdeklerden paraventriküler çekirdek (PVN), lateral hipotalamik alan (LHA) ve de dorsal vagal komplekse (DVC) yapılan düşük dozdaki (5-20 pmol) i.c.v. enjeksiyonlarının sonucunda nesfatin-1’in anoreksijenik etkilerinin olduğu bildirilmiştir^{12,13}.

Nesfatin-1’in besin alımını kontrol eden yolaktaki santral etkilerinin yanında periferik etkileri de son zamanlarda yoğun araştırma konusu olmuştur. Nesfatin-1’in periferik uygulanması sonrasında kan-beyin bariyerini geçtiği, dolaşımdaki nesfatin-1’in plazmadan parankima içine doğru olan difüzyonu sonrasında beyindeki beslenme merkezlerini doğrudan etkileyebildiği gösterilmiştir^{14,15}.

Oreksin peptidleri (oreksin A ve B) açlık durumlarında artan ve besin alımı yollarını tetikleyen bir peptid olarak ilk kez 1998 yılında tanımlanmıştır¹⁶. Besin alımını tetikleyici etkilerinin yanı sıra oreksinlerin uyanıklığın devamı, nöroendokrin, kardiyovasküler ve kognitif fonksiyonlardaki etkileriyle çeşitli hipotalamik kontrol mekanizmalarında yer aldıkları belirlenmiştir^{17,18,19}. Hipotalamusta yerleşik nöronlar tarafından sentezlenen oreksinlerin hem hipotalamus içerisinde hem de hipofiz üzerinde nöroendokrin etkilerini gösterdikleri bildirilmiştir²⁰. Oreksinerjik nöronların büyük çoğunluğunun lateral hipotalamus/perifornikal alanda yerleşik olduğu gösterilmiştir. Yiyecek kısıtlamasıyla oluşan hipoglisemide oreksin A nöronlarının aktive olması (c-Fos ekspresyonu pozitif) bu nöronların besin alımı üzerine etkilerini teyit etmiştir²¹. Oreksinlerin merkezi veya sistemik uygulamalarıyla yapılan araştırmalar, çok sayıdaki farmakolojik etkilerini göstermesi açısından önemlidir. Oreksin-A peptidinin i.c.v. uygulanmasının deneklerde besin alımını artırdığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir^{22,23}.

Bir transkripsiyon faktörü olan c-Fos proteini, uyarı alan bir nöronda çok hızlı olarak sentezlenip çekirdeğe translokale olarak nöronda genetik aktivasyonu başlatır. Bu işlevi nedeniyle aktive olan nöronların belirlenmesinde bir belirteç olarak kullanılmaktadır²⁴.

Benzer şekilde, uyarı sonrasında genetik aktivasyona yol açan, ancak farklı hücre içi yolların aktivasyonu ile fosforillenerek nöron çekirdeğinde lokalize olan STAT (sinyal çevrimcileri ve transkripsiyon aktivatörleri)^{25,26} ve CREB (c-AMP-yanıtlı element bağlayıcı protein) proteinleri de nöronal aktivasyonu belirlemede belirteç olarak kullanılmaktadır²⁷.

Bu çalışmada, besin alımını baskılayan nesfatin-1 ile besin alımını uyarıyan oreksin-A nöronlarının birbirleri üzerindeki direkt etkileri araştırılmıştır. Nesfatin-1 peptidi verilmiş deneklerde oreksinerjik nöronların aktivitesindeki değişiklikler ile oreksin A peptidi verilmiş deneklerde nesfatin-1 nöronlarının aktivitesindeki değişiklikler değerlendirilmiştir. Nöronal aktivasyonun immünohistokimyasal olarak belirlenebilmesi için çekirdekte lokalize c-Fos, pSTAT5 veya pCREB proteinlerinin varlığının incelenmesi temel yaklaşım olarak kullanılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Deney Hayvanlarının Hazırlanması

Çalışma, Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu’nun (HADYEK) 15.07.2014 tarih ve 2014-10/02 sayılı kararı ile uygun bulunmuştur. Çalışmada, Üniversitemiz Deney Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi’nden temin edilen Sprague Dawley cinsi 250-300 gr ağırlığındaki erişkin dişi ve erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanların bulunduğu ortam ısısı 20-24 C° olacak şekilde sabit tutulup, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık (07.00-19.00 arası aydınlık) döngüsüyle çalışıldı ve hayvanlar ad libitum olarak su ve yemle beslendi. Her birinde 5’i erkek 5’i dişi olmak üzere toplam 10 deneğin bulunduğu 3 grup oluşturuldu.

1. Kontrol grubu (n=10): Her deneğe 300 µl intraperitoneal (i.p.) fizyolojik tuzlu su enjeksiyonu yapıldı.
2. Oreksin A grubu (n=10): Nesfatin-1 nöronlarının olası aktivasyonunu görmek için deneklere 50 µg/kg i.p. oreksin A enjeksiyonu yapıldı.
3. Nesfatin-1 grubu (n=10): Oreksin A nöronlarının olası aktivasyonunu görmek için deneklere 50 µg/kg i.p. nesfatin-1 enjeksiyonu yapıldı.

Çalışmada kullanılan dozların belirlenmesi amacıyla yapılan ön çalışmada, deneklere 5, 10 veya 50 µg/kg oreksin-A ya da 10, 20 veya 50 µg/kg nesfatin-1 enjeksiyonu yapıldı. Enjekte edilen dozlar arasında nöronal aktivasyon açısından son denenen yüksek dozların en uygun olduğu belirlendi ve çalışmada bu dozlar kullanıldı. Tüm enjeksiyonlar saat 09:00-11:00 arasında yapıldı. Enjeksiyonları yapılan tüm deneklerin, son enjeksiyonlarından 90 dk. sonra derin eter anestezisi altında toraksları açılarak aortaya kateter yerleştirildi. Sonrasında denekler 0,13 M Sorenson’un fosfat tam-

Nesfatin-1 ve Oreksin A Etkileşimi

ponu ile hazırlanan %4 paraformaldehitin kullanıldığı transkardiyak perfüzyon fiksasyon yöntemi ile sakrifiye edildi ve beyinleri çıkartıldı. Paraformaldehitte tüm gece post-fiksasyona bırakılan bu beyinlerden vibratom cihazı ile hipotalamusun rostra-kaudal ekseninin tamamını içerecek şekilde 5 seri halinde 50 µm kalınlığında koronal kesitler toplandı. 0,05 M'lik Tris-HCl tamponu ile 3 kez yıkamanın ardından fiksatiften arındırılan kesitler kriyoprotektan madde içinde -20 C°'de saklandı. Daha sonra bu kesitlere aşağıda basamakları ayrıntılı bir şekilde verilen ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi ile işaretlemeler yapıldı.

İkili İndirekt İmmünoperoksidaz Yöntemi:

İmmünohistokimyasal işlemlerin tümü cam viallerde yüzen kesitlere uygulandı. Kesitlerin inkübasyon ve yıkama işlemleri, orbital sallayıcı yardımı ile uygun ajitasyonla gerçekleştirildi. Protokollerdeki ana basamaklar arasında (non-spesifik bağlanmayı bloklama ile primer antikor inkübasyonu arası hariç), kesitler 0.05 M Tris-HCl solüsyonu (pH 7.6) ile yıkandı. Non-spesifik bağlanmayı bloklamak ve tüm antikorları dilüe etmek için bloklayıcı tampon olarak %10 normal at serumu (bloklayıcı serum) kullanıldı.

Çalışma için seçilen antikorların özgünlüğünü değerlendirmek için boyamalar sırasında negatif kontrol kesitleri kullanıldı. Kontrol çalışmalarında esas immünohistokimyasal boyamaya eş zamanlı olarak kontrol boyaması yapıldı ve bu boyama protokolünde primer antikor yerine normal bloklayıcı serum kullanıldı. Kontrol boyamaları değerlendirildiğinde hiçbir işaretlenme gözlenmedi. Bu sonuç antikorun özgün işaretlemesinin kontrolü olarak değerlendirildi.

Nesfatin-1 ve Oreksin A İmmünohistokimyası:

Kesitler oda sıcaklığına geldikten sonra kriyoprotektanın arındırılması için Tris-HCl tamponunda 3x10 dk. yıkandı. Non-spesifik bağlanmanın bloklanması amacıyla, %10'luk normal at serumu (Tris-HCl tamponunda hazırlanmış) ile 2 saat süreyle inkübe edildi. Bloklayıcı serum aşamasından sonra, tavşan anti-nesfatin-1 primer antikor (1:20.000, Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA) ile oda sıcaklığında inkübe edildi. Tris-HCl tamponu ile 3x10 dk. yıkamanın ardından, kesitler biyotin konjuge eşek anti-tavşan IgG (1:300) sekonder antikor solüsyonunda 2 saat bekletildi. Tüm antikorların dilüsyonları bloklayıcı tampon kullanılarak gerçekleştirildi. Sekonder antikorlardan arındırılan kesitler, avidin-biyotin kompleksi (ABC Elite Kit, Vector Labs, Burlingame, CA) solüsyonunda (100 µl A, 100 µl B solüsyonu/-5 ml Tris-HCl tamponu) 60 dk. süreyle inkübe edildi. Yıkamanın ardından, substrat kromojen solüsyonu DAB (diaminobenzidine) 4 dk. süreyle uygulandı ve antikor-antijen-enzim kompleksi sitoplazmada görünür hale getirildi. Yıkanan kesitler fırça yardımıyla lamlara alınıp kurutuldu ve DPX ile kapatıldı. Oreksin A immünohistokimyasında ise;

kesitler keçi anti-oreksin-A (1:2000, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) primer antikoruyla tüm gece oda sıcaklığında bekletildi ve sonrasında yukarıda basamakları ayrıntılı şekilde verilen aynı prosedür ile boyama gerçekleştirildi.

c-Fos, p-STAT-5 ve p-CREB İmmünohistokimyası:

Nesfatin-1 ve Oreksin A nöronlarındaki hücre içi aktivasyon yolağını/yolaklarını belirlemek için c-Fos, STAT-5 ve p-CREB transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarına ayrı ayrı bakıldı. Bunun için her üç transkripsiyon faktörünün immünohistokimyasına nesfatin-1 veya oreksin A immünohistokimyasından önce başlandı. Sadece pSTAT5 primer antikor inkübasyonu yapılacak olan kesitlere, antijeninin geri kazandırılması amacıyla antijen "retrieval" (AR=1mM EDTA, pH=8.0, 80 C°, 30 dk.) işlemi uygulandı. 15 dk. oda sıcaklığında aynı solüsyon içinde bekletilen AR'li kesitlere, endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için 30 dk. süreyle %1'lik H₂O₂ (%40'luk metanolde hazırlanmış) muamelesi yapıldı. Non-spesifik bağlanmanın bloklanması amacıyla, %10'luk normal at serumu ile kesitler 2 saat süreyle inkübe edildi. Bloklayıcı serum aşamasından sonra, tavşan anti-pSTAT5 (1:2.000, 6 gece, 4 C°, Try694 Cell Signaling Technology), tavşan anti-c-Fos (1:10.000, 1 gece, oda sıcaklığı, Oncogene, Cambridge, MA) ve tavşan anti-pCREB (1:5.000, 1 gece, oda sıcaklığı, Millipore) primer antikorlarıyla kesitler inkübe edildi. Sekonder antikor inkübasyonu için biyotin konjuge eşek anti-tavşan IgG (1:300, oda sıcaklığı) antikor solüsyonunda 2 saat bekletildi. ABC solüsyonunda 1 saatlik inkübasyonun ardından DAB ve nikel amonyum sülfatın kullanıldığı kromojen solüsyonuyla (2 gr Ni, 25 mg DAB, 2.6 µl H₂O₂/ 100 ml Tris-HCl tamponunda) immünokompleks görünür hale getirildi. Tris-HCl tamponunda 3x10 dk. yıkanan kesitlere yukarıda basamakları açıklanan nesfatin-1 ya da oreksin A immünohistokimyası uygulandı.

Preparatların İncelenmesi ve Analizi

Nesfatin-1 nöronları SON'de, oreksin A nöronları lateral hipotalamusta değerlendirilmiştir. İmmünoperoksidaz boyaması yapılan kesitlerin görüntüleri, Olympus BX-50 fotomikroskopta 40X objektifi kullanılarak dijital kamera (Olympus DP71 CCD color camera, 1,5 million pixel) ile bilgisayar ekranına aktarıldı ve fotoğraflandı. İmmün işaretlemelerde, beyin kesitleri atlasına²⁸ göre belirlenen koordinatlar arasındaki (SON için bregma -0.48 mm ile -1.44 mm, LH için bregma -2.40 mm ile -3.24 mm) kesitler kullanıldı.

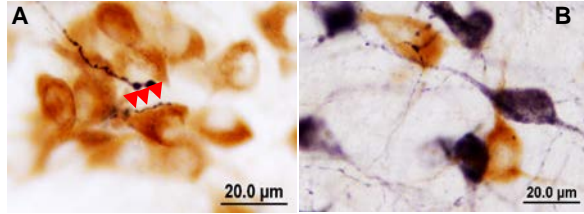
Sitoplazmada eksprese olduğu bilinen nesfatin-1 ve oreksin A proteinleri DAB kromojeni kullanılarak renklendirildi ve oluşturulan komplekse ait sinyaller ışık mikroskopunda kahverengi olarak belirlendi. Çekirdekte lokalize olan c-Fos, p-CREB ve p-STAT5

proteinleri ise, nikel amonyum sülfatla zenginleştirilmiş Ni-DAB (diaminobenzidin) kullanılarak görülür hale getirildi. Işık mikroskopunda bu reaksiyonun sonucu, koyu maviden siyaha değişen renk tonlarında izlendi. Hem çekirdekte hem de sitoplazmada işaretlenme olan nöronlar ikili işaretlenmiş olarak kabul edildi.

Bulgular

Peptidlerin ilgili nöronlara doğrudan innervasyonları:

Nesfatin-1 peptidini eksprese eden nöronların (kahverengi nöronlar) hücre gövdelerinde, oreksin A-pozitif nöronların pre-sinaptik sinir sonlanmaları jukstapozisyonel bir şekilde ayırt edilirken (Şekil 1A), Oreksin A nöronlarının hücre gövdelerinde benzer şekildeki sinaptik temas gözlenmemiştir (Şekil 1B).



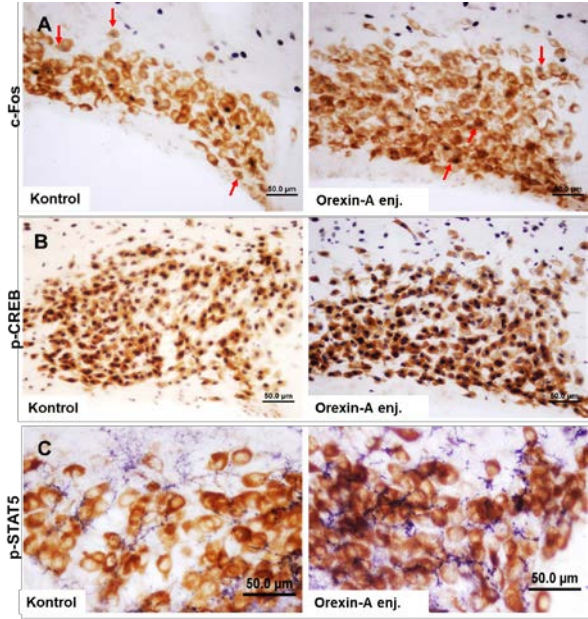
Şekil 1.

(A) Oreksin A-pozitif nöronların pre-sinaptik sonlanmaları (kırmızı ok başları), Nesfatin-1-pozitif nöronların (kahverengi sitoplazmik boyanma) hücre gövdelerinde bitişik olarak (juxta-position) izlenmektedir. (B) Oreksin A-pozitif nöronlar siyah sitoplazmik boyanmaları ile Nesfatin-1-pozitif nöronlar ise kahverengi boyanmaları ile ayırt edilmektedir.

Oreksin A enjeksiyonunun nesfatin-1 nöronları üzerindeki etkisi

Bu iki peptidin birbiri üzerindeki olası etkilerini araştıran çalışmalarda öncelikle nesfatin-1 ve oreksin A içeren nöronlarda c-Fos proteininin ekspresyonu araştırılmıştır. Periton içine yapılan oreksin A peptidi enjeksiyonu sonrasında gerçekleştirilen ikili immünohistokimyasal boyamalarda nesfatin-1 nöronlarında c-Fos ekspresyonunda kontrol grubuna göre bir fark görülmemiştir (Şekil 2A). Bu çalışmalarda, hem enjeksiyon hem de kontrol grubundaki yüzde birin altındaki nöronda ikili işaretlenme görüldüğü için herhangi bir istatistiksel değerlendirme yapılamamıştır.

Oreksin A enjeksiyonu sonrasında nesfatin-1 nöronları fosforile-CREB (p-CREB) ekspresyonu açısından değerlendirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda hem kontrol grubu deneklerde hem de enjeksiyon grubu deneklerde supraoptik çekirdekte yer alan bütün nesfatin-1 nöronlarının p-CREB eksprese ettikleri, dolayısıyla oreksin A enjeksiyonunun spesifik bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Şekil 2B).



Şekil 2.

Supraoptik hipotalamik çekirdekte, oreksin A enjeksiyonundan sonra nesfatin-1 nöronlarında (A) c-Fos, (B) p-CREB ve (C) p-STAT5 ekspresyonu. (A) Hem kontrol hem de oreksin-A enjekte edilen gruplarda, sadece birkaç nesfatin-1 nöronu c-Fos-pozitif olarak izlendi (kırmızı oklar). (B) Tüm nesfatin-1 nöronları p-CREB-pozitif olarak tespit edildi. (C) p-STAT5 immünreaksiyonu, nesfatin-1-pozitif nöronlarda görülmedi.

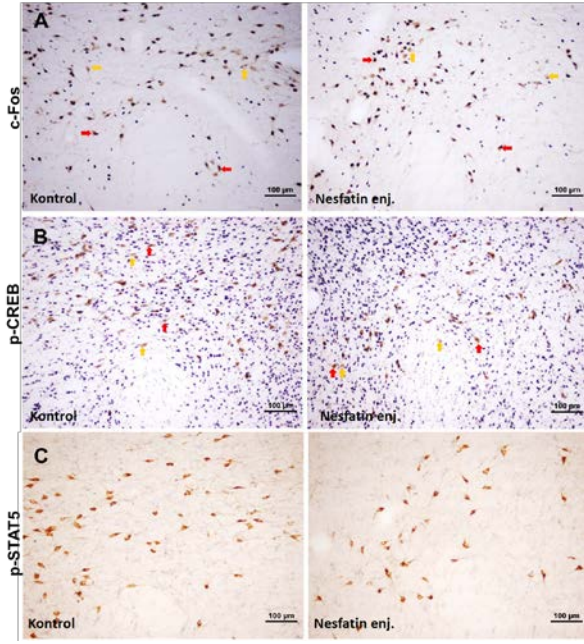
Oreksin A verilen deneklerdeki fosforile-STAT5 ekspresyonu değerlendirildiğinde, ne kontrol grubunda ne de enjeksiyon grubunda SON'de yerleşik nesfatin-1 nöronlarında pSTAT5 immünreaksiyonu görülmemiştir (Şekil 2C).

Nesfatin-1 enjeksiyonunun oreksin A nöronları üzerindeki etkisi

Nesfatin-1 peptidi enjeksiyonu sonrası lateral hipotalamusta yer alan oreksin A immünoreaktif nöronlar değerlendirildiğinde, bu nöronların bir grubunun (yaklaşık %50'si) c-Fos'u eksprese ettiği belirlenmiştir (Şekil 3A). Ancak kontrol gruplarında da benzer oranda oreksin A nöronunun c-Fos-pozitif olduğu görülmüştür (Şekil 3A). Nesfatin-1 enjeksiyonu oreksin A nöronlarında artan bir aktivasyona neden olmamıştır. Nesfatin-1'in oreksin A nöronlarında p-CREB fosforillenmesi üzerine etkisini incelediğimizde, oreksin A nöronlarının hem kontrol hem de nesfatin-1 enjeksiyonlu gruplarda yaklaşık %60 oranında p-CREB içerdikleri belirlenmiştir (Şekil 3B). Bu sonuç nesfatin-1 peptidinin spesifik olarak oreksin A nöronlarını etkilemediğini göstermiştir.

Hem nesfatin-1 enjeksiyonu yapılmış hem de kontrol deneklerdeki pSTAT5 ekspresyonu incelendiğinde, her iki gruptaki oreksin A nöronlarının çekirdeklerinde pSTAT5 ekspresyonuna rastlanamamıştır (Şekil 3C).

Nesfatin-1 ve Oreksin A Etkileşimi



Şekil 3.

Lateral hipotalamusta nesfatin-1 enjeksiyonundan sonra, oreksin A nöronlarında (A) c-Fos, (B) p-CREB ve (C) p-STAT5 ekspresyonu. (A-B) c-Fos-negatif ve p-CREB-negatif oreksin A nöronları (sarı ok) ve c-Fos-pozitif ve p-CREB-pozitif oreksin A nöronları (kırmızı ok). (C) p-STAT5 immünreaktivitesine sahip olmayan oreksin A nöronları görülmektedir.

Tartışma ve Sonuç

Çalışmamızda, besin alımında önemli yeri olan ve karşılıklı zıt etki gösteren nesfatin-1 ve oreksin A peptidlerinin^{1,29} birbiri üzerindeki etkileşiminin varlığı araştırılmıştır. Nesfatin-1 nöronlarına ait aksonal sonlanmaların oreksin A nöronları üzerinde belirlenmiş olması bu iki nöron arasında sinaptik bir ilişkinin varlığını düşündürmüştür. Ancak nesfatin-1 peptidi verilen deneklerde, lateral hipotalamusta lokalize oreksin A nöronlarında c-Fos ekspresyonu kontrol denekler seviyelerine göre bir farklılık göstermemiştir. Bu sonuç nesfatin-1'in direkt olarak oreksin A nöronlarını c-Fos aracılığı ile aktive edici bir etki göstermediğini düşündürmektedir. Ancak çalışma sonuçları daha önceki bulgularımızı desteklerken³⁰, oreksin A nöronlarının c-Fos'u eksprese ettiklerini teyit etmiş ve dolayısıyla oreksin A nöronları üzerinde farklı moleküllerin var olan olası etkilerinin araştırılmasında c-Fos'un belirteç olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

CREB hipotalamik nöronların regülasyonunda yer alan^{31,32} önemli bir transkripsiyon faktörüdür. pCREB immünreaksiyonunun nöron çekirdeklerinde belirlenmesinin nöronal aktivasyon belirteci olarak kullanıldığı çalışmalarda, östrojen uygulamasına bağlı olarak hipotalamik çekirdeklerde aktive olan nöron sayısının arttığı³³, melanosit-stimüle edici hormon (MSH) uygu-

lanan deneklerde tirotropin-saliverici hormon (TRH) ve kortikotropin-saliverici hormon (CRH) nöronlarında aktivasyonun görüldüğü (pCREB pozitifliği) bildirilmiştir³⁴. Açlık durumunda da oreksin A nöronlarında pCREB pozitifliğinin arttığı ve bu artışın erkek deneklerle karşılaştırıldığında dişi deneklerden daha fazla olduğu bildirilmiştir³⁵. Çalışmamız kapsamında elde edilen sonuçlar nesfatin-1 enjeksiyonları sonrasında oreksin A'yı eksprese eden çoğu nöronda CREB proteininin artışı yönündedir. Ancak nesfatin-1 enjeksiyonlarının CREB fosforillenmesini değiştirmedigi, kontrol deneklerle enjeksiyon yapılmış denekler arasında pCREB ekspresyonu açısından bir farklılığın olmadığı görülmüştür. Ancak bu bulgu oreksin A nöronlarında genetik işlevlerin düzenlenmesinde, nesfatin-1 uyarısında olmasa da, farklı başka uyarılarda CREB proteinini içeren yolların rol oynayabileceğini göstermektedir. Bir diğer yolak belirteci olan pSTAT5 ekspresyonu nesfatin-1 enjeksiyonu sonrası oreksin A nöronlarında tespit edilememiştir. Bu, iki yaklaşımla açıklanabilir: oreksin A nöronlarında yer alan STAT5 proteini nesfatin-1 uyarısı sonrasında fosforile olmamakta ve aktif forma geçmemekte; ya da STAT5 proteini oreksin A nöronları tarafından eksprese edilmemektedir. Literatürde de oreksin A nöronlarında STAT5'in ya da diğer STAT proteinlerinin ekspresyonunu bildiren bir rapor bulunmamaktadır. Ancak STAT proteinlerinin bazı nöroendokrin nöronlarda sentezlendiğini ve belirli uyarılarla fosforile olduklarını gösteren çalışmalar mevcuttur^{36,37,38}.

Oreksin A enjeksiyonunun nesfatin-1 nöronları üzerindeki etkisi de benzer nitelikler taşımaktadır. Oreksin A verilen deneklerde SON'de yerleşik nesfatin-1 nöronlarında c-Fos aktivasyonu görülmemiştir. Çalışmamızda genellikle SON'de yerleşik nesfatin-1 nöronları öncelikli olarak incelenmiş olmasına rağmen, ek olarak arkuat çekirdekte ve diğer hipotalamik alanlarda yerleşik nesfatin-1 nöronları da incelenmiş ve bu alanlardaki nesfatin-1 nöronlarında da oreksin A etkisine bağlı bir c-Fos ekspresyonu görülmemiştir. pCREB ekspresyonunun hem kontrol hem de enjeksiyon gruplarında hemen hemen tüm nesfatin-1 nöronlarında görülmesi, CREB yolağının bu nöronların bazal işleyişinde bile aktif olduğunu göstermektedir. Bu bulgu bizim hipotezimizi desteklemiyor olsa da, literatür için önem taşımaktadır. Oreksin A enjeksiyonu sonrasında, nesfatin-1 nöronlarındaki pCREB varlığını gösteren bu immünohistokimyasal bulgu, literatürde ilk kez rapor edilmektedir. Supraoptik çekirdekte lokalize nesfatin-1 nöronlarında oreksin A enjeksiyonu sonrası pSTAT5 varlığının görülmemesi, oreksin A'nın nesfatin-1 nöronlarını STAT üzerinden etkilemediğini göstermektedir. İlginç olarak pSTAT5 varlığı periventriküler çekirdekte yer alan bazı nesfatin-1 nöronlarında görülmüştür. Ancak bu ekspresyon paterni kontrol ve enjeksiyon deneklerinde farklılık göstermemiştir. Bu sonuç, nesfatin-1 nöronlarının STAT5 proteinini eksprese ettiklerini ve STAT5'in bu

nöronlarda fosforile olabildiğini literatürde ilk kez göstermesi açısından önem taşımaktadır. Ancak hipotezimiz olan, oreksin A peptidinin nesfatin-1 nöronlarını STAT fosforilizasyonunu içeren bir yolak aracılığıyla aktive etmesi düşüncesini desteklememektedir.

Çalışmamızın sonucunda nesfatin-1 ve oreksin A peptidlerinin birbirleri üzerinde aktive edici etkisinin olmadığını, dolayısıyla besin alınımı sonrasında artan nesfatin-1 peptidinin oreksin A nöronları üzerinde ya da açlık sonrasında artan oreksin A peptidinin nesfatin-1 nöronları üzerinde direkt/indirekt etkisinin olmadığını göstermiştir. Bu sonuç, hipotezimizi destekler nitelikte olmamasına rağmen, literatüre katkı sağlamaktadır. Bu anlamda değerlendirildiğinde, besin alınımının düzenlenmesi gibi hayati bir hipotalamik homeostazis mekanizmasına ait iki çok önemli faktörün, bu düzenlenimde karşılıklı etkileşim ile bir rol oynamadıkları, ya da çalışmamız kapsamında olmayan farklı yollarla nöronal aktivasyon gösterebilecekleri düşünülmüştür. Bu noktada önemli bir olasılık olarak periton içerisine enjekte edilen peptidlerin hipotalamusa ulaşamıyor olması düşünülebilir de, literatürde nesfatin-1 peptidinin kan beyin bariyerini geçebildiğine dair raporlar mevcuttur^{39,40}. Benzer şekilde oreksin A peptidinin de kandan merkezi sinir sistemi alanlarına difüzyonla geçtiği gösterilmiştir⁴¹. Nesfatin-1 nöronal sonlanmalarının oreksin A nöronları üzerinde var olduğu, literatürde ilk kez gösterilmiştir. Bu ilişkinin fonksiyonel sinaptik bir yapı oluşturup oluşturmadığının belirlenmesi için, ileri immünohistokimyasal ve/veya immüno elektronmikroskopik çalışmalara gereksinim vardır. Ancak bu tür bitişik olarak (juxtaposition) gözlenen ikili işaretlenmiş akson sonlanması-nöron gövdesi birlikteliğinin çoğunlukla sinaps oluşumuna işaret ettiği bilinmektedir. Bu kapsamda değerlendirildiğinde, en azından nesfatin-1 nöronlarının oreksin A nöronlarıyla sinaps yaptığı ve direkt olarak etkileşime girebileceği değerlendirilebilir.

Sonuç olarak, nesfatin-1 nöronlarının oreksin A nöronlarıyla sinaps oluşturabileceği, nesfatin-1 ve oreksin A peptidlerinin birbiri üzerinde, c-Fos, CREB ve STAT proteinlerinin rol aldığı hücre içi yolları kullanarak aktive edici etkilerinin olmadığı, ancak her iki peptidi eksprese eden nöronlarda, bu yolların kullanımıyla farklı moleküllerin besin alınımının kontrolü doğrultusunda düzenleyici etki gösterebilecekleri düşünülmüştür.

Teşekkür

Bu makalede yer alan laboratuvarımıza ait sonuçlar, TÜBİTAK tarafından desteklenen 113S377 nolu proje kapsamında yapılan çalışmalardan elde edilmiştir.

Kaynaklar

- Oh I, Shimizu H, Satoh T, et al. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature* 2006;443:709-12.
- Stengel A, Tache Y. Nesfatin-1-Role as possible new potent regulator of food intake. *Regul Pept* 2010;163:18-23.
- Stengel A, Goebel M, Wang LX, Tache Y. Ghrelin, des-acyl ghrelin and nesfatin-1 in gastric X/A-like cells: Role as regulators of food intake and body weight. *Peptides* 2010;31:357-69.
- Shimizu H, Ohsaki A, Oh I, Okada S, Mori M. A new anorexigenic protein, nesfatin-1. *Peptides* 2009;30:995-8.
- Palasz A, Krzystanek M, Worthington J, et al. Nesfatin-1, a unique regulatory neuropeptide of the brain. *Neuropeptides* 2012;46:105-12.
- Atsuchi K, Asakawa A, Ushikai M, et al. Centrally administered nesfatin-1 inhibits feeding behaviour and gastroduodenal motility in mice. *Neuroreport* 2010;21:1008-11.
- Goebel M, Stengel A, Wang L, et al. Central nesfatin-1 reduces the nocturnal food intake in mice by reducing meal size and increasing inter-meal intervals. *Peptides* 2011;32:36-43.
- Chen X, Dong J, Jiang ZY. Nesfatin-1 influences the excitability of glucosensing neurons in the hypothalamic nuclei and inhibits the food intake. *Regul Peptides* 2012;177:21-6.
- Dong J, Guan HZ, Jiang ZY. Nesfatin-1 influences the excitability of glucosensing neurons in the dorsal vagal complex and inhibits food intake. *Plos One* 2014;9:e98967.
- Moreau JM, Ciriello J. Nesfatin-1 induces Fos expression and elicits dipsogenic responses in subfornical organ. *Behav Brain Res* 2013;250:343-50.
- Kerbel B, Unniappan S. Nesfatin-1 suppresses energy intake co-localises ghrelin in the brain and gut, and alters ghrelin, cholecystokinin and orexin mRNA expression in goldfish. *J Neuroendocrinol* 2012;24:366-7.
- Stengel A. Nesfatin-1-More than a food intake regulatory peptide. *Peptides* 2015;72:175-83.
- Stengel A, Taché Y. Role of NUCB2/Nesfatin-1 in the Hypothalamic Control of Energy Homeostasis. *Horm Metab Res* 2013;45:975-79.
- Pan WH, Hung HC, Kastin AJ. Nesfatin-1 crosses the blood brain barrier without saturation. *Peptides* 2007;28:2223-8.
- Price TO, Samson WK, Niehoff ML, et al. Permeability of the blood-brain barrier to a novel satiety molecule nesfatin-1. *Peptides* 2007;28:2372-81.
- de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, et al. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:322-7.
- Date Y, Ueta Y, Yamashita H, et al. Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:748-53.
- Stenberg D. Neuroanatomy and neurochemistry of sleep. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:1187-204.
- Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Yanagisawa M. To eat or to sleep? Orexin in the regulation of feeding and wakefulness. *Annu Rev Neurosci* 2001;24:429-58.
- Shirasaka T, Kunitake T, Takasaki M, Kannan H. Neuronal effects of orexins: relevant to sympathetic and cardiovascular functions. *Regul Pept* 2002;104:91-5.
- Ferguson AV, Samson WK. The orexin/hypocretin system: a critical regulator of neuroendocrine and autonomic function. *Front Neuroendocrinol* 2003;24:141-50.
- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, et al. Orexins and orexin receptors: A family of hypothalamic neuropeptides and G pro-

Nesfatin-1 ve Oreksin A Etkileşimi

- tein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 1998;92:573-85.
23. Lubkin M, Stricker-Krongrad A. Independent feeding and metabolic actions of orexins in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;253:241-5.
 24. Eriksson M, Ceccatelli S, Uvnäs-Moberg K, et al. Expression of Fos-related antigens, oxytocin, dynorphin and galanin in the paraventricular and supraoptic nuclei of lactating rats. *Neuroendocrinology* 1996;63:356-67.
 25. Bromberg J, Chen X. STAT proteins: Signal transducers and activators of transcription. *Methods in Enzymol* 2001;333:138-51.
 26. Bromberg J, Darnell JE. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 2000;19:2468-73.
 27. Lonze BE, Ginty DD. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 2002;35:605-23.
 28. Paxinos G, Watson C, (eds). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 6th edition. Elsevier Academic Press: Amsterdam; 2009.
 29. Ferguson, AV, Samson, WK. The orexin/hypocretin system: a critical regulator of neuroendocrine and autonomic function. *Front Neuroendocrinol* 2003;24:141-50.
 30. Eyigor O, Minbay Z, Cavusoglu I. Activation of orexin neurons through non-NMDA glutamate receptors evidenced by c-Fos immunohistochemistry. *Endocrine* 2010;37:167-72.
 31. Kageyama K, Suda T. Transcriptional Regulation of Hypothalamic Corticotropin-Releasing Factor Gene. *Vitam Horm* 2010;82:301-17.
 32. Lechan RM, Fekete C. Role of melanocortin signaling in the regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis. *Peptides* 2006;27:310-25.
 33. Gu GB, Rojo AA, Zee MC, Ju Y, Simerly RB. Hormonal regulation of CREB phosphorylation in the anteroventral periventricular nucleus. *J Neurosci* 1996;16:3035-44.
 34. Sarkar S, Legradi G, Lechan RM. Intracerebroventricular administration of alpha-melanocyte stimulating hormone increases phosphorylation of CREB in TRH and CRH-producing neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res* 2002;945:50-9.
 35. Funabashi T, Hagiwara H, Mogi K, Mitsushima D, Shinohara K, Kimura F. Sex differences in the responses of orexin neurons in the lateral hypothalamic area and feeding behavior to fasting. *Neurosci Lett* 2009;463:31-4.
 36. Ladyman SR, Fieldwick DM, Grattan DR. Suppression of leptin-induced hypothalamic JAK/STAT signalling and feeding response during pregnancy in the mouse. *Reproduction* 2012;144:83-90.
 37. Brown RSE, Piet R, Herbison AE, Grattan DR. Differential Actions of Prolactin on Electrical Activity and Intracellular Signal Transduction in Hypothalamic Neurons. *Endocrinology* 2012;153:2375-84.
 38. Severi I, Senzacqua M, Mondini E, Fazioli F, Cinti S, Giordano A. Activation of transcription factors STAT1 and STAT5 in the mouse median eminence after systemic ciliary neurotrophic factor administration. *Brain Res* 2015;1622:217-29.
 39. Pan WH, Hung HC, Kastin AJ. Nesfatin-1 crosses the blood brain barrier without saturation. *Peptides* 2007;28:2223-8.
 40. Price TO, Samson WK, Niehoff ML, Banks WA. Permeability of the blood-brain barrier to a novel satiety molecule nesfatin-1. *Peptides* 2007;28:2372-81.
 41. Kastin AJ, Akerstrom V. Orexin A but not orexin B rapidly enters brain from blood by simple diffusion. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;289:219-23.

