



**NESFATİNİN NORMAL ve STRES OLUŞTURULMUŞ
SIÇANLARDA KAN BASINCININ DÜZENLENMESİNE ETKİSİ**

Ceylan AYADA

**Mart
DENİZLİ - 2013**

**NESFATİNİN NORMAL ve STRES OLUŞTURULMUŞ
SIÇANLARDA KAN BASINCININ DÜZENLENMESİNE ETKİSİ**

**Pamukkale Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Doktora Tezi
Fizyoloji Anabilim Dalı**


Ceylan AYADA

Danışman: Prof. Dr. Günfer TURGUT


**Mart
DENİZLİ- 2013**

DOKTORA TEZİ ONAY FORMU


Ceylan AYADA tarafından, Prof. Dr. Günfer TURGUT yönetiminde hazırlanan “Nesfatinin Normal ve Stres Oluşturulmuş Sıçanlarda Kan Basıncının Düzenlemesine Etkisi” başlıklı doktora tezi tarafımızdan okunmuş kapsamı ve niteliği açısından bir Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Osman GENÇ
Jüri Başkanı


Prof. Dr. Günfer TURGUT
Jüri Üyesi (Danışman)


Prof. Dr. Sadettin ÇALIŞKAN
Jüri Üyesi


Prof. Dr. Sebahat TURGUT
Jüri Üyesi


Doç. Dr. Vural KÜÇÜKATAY
Jüri Üyesi

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 4.4.19 tarih ve 137-4 sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof. Dr. Z. Melek BOR KÜÇÜKATAY
Müdür

TEŞEKKÜR

Döndüğüm yollardan sonra doktora yapabileceğim umudum kalmamışken, bana inanarak yeniden umudun kapılarını açan değerli hocalarım **Prof. Dr. Günfer Turgut** ve **Prof. Dr. Sebahat Aydemir Turgut**'a; geç kalmış olduğum yeni başlangıcımda elimden tutan, yoluma ışık olan değerli hocam **Prof. Dr. Osman Genç**'e; doktoram süresince bilgi, birikim ve deneyimlerini cömertçe paylaşan değerli hocalarım **Prof. Dr. Vural Küçükataş** ve **Prof. Dr. Melek Bor Küçükataş**'a; tez çalışmam süresince bilime, hayata ve arkadaşlığa dair paylaşımları ile bana emek veren ve değer katan sevgili çalışma arkadaşlarım **Gülten Emmungil Erken**, **Zuhal Can Güçlü**, **Gülşah Demirkaya Gündoğdu** ve **Haydar Ali Erken**'e samimi ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ben umudumu kaybetmişken benden umudunu hiç kesmeyen, bana her an destek olan, gözümün içine bakan canım annem **Nevin Şenel**'e ve canım ablam **Elvan Ayada Gençaslan**'a; ders çalıştıran, yaşam koçum olan canım anneannem **Lütfiye Koplay Şenel**'e; sabırlı canım dedem **Hüseyin Şenel**'e; kol kanat geren dayılarım **Ferruh** ve **Erdoğan Şenel**, teyzem **Sevim Altın**'a; içimdeki çocuğu canlandıran birtanecik güzel gözlü teyzişim canım yeğenim **Ahmet Ege Gençaslan**'a ve **TÜM CANIM AİLEM**'e en içten minnetlerimi sunarım.

Bu tez, Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenen, 2011SBE005 nolu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Bu tezin yapılmasına Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Etik Kurulu tarafından onay verilmiştir (2010/026).

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırılmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

İmza :
Öğrenci Adı Soyadı : Ceylan AYADA

ÖZET

NESFATİNİN NORMAL VE STRES OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA KAN BASINCININ DÜZENLENMESİNE ETKİSİ

AYADA, Ceylan

Doktora Tezi, Fizyoloji A.D.

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Günfer Turgut

Mart 2013, 110 sayfa

Nesfatin merkezi ve periferik sinir sisteminde, periferik dokularda salgılanan ve homeostazisin düzenlenmesinde görev aldığı bildirilen bir peptittir. Kan beyin bariyerini her iki doğrultuda geçebilen ve literatürde beslenme üzerine olan etkileri daha detaylı olarak çalışılmış olan bu peptidin, diğer fizyolojik parametrelere etkisi ve etki mekanizmaları halen tam olarak aydınlığa kavuşturulamamıştır. Yapılmış olan bu çalışmada, normal ve kronik hareketsizlik stresi oluşturulmuş sıçanlarda, kronik periferik nesfatin-1 uygulamasının kan basıncına olan etkilerini araştırdık. Çalışmamızda, 3 aylık Wistar cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar K, S, K+N, S+N olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Deney başında ve sonunda hayvanların kan basınçları, vücut ağırlıkları ölçüldü. Çalışma bitiminde anestezisi altında sıçanlardan doku ve kan örnekleri toplandı. Kalp dokusu örneklerinden L-Tipi Ca^{+2} kanal $\alpha 1c$ alt birimi proteini ekspresyon düzeyinin belirlenmesi için Western Blot analizi yapıldı. ELISA yöntemi ile plazma örneklerinde anjiyotensinojen, ACE2, AngII, endotelin-1, eNOS, aldosteron, kortizol, nesfatin-1 düzeyleri çalışıldı. Elde edilen verilerin istatistiksel analizi için SPSS 16.0 programı kullanıldı. S+N grubunda K grubuna göre sıçanların vücut ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi. S+N ve K+N gruplarında K ve S gruplarına göre kan basıncı değerlerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı. K grubuna göre S+N grubunda L-Tipi Ca^{+2} kanal $\alpha 1c$ alt birimi proteini ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı. Stres grubuna göre K+N ve S+N gruplarında plazma anjiyotensinojen seviyelerinin ise istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi. K+N ve S+N gruplarında, S ve K gruplarına göre plazma ACE2 seviyelerindeki artış istatistiksel açıdan anlamlı olduğu tespit edildi. K grubuna göre S ve S+N gruplarında, plazma AngII seviyelerinin istatistiksel açıdan anlamlı olarak arttığı, sadece S grubunda ise plazma eNOS seviyesinin istatistiksel açıdan anlamlı olarak arttığı görüldü. Kontrol ve S gruplarına göre S+N grubunda plazma eNOS seviyesindeki artış anlamlı olduğu görüldü. Sonuç olarak; kronik periferik nesfatin-1 uygulamasının sıçanlarda kan basıncını arttırdığını söyleyebiliriz. Nesfatin-1'in kalpte L-Tipi Ca^{+2} kanal $\alpha 1c$ alt birimi proteini ekspresyon düzeyini artırarak, periferde plazma ACE2 yolağını aktive ederek ve eNOS azalışına neden olarak kan basıncını yükseltici etki gösterdiğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Nesfatin, Stres, Kan Basıncı

ABSTRACT**THE EFFECT OF NESFATIN ON BLOOD PRESSURE REGULATION IN
NORMAL AND STRESS CREATED RATS**

AYADA, Ceylan
PhD. Thesis in Physiology
Supervisor: Prof. Dr. Günfer Turgut

Mart 2013, 110 pages

Nesfatin is a peptide secreted by peripheral tissues, central and peripheral nervous system. It is involved in the regulation of homeostasis. Nesfatin can be able to pass through the blood-brain barrier in both directions. Its effects on nutrition have been studied in more detailed in the literature. But its effects on other physiological parameters and mechanisms of action are still needs to be clarified. In this study we have investigated the effect of peripheral chronic nesfatin-1 application on blood pressure regulation in normal and chronic immobilization stress created rats. In our study, three month-aged male Wistar rats were used. Rats were divided into 4 groups as C, S, C+N, S+N. Animals's blood pressures and body weights were measured at the beginning and end of the experimental process. At the end of the study tissues and blood samples were collected from rats under anesthesia. Western blot analysis was performed to determine the level of L-type Ca^{2+} channel $\alpha 1c$ subunit protein expression in heart tissue samples. Angiotensinogen, ACE2, AngII, endothelin-1, eNOS, aldosterone, cortisol, nesfatin-1 levels were determined in plasma samples by ELISA. SPSS 16.0 program was used for statistical analysis of data obtained. Statistically significant reduction of body weights in S+N group compared to C was observed. Statistically significant increase of blood pressure values in C+N and S+N groups compared to C and S groups were observed. Statistically significant increase of heart L-type Ca^{2+} channel $\alpha 1c$ subunit protein expression level values in S+N groups compared to C group was observed. Statistically significant reduction of plasma angiotensinogen levels in C+N and S+N groups compared to S group was observed. Statistically significant increase of plasma ACE2 levels in C+N and S+N groups compared to S and C groups were observed. Statistically significant increase of plasma AngII levels in S and S+N groups compared to C group was observed. Statistically significant increase of plasma eNOS level in S group compared to C group was observed. Statistically significant reduction of plasma eNOS level in S+N group compared to S and C groups were observed. As a result, we can say that chronic peripheral nesfatin-1 application increases blood pressure in rats. We believe that nesfatin-1 showed the strengthening effect on blood pressure by increasing of L-type Ca^{2+} channels $\alpha 1c$ subunit protein expression in the heart, decreasing eNOS plasma level and activating ACE2 pathway in the periphery.

Key Words: Nesfatin, Stress, Blood Pressure

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Teşekkür.....	v
Proje Desteği ve Etik İzin.....	vi
Etik sayfası.....	vii
Özet.....	viii
Abstract.....	ix
İçindekiler.....	x
Şekiller Dizini.....	xii
Tablolar Dizini.....	xiii
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR BİLGİLERİ.....	5
2.1. Stres.....	5
2.1.1. Stres Tanımı ve Stres Cevabı.....	5
2.1.2. Stres ve Kan Basıncı.....	8
2.1.3. Stres ve Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi (RAAS).....	10
2.1.4. Stres ve Glukokortikoidler.....	20
2.1.5. Stres ve Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz (eNOS).....	21
2.1.6. Stres ve Endotelin- 1.....	27
2.1.7. Stres ve Nesfatin-1.....	30
2.1.8. Stres ve L- Tipi Kalsiyum (Ca ⁺²) Kanalları.....	33
2.2. Deneysel Stres Modelleri.....	36
2.2.1. Kronik Tahmin Edilemeyen Stres.....	37
2.2.2. Hareketsizlik Stresi.....	37
2.3. Nesfatin.....	39
2.3.1. Nesfatin Tarihçesi.....	39
2.3.2. Nesfatin Nedir?.....	39
2.3.3. Nesfatin Geni.....	40
2.3.4. Nesfatin Nerelerde Bulunur?.....	42
2.3.5. Nesfatinin Görevleri.....	43
2.3.5.1. Nesfatin ve Besin Alımı.....	43
2.3.5.2. Nesfatin ve Sinir Sistemi.....	44
2.3.5.3. Nesfatin ve Sempatik Sinir Sistemi.....	45
2.3.5.4. Nesfatin ve Stres.....	45
2.3.5.5. Nesfatin ve Anksiyete.....	46
2.3.5.6. Nesfatin ve Endokrin Sistem.....	46
2.3.5.7. Nesfatin ve Diyabet.....	47
2.3.5.8. Nesfatin ve Bağışıklık Sistemi.....	48
2.3.5.9. Nesfatin ve Kardiyovasküler Sistem.....	48
2.3.5.10. Nesfatin-1 ve L- Tipi Kalsiyum (Ca ⁺²) Kanalları.....	49
3. MATERYAL METOD.....	51
3.1. Deneyde Kullanılan Hayvanlar.....	51
3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	51
3.3. Kronik Hareketsizlik Stresi Oluşturma Protokolü.....	51
3.4. Kan Basıncı Ölçme Yöntemi.....	52
3.5. Nesfatin-1 Uygulaması.....	53
3.6. Örneklerin Toplanması.....	53
3.7. Biyokimyasal Analizlerin Yapılması.....	54

3.7.1. Anjiyotensinojen, ACE2, AngII, Endotelin-1, eNOS ELISA Kit Protokolü.....	54
3.7.2. Kortizol ve Aldosteron ELISA Kit Protokolü.....	55
3.7.3. Nesfatin- 1 ELISA Kit Protokolü.....	55
3.8. Western Blot Tekniği ile Kalp Dokusundan L-Tipi Ca ⁺² Kanal α1c Alt birimi Protein Miktarı Tayini.....	58
3.8.1. Kalp Dokusu Homojenizatı Hazırlanışı.....	58
3.8.2. Lowry Yöntemi ile Homojenizatın Toplam Protein Miktarının Hesaplanması.....	59
3.8.3. Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel (SDS- PAGE) Elektroforezi	60
3.8.3.1. SDS- PAGE Hazırlanışı.....	60
3.8.3.2. Elektroforetik Yürütme.....	61
3.8.4. Blotlama (Semi-Dry Transfer).....	62
3.8.5. Bloklama.....	63
3.8.6. Birincil ve İkincil Antikor ile İnkübasyon.....	63
3.8.7. Antikor ile İşaretili Bantların Görüntülenmesi ve Alan Yoğunluklarının Hesaplanması.....	64
3.9. İstatiksel Analiz.....	64
4. BULGULAR.....	65
5. TARTIŞMA.....	73
6. SONUÇ.....	82
KAYNAKLAR.....	85
ÖZGEÇMİŞ.....	94

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa	
Şekil 2.1	Sol ventrikül hipertrofisi ve miyokard infarktüsü süreçlerinde; özellikle renin-anjiyotensin-aldosteron ve sempatik sinir sistemlerini de kapsayan olumsuz nörohormonal aktivasyonun temel rolü.....	11
Şekil 2.2	Kalp hastalarında norepinefrin, anjiyotensin II ve aldosteron ile aşırı uyarılmanın fizyopatolojik mekanizması.....	12
Şekil 2.3	Sistolik kalp yetmezliğinde sempatik aktivasyon.....	14
Şekil 2.4	Aldosteronun çeşitli fizyopatolojik etkileri.....	19
Şekil 2.5	Endotelial hücrelerde Nitrik oksit üretimi.....	23
Şekil 2.6	Nesfatin-1'in PVN bölgesindeki CRH nöronlarında intrasellüler Ca^{+2} konsantrasyonuna etkisi.....	32
Şekil 2.7	Nesfatin-1'in öncülü olan NUCB2 proteininin primer yapısı ve Nesfatin-1 molekülünün şematik gösterimi.....	50
Şekil 2.8	İnsan NUCB2 geninin şematik sunumu.....	41
Şekil 2.9	İnsan NUCB2 geninin 3'UTR bölgesinin dizisi.....	42
Şekil 2.10	Beyinde nesfatin salgıyan hücreler ve besin alımında olası etkileri..	44
Şekil 2.11	Nesfatinin antihiperglisemik etkisi.....	47
Şekil 2.12	Farklı konsantrasyonlardaki nesfatin-1 uygulamasının ortalama arteriyel basınca etkisi.....	49
Şekil 3.1	Kronik Hareketsizlik Stresi Uygulaması.....	52
Şekil 3.2	Kan Basıncı Ölçme Yöntemi.....	53
Şekil 3.3	Örneklerin Toplanması.....	54
Şekil 4.1	Kontrol, S, K+N, S+N gruplarının kalbinde L-tipi Ca^{+2} kanal $\alpha 1c$ altbirimi proteini ekspresyon düzeyi.....	68
Şekil 4.2	Kalp L-Tipi Ca^{+2} Kanal $\alpha 1c$ altbirimi proteini <i>Western Blot</i> görüntüsü.....	68
Şekil 4.3	Kontrol, S, K+N, S+N gruplarında plazma anjiyotensinojen konsantrasyonu.....	69
Şekil 4.4	Kontrol, S, K+N, S+N gruplarında plazma ACE2 konsantrasyonu.....	70
Şekil 4.5	Kontrol, S, K+N, S+N gruplarında plazma AngII konsantrasyonu.....	70
Şekil 4.6	Kontrol, S, K+N, S+N gruplarında plazma eNOS konsantrasyonu.....	72
Şekil 4.7	Kontrol, S, K+N, S+N gruplarında plazma Nesfatin-1 konsantrasyonu.....	72

TABLOLAR DİZİNİ

		Sayfa
Tablo 3.1	Nesfatin- 1 ELISA kiti standartları için uygulanan dilüsyon oranları.....	56
Tablo 3.2	RIPA solüsyonu hazırlanışı.....	58
Tablo 3.3	Lowry Solüsyonlarının hazırlanışı.....	59
Tablo 3.4	%10'luk ayırıcı jel hazırlanışı.....	60
Tablo 3.5	Paketleyici jel hazırlanışı.....	61
Tablo 3.6	Elektroforez yürütme tamponu hazırlanışı.....	61
Tablo 3.7	Transfer tamponu hazırlanışı.....	62
Tablo 3.8	TBS solüsyonu hazırlanışı.....	63
Tablo 3.9	Bloklama solüsyonu hazırlanışı.....	63
Tablo 4.1A	Kontrol, S, K+N, S+N grupları deney önce ve sonrası sıçanların vücut ağırlıkları.....	65
Tablo 4.1B	Kontrol, S, K+N, S+N grupları deney önce ve sonrası sıçanların kan basınçları.....	66
Tablo 4.2	Kontrol, S, K+N, S+N gruplarında sıçanların vücut ağırlıkları ve kan basıncı düzeyleri.....	66
Tablo 4.3	Kontrol, S, K+N, S+N gruplarında plazma aldosteron, kortizol ve endotelin-1 konsantrasyonlarının karşılaştırılması.....	71

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACE	Anjiyotensin dönüştürücü enzim
ACE2	Anjiyotensin dönüştürücü enzim2
ACTH	Adrenokortikotropik hormon
ADR β	Beta-adrenerjik reseptör
ADR β 1	Beta1-adrenerjik reseptör
ADR β 2	Beta2-adrenerjik reseptör
ADR β 3	Beta3-adrenerjik reseptör
ADH	Antidiüretik hormon
AgRP	Aguti ilişkili protein
AngII	Anjiyotensin II
Ang1-7	Anjiyotensin 1-7
ANS	Otonom sinir sistemi
ARC	Arkuat
AT-1	Anjiyotensin II Tip I reseptörü
AT-2	Anjiotensin II Tip I reseptörü
BH4	Tetrahidrobiopterin
Ca ⁺²	Kalsiyum
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
CART	Kokain- amfitamin düzenleyici transkripsiyon faktörü
CCK	Kolesistokinin
cNOS	Esas nitrik oksit sentaz
CRF	Kortikotropin salgılatıcı faktör
CVM	Kronik değişken stres
DR	Dorsal raphe nukleusları
ECE-1	Endotelin-dönüştürücü enzim-1
eNOS	Endotelial nitrik oksit sentaz
ET	Endotelin
ET-1	Endotelin-1
ET-2	Endotelin-2
ET-3	Endotelin-3
ET-A	Endotelin reseptör A
ET-B	Endotelin reseptör B
FMD	Akım Aracılı Gevşeme
GH	Büyüme hormonu
Gi	İnhibitör G- proteini
GR	Glukokortikoid reseptörleri
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HPA	Hipotalamus-hipofiz-adrenal aksı
ICa-L	L-tipi Ca ⁺² kanalı akımını
icv	İntraserebroventriküler
iNOS	Uyarılabilir nitrik oksit sentaz
LC	Lokus seruleus
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
LVH	Sol ventrikül hipertrofisi
MI	Miyokard infarktüs
mmHg	Milimetre civa
MR	Mineralokortikoid reseptörleri

mRNA	Haberci ribonükleik asit
MSS	Merkezi sinir sistemin
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NADH	Nikotinamid adenin dinukleotid
NE	Norepinefrin
nNOS	Nöronal nitrik oksit sentaz
NO	Nitrik oksit
npEW	Edinger-Westphal nükleusu
NTS	Nükleus traktus solitarus
NUCB2	<i>Nucleobinding 2</i>
PC	Prohormon dönüştürücü
PLC	Fosfolipaz C
PKA	Protein kinaz A
POMC	Proopiomelanokortin
pPVH	Parvoselüler bölge
PVN	Paraventriküler nükleus
RAAS	Renin anjiyotensin aldosteron sistemi
SON	Supraoptik nükleus
SSS	Sempatik sinir sistemi
TNF- α	Tümör nekrozis faktör alfa
UTR	Çevrilmeyen bölge
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
α -MSH	Alfa melanosit stimulan hormon
α 1c	Alfa-1c
5-HT	5-hidroksitriptamin

1. GİRİŞ

Hipotalamus ve beyin sapından salgılanan bir peptid olan nesfatinin besin alınımını düzenlediği bildirilmektedir (Oh-I ve Shimizu 2006). Nesfatinin iştah kontrolündeki etkinliği, leptin yolağından bağımsız olarak gerçekleşmektedir. Leptin geninin mutant olduğu obez farelerde, nesfatin-1'in yiyecek alımını baskıladığı gösterilmiştir. Bu nedenle de leptin geninin mutant olduğu kişilerde obezite tedavisinde nesfatin kullanılmasının etkin olabileceği düşünülmektedir (Oh-I ve Shimizu 2006, Cowley ve Grove 2006).

Hipertansiyon (yüksek kan basıncı) yüksek arteriyel kan basıncı sürekliliği ile kendini gösteren sistemik bir hastalık olup, ciddi komplikasyonlara yol açması ve toplumda sık görülmesi nedeniyle önemli bir sağlık problemidir (Onat vd 1991). İstirahat sırasında, diyastolik arter basıncı 90 mmHg ve sistolik arter basıncı 140 mmHg ve üzerinde olursa hipertansiyon olarak kabul edilir (Guyton ve Hall 2006).

Hipertansiyon birçok genetik ve çevresel faktöre bağlı olarak meydana gelebilen kompleks ve multifaktöryel bir hastalıktır (Sun ve Zhang 2005). Günümüzde hipertansiyon, dünyanın tüm coğrafi bölgelerini etkileyen ve öncelikle erişkin popülasyonu ilgilendiren bir epidemiyoloji haline almıştır. Epidemiyolojik veriler, otuzlu yaşlarda %20-25 olan hipertansiyon prevalansının yaşla birlikte belirgin artış göstererek 60 yaş ve üzerinde %50'lere çıktığını göstermiştir (Arıcı ve Çağlar 2002). Sempatik sinir sistemi (SSS) aktivitesinde artış, endotelin ve tromboksan gibi vazokonstriktörlerin ve sodyum tutucu hormonların aşırı üretimi, potasyum ve kalsiyum alımının yetersiz olması, artmış ve uygunsuz renin sekresyonu, prostoglandinler ve nitrik oksit gibi vazodilatörlerin eksiklikleri, direnç damarlarında konjenital anomaliler, diyabet, insülin direnci, obezite, damar büyüme faktörlerinde aktivite artışı ve hücrel iyon transportunda değişme gibi birçok patofizyolojik faktör, hipertansiyon oluşmasında rol oynar (Burt vd 1995).

Stres, çeşitli etkenlerin sebep olduğu, vücut çalışmasında dengesizlik, sinir sisteminde bozukluk ve psişik gerilimle karakterize bir durumdur (Kocatürk 1994). Dış çevrede veya vücudun kendisinde bir değişiklik sonucu hücrede veya doku sıvısında meydana gelen kimyasal veya fiziksel dengesizlik fizyolojik stres olarak tanımlanır

(Selye 1946). Stres faktörü vücudun denge durumunu bozmaya yöneliktir. Ancak vücut buna karşılık farklı sistemleri harekete geçirerek denge durumunu korumayı amaçlar. Homeostazis; vücudun dinamik kararlı durumudur ve turnover reaksiyonlarının net etkisidir (Cannon 1935). Stres faktörleri, dinamik kararlı durumu değiştiren bir seri reaksiyonlara yol açarlar. Stres cevapları SSS ve endokrin sistemlerce başlatılır ve özellikle hipotalamustan kortikotropin salgılatıcı faktör (CRF), lokus seruleustan (LC) norepinefrin (NE) salgılanır. Bu hormonların etkisi ile hipofiz ve adrenal bez devreye girer (Chrousos ve Gold 1992). Bu sistemlerin aktivasyonu adaptif enerjiyi merkezi sinir sistemine (MSS) ve stresli vücut kısımlarına yönlendirir. Norepinefrin salınımı; artmış anksiyete, artmış dikkat durumlarında ve diğer korumacı emosyonel cevaplar durumunda devreye girer (Vollhardt 1991). Diğer yandan, stresörlere karşı adaptasyonun sağlanmasında ve ortaya çıkan depresyon veya anksiyete durumlarında serotonerjik sistemin de yer aldığı saptanmıştır. Yapılan çalışmalar tekrarlayan kısa veya uzun süreli streslere uyumda postsinaptik 5-hidroksitriptamin (5-HT) seviyelerinin arttığı gösterilmiştir (Hayashi vd 1998). Stres süresince SSS aracılığı ile kan akımına adrenal bez medullasından katekolaminler (Epinefrin, NE ve dopamin) karışır. Eş zamanlı olarak ön hipofiz bezinden prolaktin, büyüme hormonu (GH) ve adrenokortikotropik hormon (ACTH), arka hipofiz bezinden ise antidiüretik hormon (ADH) salgılanır. Adrenokortikotropik hormonun adrenal bezin korteksini stimüle etmesi sonucu buradan kortizol salgılanır. Tiroid hormonu ise stres döneminde baskılanmıştır. Ayrıca üreme ve büyüme stres maruziyetinde durdurulur. Bu olaylar sonucunda stres koşullarında enerjinin korunumu sağlanmış olmaktadır (Vollhardt 1991).

Yapılan çalışmalar nesfatin ve stres arasında bağlantının olabileceğini göstermektedir. Nesfatin beyinde nükleus traktus solitarus (NTS), LC, dorsal raphe nükleusları (DR) ve paraventriküler nükleus (PVN) gibi stres ile ilişkili alanlarda bulunmaktadır. Aynı zamanda nesfatin PVN'da CRH, NE ve beyin sapında 5-HT ile kolokalizdir. CRH stres cevabının oluşumunda etkinlik göstermekte aynı zamanda NE ve 5-HT'de hipotalamus-hipofiz aksını modüle etmektedirler. 5-HT_{2C} agonistinin periferik enjeksiyonu hipotalamustaki NUCB2 (*nonesterified fatty acid/nucleobinding 2*, NEFA- DNA bağlayan/ EF- hand/ asidik protein) ekspresyonunu arttırmaktadır (Yoshida ve Maejima 2010). Nesfatin-1 segmentinin merkezi uygulaması anoreksik ve korku ilişkili cevabın oluşmasına neden olmaktadır (Merali ve Cayer 2008). Bu

sonuçlara dayanarak nesfatinin stres cevabının düzenlenmesinde etkin olduğu düşünülmektedir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, nesfatinin besin alımı üzerine etkileri daha yoğun olarak çalışılmıştır. Nesfatinin diğer sistemler ile olan ilişkileri ve bu sistemlerdeki fizyolojik süreçlere olan etkisini konu alan çok az çalışma bulunmaktadır. Sınırlı sayıda yapılmış olan araştırmalar, nesfatinin farklı parametreler üzerindeki etkilerine netlik kazandıramamıştır.

Nesfatin merkezi ve periferik sinir sisteminde, periferik dokularda salgılanan ve homeostazisin düzenlenmesinde görev aldığı bildirilen bir peptittir. Kan beyin bariyerini her iki doğrultuda geçebilen ve literatürde beslenme üzerine olan etkileri daha detaylı olarak çalışılmış olan bu peptidin, diğer fizyolojik parametrelere etkisi ve etki mekanizmaları halen tam olarak aydınlığa kavuşturulamamıştır. Nesfatinin kan basıncını arttırıcı etkisi bildirilmekte ancak kan basıncını hangi mekanizmayla arttırdığı netlik kazanmamıştır (Pan vd 2007, Price vd 2007, Yosten ve Samson 2009). Bunların yanı sıra stres koşullarında plazma nesfatin-1 düzeyinin arttığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiş bulunmaktadır (Yoshida ve Maejima 2010). Nesfatin-1 uygulaması pankreasdaki beta hücrelerinde L-tipi Ca^{+2} kanal miktarını arttırmaktadır (Nakata ve Manaka 2011). Bu bilgiler ışığında; nesfatin-1'in kalpte de L-tipi Ca^{+2} kanal miktarını artırabileceğini, periferde renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi (RAAS) üzerinden veya kortizol aracılı olarak kan basıncını arttırabileceğini düşünmekteyiz. Bu bağlamda normal ve stres koşullarında, nesfatinin kan basıncı üzerindeki etkileri çalışılacak ve kan basıncı değişikliklerinin kalp L- tipi Ca^{+2} kanal miktarı, RAAS, kortizol, endotelin-1 ve eNOS ile ilişkisi açıklığa kavuşturulmaya çalışılacaktır.

Hipertansiyon ve stres günümüzde oldukça sık görülen ve yaşam kalitesini etkileyen önemli sağlık sorunlarıdır. Tedavi edilmedikleri veya ortadan kaldırılmadıkları durumlarda daha ileri sağlık sorunlarına yol açabilmektedirler. Nesfatinin kan basıncı üzerine etkileri ile ilgili çok az çalışma yapılmış ve etki mekanizması tam olarak netlik kazanmamıştır. Bu çalışma ile stres koşullarında ve normalde meydana gelen kan basıncı değişikliklerinde nesfatinin rolü ve hangi mekanizmalarla etki gösterdiği araştırılarak açıklanmaya çalışılacak ve literatüre katkı sağlanacaktır. Ayrıca bu

araştırma kronik sistemik nesfatin uygulamasının normal ve stres oluşturulmuş sıçanlardaki etkilerinin araştırılacağı literatürdeki ilk çalışma olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Stres

2.1.1. Stres Tanımı ve Stres Cevabı:

Stres faktörleri canlı organizma için dinamik kararlı durumu değiştiren bir seri reaksiyonlara yol açarlar. Bütün türlerin hayatta kalması ve refahı, çevre ve homeostatik sorunlara uygun fizyolojik yanıtlar gerektirir. Stres koşullarına adaptasyon tüm organizmalar için bir önceliktir. Duysal merkezlerden alınan stres ile ilişkili tüm sinyaller beyne yönlendirilir (Ulrich-Lai ve Herman 2009). Beyin strese karşı oluşturulan yanıtın anahtar organıdır. Çünkü beyin potansiyel stresin zararlı olup olmayacağını aynı zamanda fizyolojik ve davranışsal cevapların adaptif veya zarar verici niteliğini belirler (McEwen 2007). Beyin, nöral ve nöroendokrin yanıtları canlının yararına olacak şekilde iyileştirir. Strese karşı oluşan fizyolojik yanıtlar etkili ve birbirine bağlıdır. Bu yanıtların amacı en zararlı koşullarda dahi fizyolojik bütünlüğü korumayı amaçlar (Ulrich-Lai ve Herman 2009).

Homeostazın yeniden kurulması ve devamlı şekilde aktivasyonu, nöroendokrin ve otonom sinir sistemlerinin kontrolünü gerektirir (Ulrich-Lai ve Herman 2009). Stres beyin ile kardiyovasküler, immün ve diğer sistemler arasında nöral ve endokrin mekanizmalarla olmak üzere iki sistem aracılığı ile iletişimi içermektedir (McEwen 2007). Beyin uyarının niteliği ile orantılı olarak stres yanıtlarını tetikler. Kan kaybı, enfeksiyon ve ağrı gibi fiziksel stresler refleks mekanizmaların tetiklendiği ani bir sistemik tepki meydana getirir. Aynı zamanda beyin fiziksel olmayan veya ruhsal strese karşı oluşturulacak yanıtlara doğuştan programlıdır. Stres koşullarına karşı beklenen ya da ani oluşan bu yanıtların oluşması ön beyin işlev görmesi ile gerçekleşir. Kolektif stres yanıtları büyük ölçüde limbik ön beyin, hipotalamus ve beyin sapının örtüştüğü devreler tarafından yönetilir. Bu şekilde nöroendokrin ve otonom sistemlerin ilgili etkileri stres yöntemi ve yoğunluğu ile uygun olarak ayarlanmıştır. Limbik bölge ödül ve ceza bölgeleri ile kesişir ve bu da geçmiş tecrübeler ve beklenen sonuçlar ile ilgili uygun stres yanıtının oluşması için bir araç sağlar (Ulrich-Lai ve Herman 2009).

Otonom sinir sistemi (ANS) stres maruziyetinde en hızlı yanıtın oluşmasını sağlar. Bu yanıtı oluştururken, sempatik ve parasempatik kollarının sonlandığı organlarda nöronal uyarı aracılığı ile bu organların fizyolojik durumlarında ani değişiklikler meydana getirir. Örneğin sempatoadrenomedullar kol, kardiyovasküler sistemi uyararak kalp hızı ve kan basıncında ani bir artışa neden olur. Otonom sinir sisteminin uyarılması refleks parasempatik aktivasyon nedeni ile hızla azalır. Bu nedenle otonom sinir sistemi yanıtları kısa sürelidir (Ulrich-Lai ve Herman 2009).

Sempatoadrenomedullar ve hipotalamik-hipofiz-adrenokortikal (HPA) aks stres süresince homeostazisin devamlılığını sağlayan birincil sistemlerdir. Strese maruziyet torokalumbar kolon ve omurilik intermediolateral hücrelerinde pregangliyonik sempatik nöronların aktivasyonu ile sonuçlanır. Pregangliyonik nöronlar ön veya paravertebral gangliyonlarda, bunlar ise son organlarda ve adrenal medullanın kromofin hücrelerinde sonlanırlar. Bu şekilde organizasyon gösteren sempatik aktivasyon, Walter Cannon ve arkadaşlarının 20.'ci yüzyılın başlarında tanımladıkları “savaş ya da kaç” yanıtını meydana getirmektedir. Oluşan cevap, başlıca adrenal medulladan salgılanmakta olan dolaşımdaki adrenalın ve başlıca sempatik sinirlerden salgılanan noradrenalin seviyelerini, kalp hızı ve kasılma gücünü, periferik vazokonstriksiyonu ve enerji hareketliliğini artırır (Ulrich-Lai ve Herman 2009).

Akut strese karşı “savaş ya da kaç” yanıtının oluşmasının ötesinde, günlük yaşanan olaylar kronik stres sebebidir ve vücut üzerinde yıpratıcı etkilere sahiptirler (allostatik yük). Buna rağmen stres ile ilişkili hormonlar vücudu kısa süreli olarak korurlar ve adaptasyonu düzenlerler (allostasis) (McEwen 2007).

Parasempatik tonus da stres sırasında modüle olabilir. Parasempatik sistemde kraniosakral pregangliyonik çekirdeklerin aktivasyonu son organlar yakını veya üzerinde sonlanan postgangliyonik çekirdeklerin aktivasyonuna neden olur. Parasempatik etkiler genel olarak sempatik sistem etkilerinin zıttı olacak şekilde gerçekleşir (Ulrich-Lai ve Herman 2009).

Stres faktörlerinin beyni etkilemesine bağlı olarak beyinde lokal nörotransmitterlerin yanı sıra sistemik hormonlar yapısal ve fonksiyonel değişiklikler yapabilmek için etkileşime girerler. Beyin, esnek ve adaptif plastisite kapasitesine

sahiptir. Bu nedenle akut stres sonucunda organizma için potansiyel olarak zararlı olan olaylar, beyinde hafızasının oluşmasını sağlarlar. Kronik stres maruziyeti, strese karşı oluşan HPA ve otonom cevapların düzenlenmesinde görevli olan beyin bölgelerinin olumlu yönde yapısal ve işlevsel değişimine (adaptif plastisite) neden olur. Ancak çok zorlu koşullar altında beyinde kalıcı hasar meydana gelir (McEwen 2000, Ulrich-Lai ve Herman 2009).

Strese maruziyet sonucu aktive olan HPA aksı, glukokortikoid seviyesinde artışa neden olur. Glukokortikoidlerin hedefi olarak tanımlanan ilk beyin bölgesi hipokampusdur (McEwen 2007). HPA aksında glukokortikoidler aracılığı ile sağlanan negatif geri besleme olayına limbik ön beyin yapılarının en azından bir kısmı aracılık eder. Sık tekrarlayan stres, beyinde kortizol reseptörlerince zengin hipokampuste etkisini gösterir. Hipokampus, olayların zaman ve yerinin hatırlanmasında ve kelime hafızasında önemli bir merkez olarak rol oynar. Glukokortikoidler de reseptörleri aracılığı ile bu olayda görev alırlar. Glukokortikoid (GR) ve mineralokortikoid (MR) reseptörlerinin her ikisi de hipokampusta bol miktarda eksprese edilirler ve belkide bazı nöronlarda kolokalizdirler. MR ve GR'leri kortikosteronlar için farklı afiniteye sahiptirler. Bu durum hipokampusu kortikosteronların bazal veya stresle artmış seviyelerine karşı duyarlı hale getirir (Ulrich-Lai ve Herman 2009).

Hipokampusun yanı sıra amigdala ve prefrontal korteks davranışsal ve fizyolojik cevapları değiştiren, strese bağlı oluşan yapısal değişiklikler göstermektedirler. Stres ve stres hormonları hayat boyunca bu bölgeler üzerinde olumlu ve olumsuz etkiler üretmektedirler (McEwen 2007, McEwen ve Gianaros 2010).

Limbik glukokortikoid sinyalizasyonun önemi karşılaşılan stres çeşidine bağlıdır. Bu sinyalizasyon hipotalamus-hipofiz aksı cevaplarını psikojenik stresler için düzenlerken, sistemik stres için düzenlemez. Limbik sistem (özellikle hipokampus) hipotalamus-hipofiz aksının cevabını inhibe edici rol de taşımaktadır. Limbik sistem bu etkisi sayesinde stres uyarısına özel olarak hipotalamus-hipofiz aksının cevabını modifiye edebilme yeteneğine sahiptir. Ancak kronik stres durumunda hipokampuste disfonksiyon ve hafızada bozukluklar ortaya çıkabilir. Akut dönemde kortizoldeki artış hipokampus ve temporal lobun görevi olan kısa süreli hafızada aksamaya yol açabilmekle beraber genellikle bu etki geri dönüşümlüdür. Fakat kronik stres

durumlarında, glukokortikoidlerin ve uyarıcı aminoasit nörotransmitterlerin, stres süresince ve sonrasında salınımları sonucu hipokampusun piramidal nöronlarının dendritlerinde atrofi gelişebilir. Bu stres bir süre sonra sonlanırsa gelişen durum gerileyebilir. Ancak uzun süreli olarak gerçekleşen kronik stres durumlarında hipokampal nöronların ölümü söz konusudur. Yaşlanmış ratlarda yapılan çalışmalarda, kronik stresin bazı biyolojik belirteçlerin ortaya çıkışına sebep olduğu, hipokampal piramidal nöronlarda kayıp, uyarılabilirlik artışı ve yıkıma neden olabildiği saptanmıştır. Glukokortikoidler, hipokampuste kalsiyum akımını kuvvetlendirerek bu etkilere aracılık ederler. Yaşlı ratlarda, stres sonrasında uyarıcı aminoasitlerden olan glutamatın hipokampuste kronik salınımının yine dejeneratif değişikliklerde, atrofi ve nöronal kayıpta etkili olduğu görülmüştür (McEwen ve Seeman 1999, Kocatürk 2000, Ulrich-Lai ve Herman 2009).

Hipokampus gibi beyin bölgelerinde meydana gelen stres kaynaklı yapısal değişikliklerin depresyon, post-travmatik stres bozukluğu ve yaşlanma sürecinin bireysel farklılıkları gibi çeşitli klinik etkileri bulunmaktadır (McEwen 2000).

2.1.2. Stres ve Kan Basıncı

Hipertansiyon, rastlanma sıklığının yüksek ve beraberinde diğer birçok hastalık için risk faktörü olması sebebi ile dünya genelinde önemli bir sağlık sorunu olarak kabul edilmektedir. 2000 yılı itibariyle dünyada erişkin nüfusun % 26,4'ünün hipertansiyonu olduğu ve bu oranın 2025 yılında % 29,2'ye çıkacağı öngörülmüştür. Bir diğer deyişle, halen 972 milyon insanın hipertansiyonu vardır ve 25 yıl sonra bu rakam 1,5 milyarı aşacaktır. Hipertansiyonu olan bireylerin çoğu, ekonomik olarak gelişmekte olan ülkelerde yaşamaktadır. Bu ülkelerde hipertansiyonun bu kadar sık olması ve giderek artması “epidemiyolojik geçiş” sürecine bağlanmaktadır (Kearney vd 2004, Kearney vd 2005).

Hipertansiyon rastlanma sıklığının yüksek olmasının yanı sıra dünya genelinde önlenebilir ölüm nedenleri içerisinde bir numaralı risk faktörü olduğu içinde önem taşımaktadır. Aynı zamanda hipertansiyon yaşam kalitesini kötü yönde etkileyen etmenler arasında üçüncü sırada yer almaktadır. Bununla beraber hipertansiyon kardiyovasküler ve böbrek hastalıkları için kanıtlanmış değiştirilebilir risk

faktörlerinden sadece biridir ve bu nedenle de önemli bir sağlık sorunu olarak nitelendirilmektedir. Tüm bu öngörülen risk faktörlerinden, hastalık ve ölümlerden korunabilmek için hipertansiyon güçlü bir anlam taşımaktadırlar. Sağlıkla ilgili kapsamlı bir yaklaşım sağlayabilmek için hipertansiyon, yüksek LDL (*Low Density Lipoprotein*) ve düşük HDL (*High Density Lipoprotein*) kolesterol düzeyleri, sigara kullanımı, vücut kitle indeksi, fiziksel hareketsizlik, kötü beslenme ve diyabet dâhil olmak üzere birbiri ile ilişkili risk faktörlerine odaklanmak gerekmektedir (Kearney vd 2004, Kearney vd 2005).

Geçtiğimiz yüzyıldan günümüze bazı hastalıkların ölüme sebep olma yüzdeleri artmış bulunmaktadır. Bu hastalıklar arasında kardiyovasküler hastalıklar da yer almaktadırlar ve hipertansiyon sıklığı kardiyovasküler hastalıkların yaygınlaşmasına katkıda bulunmaktadır. Günümüzde dünya genelinde gerçekleşen ölümlerin %30'undan kardiyovasküler hastalıklar sorumludur. Kardiyovasküler hastalıklarda ölüm oranındaki kısa zamanda bu hızlı yükseliş diyet, fiziksel aktivite ve stres gibi çevresel risk faktörleri ile ilişkilendirilebilir (Kearney vd 2005).

Yüksek kan basıncı kardiyovasküler hastalıkların değişmeyecek olan önemli nedenlerinden biridir. Yüksek kan basıncı ile ilişkili kardiyovasküler hastalıklar diğer risk faktörlerinden daha tutarlı ve bağımsızdır. Dünya genelinde hipertansiyon sıklığı direkt olarak kalp krizi ve kardiyovasküler hastalık sıklığını yansıtmaktadır (Agyemang vd 2007).

Çalışmalar sonucunda elde edilen kanıtlar yetersiz olmakla beraber, stresin hipertansiyon gelişiminde katkısı olduğu düşünülmektedir. Genellikle stres sonucu oluşan hipertansiyonun; sempatoadrenal aktivitenin artışına, epinefrin-norepinefrin salınımının artışına ve gelişmiş vasküler tonusa bağlı olduğu kabul edilmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda, sempatik sinirlerin aktivasyonu ile başlayan uzun süreli vazokonstriksiyonun adrenerjik reseptörlerin tam bir blokajı ile önlenemediği gösterilmiştir. Bu nedenle, sempatik sinir sistemi aracılığı ile gerçekleşen vazokonstriksiyonda, katekolaminler dışındaki faktörlerinde aracı olabileceği düşünülmektedir (Han vd 1998).

Akut ve kronik strese bağlı olarak ortaya çıkan aşırı kardiyovasküler yanıtlar hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalık riskini artırabilir (Bechtold vd 2009).

Kronik stres genel olarak; artmış kardiyovasküler hastalık riski, baroreseptör refleksi zayıflaması, meydana gelebilecek olan yeni akut strese karşı artmış kan basıncı ve nöroendokrin yanıtlar oluşturma, tekrarlayan strese karşı azalmış kan basıncı ve nöroendokrin yanıtlar oluşturma, bazal kan basıncında artış gibi etkilere sahiptir. Bu mekanizmalar organizmanın stres koşullarında hayatta kalabilmesi ve gelecek yeni tehditlere hazırlıklı olabilmesine yardımcı olmak üzere uyum içinde çalışmaktadırlar. Fakat stres devresinin uzun süreli aktivasyonu, kardiyovasküler hastalıklar için bir risk faktörü artışı dâhil olmak üzere birçok sağlık sorunlarına neden olabilmektedir (Scheuer vd 2007, Scheuer 2010).

Kronik stres ile gelişen yorgunluk hissi, enerji eksikliği, iritabilite ve demoralizasyon beraberinde fibrinojen sisteminde ve plateletlerde artmış reaktiviteye yol açar, bu olay miyokard infarktüsü riskinin artışına sebep olur. Stresle artmış kan basıncı, artmış sol ventrikül kitle indeksi ve ilerleyen ateroskleroz da miyokard infarktüs gelişimine hız kazandırır (Kocatürk 2000).

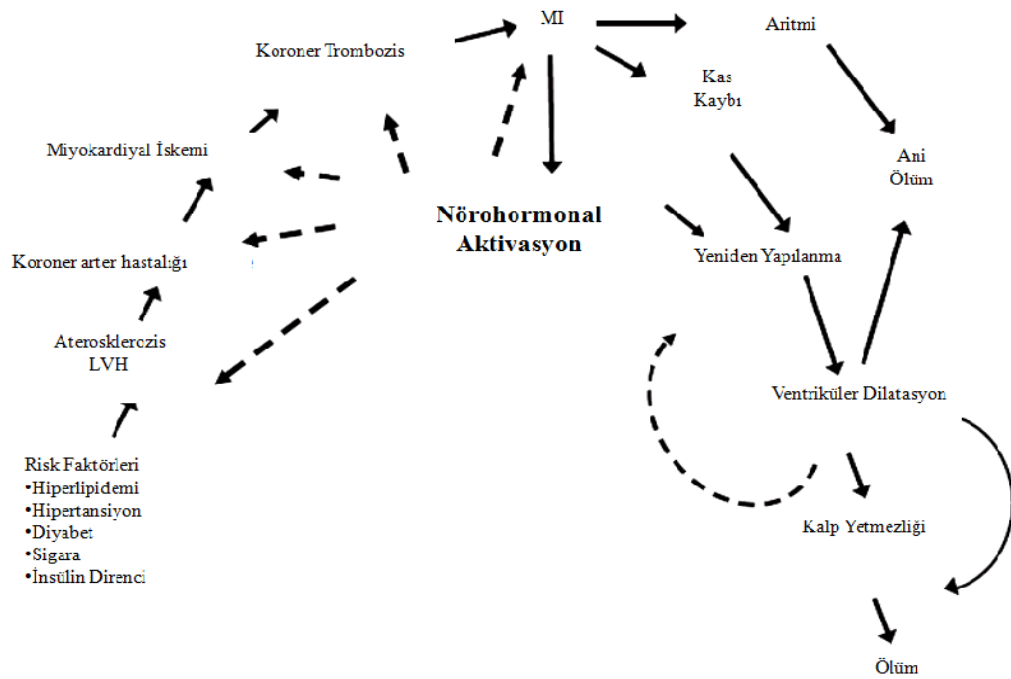
Kronik veya tekrarlayan stres bazal kan basıncı ve glukokortikoidlerin artışı ile ilişkili iken; akut stres kan basıncını, kalp hızını, plazma glukokortikoid konsantrasyonunu ve kan glikoz düzeylerini hızla arttırır. Kronik olarak yüksek olan glukokortikoidler kardiyovasküler hastalıklarda şikâyet ve ölümlerin artışına neden olur. Glukokortikoid reseptörlerindeki ve glukokortikoidleri metabolize eden enzimlerdeki değişiklikler hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalıklar ile ilişkili bulunmaktadır. Bu nedenle kronik strese bağlı olarak glukokortikoidlerin yükselmesi, stresin kalp ve damar sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerine katkı sağlamaktadır (Bechtold vd 2009).

2.1.3. Stres ve Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi (RAAS)

Önceleri kalp yetmezliği kalbin pompalama kapasitesindeki azalmaya bağlı olarak gelişen klinik bir sendrom olarak tanımlanırken, daha sonraları kalp yetmezliği miyokardiyal disfonksiyon ve aktive olan dengeleyici nörohormonal mekanizmalar

arasındaki sürekli etkileşim ile karakterize edildi. Bu nörohormonal mekanizmalar arasında sempatik sinir sistemi (SSS), RAAS ve sitokin sistemleri yer almaktadır. Bu sistemler akut dönemde baskılanmış olan miyokard fonksiyonunu ve kardiyovasküler homeostazı dengeleyebilirler. Ancak, bu sistemlerin uzun vadeli aktivasyonu kardiyak dekompanseasyon ve kalp yetmezliğinin ilerlemesine neden olan kardiyak yapı ve performans üzerindeki olumsuz etkilere sahiptir (Triposkiadis vd 2009).

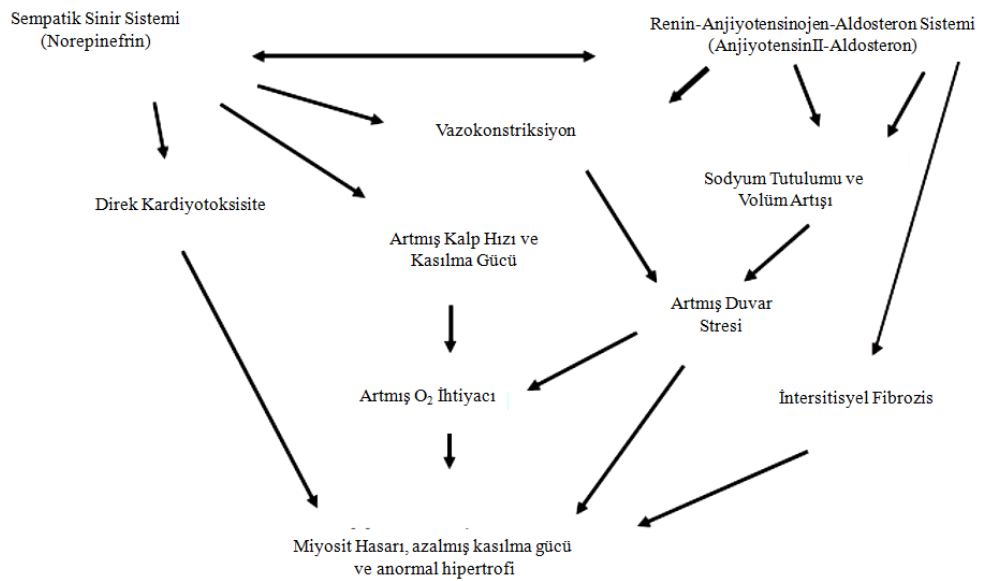
Kardiyovasküler hastalıkların gelişim sürecinde sadece miyokard ve vasküler yapıların bütünlüğündeki patolojik değişimler değil aynı zamanda özellikle SSS ve RAAS başta olmak üzere birkaç nörohormonal aksın aktivasyonunun da etkili olduğunun fark edilmesine bağlı olarak kardiyoloji alanı son yirmi yılda büyük değişim göstermiştir (Şekil 2.1) (Adams 2004).



Şekil 2.1 Sol ventrikül hipertrofisi (LVH) ve miyokard infarktüsü (MI) süreçlerinde; özellikle renin-anjiyotensin-aldosteron ve sempatik sinir sistemlerini de kapsayan olumsuz nörohormonal aktivasyonun temel rolü (Adams 2004).

Tromboz ve MI içeren bir dizi olayların oluşmasına neden olan ateroskleroz ve sol ventrikül hipertrofisi ile gelişim gösteren kardiyovasküler hastalıklar; hastalarda ilerleme gösterir ve çoğu zaman kalp yetmezliği ve sonunda ölüme sonuçlanırlar. MI

ve kalp yetmezliği öncesi gelişen tüm bu olaylar; SSS ve RAAS elemanları olan NE, anjiyotensin II (AngII) ve aldosteron gibi nörohormonal sistem elemanları aracılığı ile meydana gelir. Bu nörohormonların öneminin fark edilmesi, kardiyovasküler süreçlerde meydana gelen temel hastalık gelişimlerinin tedavisinde büyük avantaj sağlamıştır. Bu nedenle; nörohormonal aktivasyonun ve inhibisyonun düzenlenmesi kalp rahatsızlıklarında yeni ve etkili tedavilerin geliştirilmesi için özel bir öneme sahiptir. Kalp rahatsızlıklarında RAAS ve SSS'nin etkisi ile oluşan fizyopatolojik değişimler; sodyum tutulması, kalp kasılabilirliğinin azalması ve miyokardın aşırı hipertrofisi gibi olayları içermektedir (Şekil 2.2) (Adams 2004).



Şekil 2.2 Kalp hastalarında nöropinefrin, anjiyotensin II ve aldosteron ile aşırı uyarılmanın fizyopatolojik mekanizması (Adams 2004).

Miyokardiyal sistolik fonksiyon bozukluğu, kardiyak debi korunmasını amaçlayan nörohormonal hiperaktivite ile ilişkilidir. Bu cevabın nöronal kısmı SSS ile temsil edilirken; hormonal kısmı ise en önemlisi RAAS olmak üzere belli başlı bazı hormonların salgılanmasının artması ile temsil edilmektedir (Triposkiadis vd 2009).

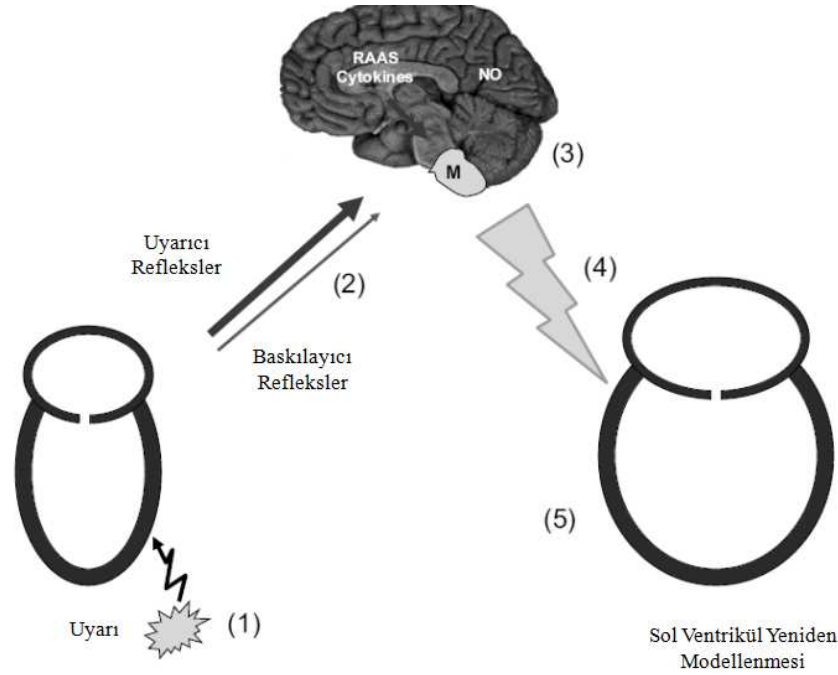
Sempatik sinir sistemi kardiyovasküler sistemin akut dönemde düzenlenmesinde görev almaktadır. Uzun süreli aktivasyonu kalp yetmezliği ile sonuçlanmaktadır. Kalp hastalığında artmış sempatik aktivite özellikle aşırı biçimde gelişen ventrikül hipertrofisi, sodyum tutulumu ve vazokonstriksiyonu içeren çeşitli fizyopatolojik

değişimler ile sonuçlanmaktadır (Adams 2004). Sempatik hiperaktivite artmış plazma NE seviyesi, merkezi sempatik akım ve aktive olmuş sempatik sinirler en NE'nin plazmaya yayılması ile kanıtlanır. Bununla beraber yapılan çalışmalar hipertansiyonu olan hastalarda SSS hiperaktivitesinin sol ventriküler diyastolik disfonksiyonuna bağlı olarak gelişen kardiyovasküler hastalık riskinde de artışa neden olabileceğini göstermişlerdir (Triposkiadis vd 2009).

Katekolaminlere bağlı olarak gerçekleşen kardiyak toksisite iyi bilinmektedir. Birçok seçkin ve çok önemli temel bilim çalışmaları “*Uzamış sempatik aktivasyon miyokard toksisitesine neden olur.*” hipotezinin önemini ortaya koymuştur. Aşırı miktarda bulunan NE; hipoksiye, siklik adenozin monofosfat (cAMP) artışına, oksidatif katekolamin metabolitlerinin oluşumuna, sarkolemmal geçirgenlik artışına bağlı olarak gerçekleşen ve kardiyomiyositlerde direkt ölüm ile sonuçlanan intraselüler kalsiyum yüklenmesine neden olur. Aşırı miktarda artmış NE salınımı ile oluşan sempatik aktivasyon, adrenerjik reseptörlerin aktivasyonunu sağlayarak, artmış miyokard hipertrofisine, kardiyomiyositlerin apoptozis veya programlı ölümlerinde artışa, kardiyomiyositlerde gen ekspresyonlarının farklılaşması ile kasılabilir ve metabolik proteinlerin zararlı yönde değişimlerine neden olur (Adams 2004, Triposkiadis vd 2009). Ratlarda kronik katekolamin uygulamasının; interstisyel fibrozise, beta adrenerjik reseptör aracılı azalmış inotropik cevaplara, miyosit apoptozisi ve özellikle sol ventrikül dilatasyonu ile artmış pompalama fonksiyon bozukluğuna neden olduğu gösterilmiştir (Triposkiadis vd 2009).

Kalp hastalıklarında gözlenen sempatik hiperaktivite, kardiyovasküler reflekslerdeki anormallikler ile yakından ilişkilidir. Sempatik hiperaktivite durumunda; arteryal baroreseptör refleksler gibi sempatoinhibitör kardiyovasküler refleksler anlamlı bir şekilde baskılanır. Bununla beraber kardiyak sempatik afferent ve arteryal kemoreseptör refleksleri içeren sempatoeksitatör refleksler arttırılır. Merkezi sinir sistemi de vücudun farklı kaynaklarından, kalbin yeniden yapılanması ve fonksiyon bozukluğu gelişiminde ana rol oynayan aktif mekanizmalardan bilgi alır. Örneğin; AngII ve aldosteron beyinde lokal olarak üretilmekte ve sempatik sinir sistemi aktivasyonu ile gelişen sistolik kalp yetmezliğine neden olmaktadır. AngII; AngII Tip 1 reseptör (AT-1) sayısının artışı, nitrik oksit (NO) inhibisyonu ve indirgenmiş

nikotinamid adenin aracılığı ile süperoksit anyon üretiminde artışa yol açarak sempatik uyarımın ve hastalık gelişiminin artmasına neden olur (Şekil 2.3) (Triposkiadis vd 2009).



Şekil 2.3 Sistolik kalp yetmezliğinde sempatik aktivasyon; 1- Uyarı kardiyak disfonksiyona neden olur ve kalp debisini azaltır. 2- İnhibitör sempatik kardiyovasküler reflekslerin zayıflatılması ve eksitatör sempatik kardiyovasküler reflekslerin güçlendirilmesi merkezi sinir sisteminde artmış sempatik uyarı girişi ile ilişkilidir. 3, 4- Sempatik uyarı çıkışının tonik artışına neden olan güçlendirilmiş kardiyovasküler sempatik afferent reflekslerin merkezi kolaylaştırılması; AngII, sitokinlerde artış ve NO'de azalış ile düzenlenmektedir. 5- Sol ventrikül (LV) intersitiumunda dilatasyon ve sistolik fonksiyon bozukluğuna (*LV remodelling*) neden olan sempatik uyarı çıkışındaki kronik artış, kardiyomiyositlerdeki yapısal ve fonksiyonel değişimler ile ilişkilidir. (m: medulla) (Triposkiadis vd 2009).

Uzamış sempatik sinir sistemi aktivasyonu, uyarılma-kasılma eşleşmesini olumsuz yönde etkiler ve kronik kalp yetmezliği gelişiminde merkezi rol oynayan apoptotik yolları artırır. Bu olay transgenik farelerde insan beta1-adrenerjik reseptörlerinin (ADRB1) başlangıçta kardiyak fonksiyonları arttırmasına rağmen ilerleyen zamanlarda patolojik hipertrofi ve kalp yetmezliğine neden olduğu gerçeği ile desteklenmiştir (Triposkiadis vd 2009). Hayvan modellerinde ADRB1 aşırı ekspresyonu sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu ve ventrikülün plastisitesinde zayıflama ile sonuçlanmaktadır. Sistolik disfonksiyonlu hastalarda ADRB1 blokajı, sol ventrikül işlevini arttırmakta ve ani ölümleri azaltmaktadır (Adams 2004). Kalp yetersizliğinde beta2-adrenerjik reseptörlerinin (ADRB2) rolü açıkça belirlenmemiştir. ADRB2 sinyalizasyonu,

inhibitör G-proteini (Gi) seviyesinde artışa neden olduğu için katekolamin artışını düzenleyen koruyucu antiapoptotik yolları aktive edebildiği öne sürülmektedir. Yapılan bir çalışma sonucunda; miyokard iskemisine karşı oluşan cevapta Gi sinyalizasyonunun seçici bir şekilde inhibe edilmesi ile MI büyüklüğünün ve apoptotik sinyalizasyonun anlamlı bir şekilde arttığı gösterilmiştir. Son yapılan çalışmalar ADR β 2 yokluğunun; artmış katekolamin seviyesi, kardiyak hipertrofi, fibrozis ve sonunda kalp yetmezliği ile ilişkili olduğunu göstermektedirler. Kalp yetersizliğinde beta3-adrenerjik reseptörlerinin (ADR β 3) rolü açıklığa kavuşturulamamıştır. Bununla beraber yapılan çalışmalarda; kalp yetmezliğinde NO üretimi artışı ve kalsiyum geçişini inhibe etme yolları ile geçici bir negatif inotropik etki gösteren ADR β 3 sinyalizasyonunda artış gözlenmiştir. Sempatik sinir sistemi işleyişini ayrıntılı bir şekilde anlamak ve buna müdahale edebilmek, kalp yetmezliği ile ilgili yaklaşımlarda fizyopatolojik ve teröpotik açılımların gelişmesini sağlayacaktır (Triposkiadis vd 2009).

Stres süresince sempatik aktivasyondaki artış renin üretimindeki artışa neden olur. Renin miktarındaki artış ise kan AngII seviyesinin yükselmesi ile sonuçlanır. Dolaşımdaki AngII artışı fizyolojik olarak aktif olan AT-1'lerinin uyarılmasını artırır ve buna bağlı olarak da stres süresince ön hipofiz ACTH, adrenal glukokortikoid, aldosteron, katekolaminlerin oluşumu ve salınımına katkı sağlar (Häfner vd 2012).

Stres ve özellikle depresyon durumlarında kardiyovasküler hastalıkların ilerlemesine rağmen RAAS'nin stres yanıtındaki rolü genellikle ihmal edilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalar, kardiyovasküler hastalık gelişimi ve ilerlemesinde RAAS'nin temel rolünü göstermiştir. Kardiyovasküler hastalıkların patogenezinin gelişiminde RAAS en önemli sistemlerden biridir. Stres koşullarında RAAS aktivasyonu kardiyovasküler hasar ile ilgili oksidatif stres, inflamasyon ve insülin direnci gibi bir dizi süreci uyarır (Häfner vd 2012). Özellikle RAAS blokajı, kardiyovasküler yeniden yapılanma, yüksek kan basıncı değerlerinin sürdürülmesi ile ilgili olan moleküler ve hücrel mekanizmaları durdurulabilmektedir (Volpe vd 2011). Bu nedenle, kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi için yaygın olarak kullanılan maddeler anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE; *angiotensin converting enzyme*) inhibitörleri ve AT-1 blokerleridir (Häfner vd 2012).

RAAS sadece dolaşımında etki gösteren bir hormonal sistem değildir. Beyninde dâhil olduğu birçok farklı dokuda AngII sentezlenmekte ve buna da lokal RAAS adı verilmektedir. Beyin RAAS'de AT-1'nün dağılımı HPA aksını takip eder. Bu nedenle stres cevabının oluşmasında HPA aksı ve RAAS arasında sıkı bir bağlantı bulunmaktadır (Häfner vd 2012).

Yapılmış olan birçok çalışma stres ile ilişkili depresyon semptomlarının ve sosyal ilişki bozukluklarının kardiyovasküler hastalıklar için bir risk faktörü olduğuna dikkat çekmiştir. Bunun yanı sıra depresif kişilerde akut strese karşı oluşturan fizyolojik yanıtın sağlıklı bireyler ile karşılaştırıldığında aynı olmadığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Özellikle sosyal izolasyon ve depresyon semptomları, kardiyovasküler hastalıklar ve beraberinde gelen ölümler için olumsuz yönde gelişim gösteren biyolojik ve davranışsal risk faktörleri olarak bilinmektedirler. Depresyonlu hastalarda HPA aks aktivasyonunun, sempatoadrenomedullar sistemin, kalbin otonom kontrolündeki değişimlerin ve davranışların stres ile ilişkili olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır. Akut ya da kronik stres adaptasyonunu sağlayan duyuşsal bilgi kaynaklarının yokluğunda strese karşı artmış yanıt, sosyal olarak izole bireylerde artmış ölüm oranlarının nedeni olarak gösterilmektedir (Häfner vd 2012).

Depresyonda RAAS'nin aktivasyonunun değiştiği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Ancak bugüne kadar RAAS; sosyal ilişkilerin eksikliği, depresyon ve kalp-damar hastalıkları arasındaki ilişkiyi açıklamak için ilgili bir sistem olarak kabul edilmemiştir. Kısıtlı sosyal ilişkiler ve depresyon bağlamında RAAS'nin stres ve depresyon üzerindeki rolü ile ilgili yapılan insan çalışmaları yetersizdir. Yapılmış olan iki klinik çalışmada depresif hastalarda aldosteron plazma düzeyleri yüksek olarak bulunmuştur. Murck ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada; depresyonlu hastalarda aldosteron seviyelerinin gece periyodunda anlamlı bir şekilde yükselmiş olduğu gösterilmiştir. Depresyonda RAAS'ni araştıran diğer çalışmada ise; depresif hastalarda aldosteron seviyesinin kontrol grubuna göre 2,77 kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Renin düzeylerinde ise hafif bir artış gözlenmiştir. Bu çalışmaların yanı sıra yapılan diğer çalışmalarda; yüksek AngII seviyesi ve ACE aktivitesi fenotipine neden olan insan RAAS polimorfizmleri ile depresyon görülme sıklığında artış arasında bir ilişki olduğu bildirilmiştir (Murck vd 2006, Häfner vd 2012).

RAAS'nin kardiyovasküler sistem üzerindeki fizyopatolojik etkileri, AngII ve aldosteron tarafından meydana getirilir. AngII ve aldosteron üretimi NE salınımını artırır ve sinir uçlarından NE alımını engeller (Adams 2004, Triposkiadis vd 2009).

AngII'nin kardiyovasküler etkileri sempatik aktivasyon ve aşırı NE salınımına benzerlik göstermektedir. Fazla miktarda AngII'ye kronik maruziyet, aşırı şekilde artmış ventriküler hipertrofiye, vazokonstriksiyona ve sodyum tutulumuna neden olur. Kalp yetmezliği olan hastalarda ACE inhibisyonu ile gelen kronik yarar AngII üretiminin inhibisyonuna bağlı olarak değil, bradikininin arttırılmasından kaynaklanan bir sonuçtur. Hayvanlarda iskemik hasarın başlatılmasından sonra seçici bir şekilde mineralokortikoid reseptör antagonistlerinin uygulanması, gelişen ventrikül dilatasyonu ve kontrol hayvanlarında görülen sistolik fonksiyonlarının azalmasını engellemektedir. Yapılan klinik çalışmalar bu bulguların insan kardiyovasküler hastalıklarında da geçerli olduğunu ortaya çıkarmaktadır (Adams 2004).

RAAS'nin bir elemanı olan anjiyotensin dönüştürücü enzim2 (ACE2; *angiotensin converting enzyme2*) birçok dokuda eksprese edilen ve aktif olan membran geçişli tip 1 glikoproteindir. ACE2'nin en fazla ekspresyonuna böbrek, endotel, akciğerler ve kalpte rastlanmıştır. ACE2 enziminin katalitik aktivite gösteren kısmı %61 oranında ACE enzimi ile aynı homolojiye sahipken, fonksiyonel olarak farklı özellik göstermektedir. ACE bir dipeptidaz olarak işlev görürken, ACE2 daha çok bir karboksipeptidaz işlevine sahiptir. ACE2'nin ana substratı AngII'dir. Bunun dışında düşük ilgiye sahip olduğu substratlarını; AngI, vazoaktif bradikinin, apelin3 ve 36 oluşturmaktadır. ACE2 aktivitesinin ana ürünü olan Ang1-7, AngII'nin tersine antiinflamatuvar ve antioksidant etki gösterir. AngII ve Ang1-7 arasındaki denge vasküler hastalık gelişimine yön veren önemli bir role sahiptir (Tikellis ve Thomas 2012). Yapılmış olan bir çalışma ile ACE2 ekspresyon düzeyindeki azalışın aterosklerotik plak oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir (Thomas vd 2010). Literatürde yer alan çalışmalardan bazıları ACE2 azlığının sistolik hipertansiyon gelişimi ile olan ilişkisini açıklamaya çalışmaktadır. ACE2 geninin sessizleştirildiği farelerde AngII uygulamasına karşı gelişen hipertansif cevapların arttığı ve böbrekte AngII'nin aşırı birikim gösterdiği, aynı zamanda erken kardiyak hipertrofinin geliştiği bildirilmiştir (Gurley vd 2006, Oudit vd 2007). Yapılmış olan son çalışmalar RAAS'nin dengeli bir şekilde çalışabilmesi için ACE2'nin önemini ortaya koymaktadır. Özellikle kardiyovasküler sistemin düzenlenmesinde ACE2, ACE'den

daha önemli bir yere sahiptir. Çünkü RAAS'nin dengeli bir şekilde çalışmasında lokal AngII ve Ang1-7 seviyeleri ACE2 tarafından düzenlenmektedir (Tikellis ve Thomas 2012). Yakın zamanda yapılmış olan bir çalışma ile kronik orta şiddetli egzersizin RAAS elemanları üzerindeki etkisi açıklanmaya çalışılmıştır. Sıçanlar 16 haftalık kronik orta şiddetli egzersiz uygulamasına tabi tutulmuştur. Kronik egzersiz uygulanan sıçanların beyindeki ACE2 miktarında sedanter sıçanlara göre anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir. Bu verinin uzun süreli yapılan egzersizin kan basıncı üzerindeki olumlu etkisini açıklayacak olan parametrelerden biri olduğu düşünülmektedir (Agarwal vd 2011).

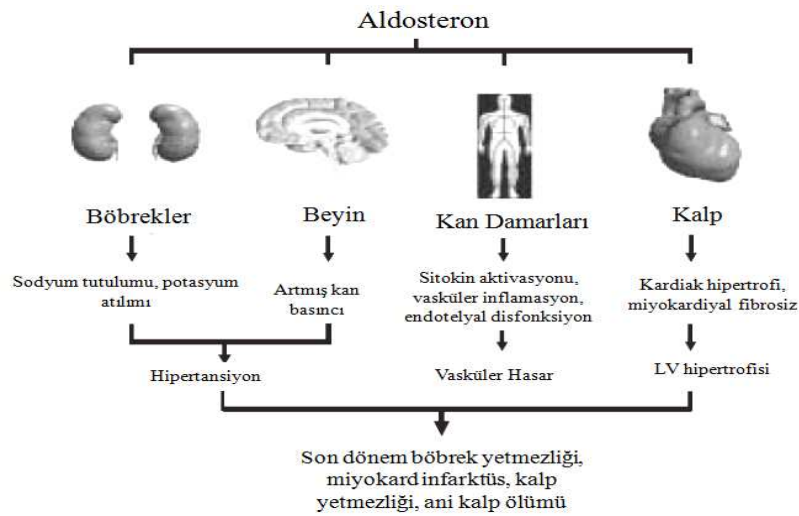
Depresyonda nöroendokrin değişimler uzun zamandır çalışılmaktadır ve bu çalışmalarda özellikle kortizol miktarındaki artış üzerinde durulmuştur. HPA sisteminin diğer hormonu olan aldosteron ihmal edilmiştir (Murck vd 2012). Bununla beraber kardiyomiyositlerde stres nedeniyle MR'nin aşırı aktivasyonu, aldosteronun aşırı düzeyde bulunmadığı durumlarda bile önem taşımaktadır (Adams 2004). Hayvan deneyleri aldosteronun ratlarda ve kemirgenlerde depresyon benzeri davranışa neden olduğunu ve AngII reseptör blokerlerinin stresi azalttığını göstermektedir. Bu sonuçlar aktive olmuş RAAS'nin sosyal izole ve depresif kişilerde sadece yüksek stres sonucu olmayabileceğini belki de doğrudan veya dolaylı olarak depresyon ile ilgili olduğunu göstermektedirler (Häfner vd 2012).

Aldosteron hipertansiyon, MI ve kalp yetmezliği gibi kardiyovasküler hastalığın tüm formlarını etkileyen önemli bir hormondur. Kardiyovasküler hastalıkların birçoğunun tedavisi aldosteronun fizyopatolojik yan etkilerinin spesifik antagonizmasını içermelidir (Adams 2004).

Kalp yetmezliği olan hastalarda aldosteron seviyesi normal bireylere kıyasla 20 kat yüksek bulunmuştur. Bu artışın öncelikle adrenal bezlerdeki üretiminin artışı ve bunu takiben yüksek plazma AngII konsantrasyonlarına bağlı olduğu düşünülmektedir. Aldosteronun miyokardiyal fibrozis gelişimini uyarıcı, kardiyovasküler yeniden yapılanma ve hastalık gelişimi süreçlerini kolaylaştırıcı elektrolit ve metabolik etkileri bulunmaktadır. Aldosteron NE alınımını baskılamasının yanı sıra endotelial fonksiyon üzerinde negatif etkiye sahiptir ve plazminojen aktivatör inhibitör-1 seviyesini artırır. Yapılan çalışmalar aldosteron antagonistlerinin kalp yetmezliğinde yararlı sonuçlarını

göstermiştir ve bu belki de aldosteronun NE üzerindeki etkilerinden kaynaklanmaktadır (Triposkiadis vd 2009).

Kardiyovasküler hastalıklarda aldosteronun rolünün anlaşılması, RAAS'nin aktivasyonunun olumsuz sonuçlarıyla ilgili daha fazla çalışma yapılmasını gerekli kılmıştır. Yapılan yeni araştırmalar bu önemli kardiyovasküler hormon hakkındaki geleneksel fikirleri değiştirmişlerdir. Başlangıçta kardiyovasküler hastalıklarda aldosteron üretimini sınırlandırmak için ACE inhibisyonunun anlamlı ve yeterli olduğu varsayılmaktaydı. AngII'nin aldosteron üretimini artırabilme kapasitesinin açık olmasının yanı sıra aldosteron üretimi ve salınımını düzenleyen diğer birçok aracının olduğu anlaşılmıştır. Aldosteron konsantrasyonlarının seri ölçümleri göstermiştir ki; ACE inhibisyonu aldosteronun dolaşımdaki konsantrasyonunu geçici bir şekilde baskılamaya neden olur (birkaç gün için). Başlangıçta ‘aldosteron kaçıışı’ denilen bu olay pozitif randomize ve kontrollü çalışmalar dâhil olmak üzere ACE inhibisyonunun önemli klinik yararlarını açıklayan çalışmaların değerini azaltmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarda; sol ventriküler sistolik disfonksiyonu ile beraber gelişen kalp hastalıklarında ACE inhibitörleri, AngII reseptör antagonistleri ve ADR β blokerleri kullanarak yapılan nörohormonal bloklama stratejilerinin, dolaşımdaki aldosteron miktarını azaltmada etkin olmadığı gösterilmiştir. Gelişen bilim aldosteronun böbreklerde sodyum taşınmasındaki etkinliğinin yanı sıra beyin, damar fizyolojisi ve kalpte birçok önemli role sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 2.4) (Adams 2004).



Şekil 2.4 Aldosteronun çeşitli fizyopatolojik etkileri (Adams 2004).

2.1.4. Stres ve Glukokortikoidler

Strese karşı oluşan kardiyovasküler yanıtların mekanizmasında glukokortikoidlerin rolü henüz tam olarak anlaşılammıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda glukokortikoidlerin birçok fiziksel strese karşı kan basıncını arttırıcı yöndeki etkilerinin, katekolaminlerin periferik etkilerini destekleyerek gerçekleştirdikleri düşünülmektedir (Bechtold vd 2009).

Strese maruziyet, HPA aksı uyararak hipotalamusun paraventricüler nükleusundaki hipofizotropik nöronları aktive eder. Bu nöronlar CRF gibi salgılatıcı hormonları salgırlar ve bu salgırların medien eminensin portal dolaşımına boşaltırlar. Bu salgılatıcı hormonlar ön hipofiz bezine etki ederek adrenokortikotropik hormon salgılanmasını sağlarlar. Bu hormon adrenal korteksin iç kısmına (zona fasikulata) etki ederek glukokortikoid hormonların (örneğin; sıçanlarda kortikosteron, insanlarda kortizol) sentez ve salınımını uyarır (Ulrich-Lai ve Herman 2009).

Hipotalamus-hipofiz-adrenal aksının aktivasyonu dolaşımdaki glukokortikoidlerin miktarının artması ile sonuçlanır. Plazma glukokortikoid seviyesinin en üst seviyelere ulaşması stres başlangıcından sonra dakikalar içinde gerçekleşir. HPA uyarılmasının iki adımlı hormonal mekanizması, sempato-adreno medullar aktivasyonu başlatan sinaptik mekanizmanın bekleme dönemine göre daha yavaş işler. Bu nedenle bu iki aşamalı mekanizmada etkisi güçlü ve nispeten daha uzun süreli salgılayıcı bölgeler bulunmaktadır. Daha sonra glukokortikoidler depolanmış enerjinin mobilizasyonunu ve periferik vazokonstriksiyon gibi sayısız sempatik aracılı etkileri potansiyalize eder. Ek olarak adrenal korteks sempatik sinir sistemi tarafından direkt olarak inerve edilir ve bu inervasyon kortikosteroid salınımını regüle edebilir. Bu nedenle HPA aksı ve SSS stres süresince enerji sağlamak ve kan basıncının devamlılığını sağlamayı da içeren birbirini tamamlayan birçok etkiye sahiptirler (Ulrich-Lai ve Herman 2009).

Glukokortikoidler vücutta hem genomik hem de genomik olmayan etkilere sahiptirler. Genomik etkileri GR'ne bağlanarak veya bazı dokularda ise MR'ne bağlanarak ortaya çıkar. Bu reseptörler ligand bağımlı olarak transkripsiyon faktörlerini etkilerler ve böylece gen transkripsiyonunda değişime neden olarak uzun dönemde etkilerini gösterirler. Mineralokortikoid reseptörleri endojen glukokortikoidlere büyük

ilgi gösterir hatta sirkadian ritimle salınan glukokortikoidlere büyük oranda bağlanırlar. Glukokortikoid reseptörleri ise kortikosteroidlere düşük ilgi gösterirler ve stres cevabında gerçekleştiği gibi kortikosteroidlerin miktarlarında yükselme olduğu zaman kortikosteroidlere bağlanma gösterirler. Buna karşılık glukokortikoidlerin genetik olmayan etkileri dakikalar içinde de meydana gelebilir ve böylece HPA aksının hızlı negatif geri beslemeli inhibisyonu için genomik olmayan sinyalizasyon, dolaşımdaki glukokortikoidlerin dakikalar içinde hızla artışı ile gerçekleşir. Genetik olmayan etkiler büyük ihtimalle hedef hücre membranı etkileşimi sonucunda meydana gelmektedir (Ulrich-Lai ve Herman 2009).

Yapılan çalışmalar; kronik ve sistemik glukokortikoid miktarındaki yükselişin, akut fizyolojik strese karşı kardiyovasküler ve katekolamin cevaplarında artışa neden olduğunu göstermektedirler. Kronik stres ile daha önce karşılaşılan streslere karşı kardiyovasküler yanıtın zayıflatılması söz konusu iken, yeni karşılaşılan ve yaşamı tehdit eden streslere karşı oluşturulacak kardiyovasküler cevaplar güçlendirilmektedir. Kronik stres uzaması normal kan basıncı artışını içeren sürekli bir dikkat durumuna neden olabilir. Stres süresince glukokortikoidlerin kronik artışının kardiyovasküler düzenleme üzerine olan merkezi etkileri ile ilgi literatürde çok az bilgi yer almaktadır. İnsanlar arasında stres ve glukokortikoidlere duyarlılık açısından önemli değişkenlikler bulunmaktadır. Bu nedenle stresin olumsuz etkilerine karşı bazı insanlar duyarlı iken, bazı insanlar dirençlidirler (Bechtold vd 2009).

Kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde glukokortikoidler, stres ve genetik yatkınlığın iç içe geçmiş rollerinin anlaşılması, kardiyovasküler hastalıklara karşı alınacak olan önlem ve uygulanacak tedaviler için yeni metotların geliştirilmesini sağlayacaktır (Bechtold vd 2009).

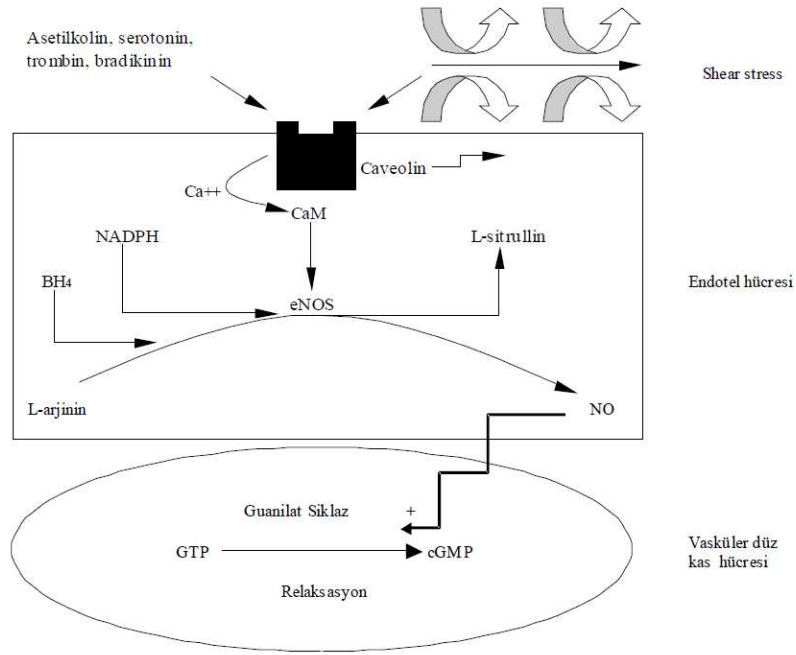
2.1.5. Stres ve Endotelial Nitrik Oksit Sentaz (eNOS)

Endotel kaynaklı gevşetici faktör olarak da bilinen nitrik oksit (NO); bir nitrojen ve bir oksijen atomundan oluşan, paylaşılmamış elektron içeren, pek çok reaksiyonu etkileyen zayıf bir oksidan veya indirgeyici bir bileşen olarak görev yapan, serbest radikal olarak da nitelendirilen, küçük bir moleküldür (Lowenstein vd 1994). Yüksüz bir molekül olduğu için membranlardan kolayca geçer ve eşleşmemiş bir elektrona

sahip olması nedeni ile hızlı reaksiyona girer. Yarı ömrü 20-30 sn kadardır (Akçakoyun 2004).

Damar endotelini büyük bir parakrin organdır. Çok sayıda faktör salgılayarak vasküler tonusu, hücre proliferasyonunu, trombogenezini, trombosit ve lökositler arası etkileşimini düzenler. Endotel; kompleks hücre membran reseptörleri, sinyal ileti mekanizmaları, vazoaaktif maddeler, tromboregülatuar maddeler ve büyüme faktörleri salgılayarak iç ve dış uyaranlara cevap verir. Kendi tonusunu düzenleyerek, kan akım ve dağılımını lokal ortam değişikliklerine göre ayarlar. Çoğu damar, akım artışına yani kayma stresine (*shear stres*) karşı dilatasyon yanıtını verir. Bu olaya akım aracılı dilatasyon (*flow-mediated dilation*, FMD) adı verilir. FMD'nin ana mediatörü endotel kaynaklı NO'dir (Coretti vd 2002).

Nitrik oksit; endotel hücrelerinde hücre zarının invajinasyonu ile oluşan *caveolae*'da lokalize endotelial NO sentaz'ın (eNOS) enzimatik etkisiyle prekürsörü olan L-arjininden sentezlenir. Caveolin-1, calmodulin'e bağlanır ve eNOS aktivitesini inhibe eder. Kalsiyumun (Ca^{+2}) calmodulin'e bağlanması Caveolin-1'i ayırır ve eNOS'u aktive ederek NO üretimine yol açar. Tetrahydrobiopterin (BH4) ve nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) gibi kofaktörlerde NO üretiminde rol alır (Şekil 2.5). Caveolae kolesterol ve sfingolipidden zengin, fosfolipidden fakirdir. Caveolae, birçok dokuda G proteini, protein kinaz gibi reseptörlerin kümелendiği bir yapıdır. Hiperkolesterolemi gibi hücre membranının lipid kompozisyonunda değişikliğe yol açan faktörler, caveolae'nın fonksiyonunu bozarak NOS aktivitesini olumsuz yönde etkileyebilir (Janssens vd 1992, Behrendt ve Ganz 2002).



Şekil 2.5 Endotelial hücrelerde NO (Nitrik oksit) üretimi. (NO: Nitrik oksit, eNOS: Endotelial nitrik oksit sentaz, BH4: Tetrahidrobiopterin, NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat, CaM: Kalmodulin, GTP: Guanozin trifosfat, cGMP: siklik guanozin monofosfat, Ca⁺²: Kalsiyum) (Ross 1999).

Nitrik oksit, endotel kaynaklı önemli bir vazodilatatördür (Davignon ve Ganz 2004). Nitrik oksit; endotel bağımlı vazodilatasyonu, AngII ve endotelin gibi endotel kaynaklı vazokonstriktörlerin etkisine karşı koyarak sağlar (Rubbo vd 2002). Endotel disfonksiyonunun esas göstergesi, NO tarafından sağlanan endotel bağımlı vazodilatasyonun bozulmasıdır (Davignon ve Ganz 2004). Nitrik oksit üretimi ya da aktivitesindeki bozulma; vazokonstriksiyon, platelet agregasyonu, düz kas hücre proliferasyonu, lökosit adezyonu ve oksidatif stres gibi ateroskleroza arttıran etkilere yol açar (Endres vd 1998).

Bazal koşullarda endotel; damarı göreceli olarak dilate durumda tutmak üzere işlev görür. Bununla birlikte endotel, gerilme stresi gibi değişik fiziksel uyarılara tepki verme kapasitesine sahiptir. Endotel hücre membranı “kalsiyumla aktive olan potasyum kanalları” gibi özelleşmiş iyon kanalları içerir. Gerilme stresi ile karşılaşınca hiperpolarize olan endoteldeki bu kanallar açılır. Hücre içine kalsiyum girişi artar. Kalsiyum kalmodulin aracılı olarak eNOS’ı aktive eder ve NO üretimini başlatır (Janssens vd 1992, Joannides vd 1995).

Memelilerde NO sentezleyen üç değişik NOS vardır. NO sentezi ile ilgili ilk bilgiler bağışıklık sistemi (inflamatuvar) hücreleri üzerinde yapılan gözlemlerle elde edilmiştir. İnaktif inflamatuvar hücrelerde NO saptanmazken bu hücrelerin aktive edilmesiyle NO salgıladıkları saptanmıştır. Bu nedenle inflamatuvar hücrelerdeki NOS “uyarılabılır NOS” (iNOS; *inducible* NOS) olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra inflamatuvar hücrelerin aksine endotelial ve nöronal dokuların sürekli olarak NO üretilip, salgılandığı saptandı ve önceleri bu dokulardaki NOS’a “esas NOS” (cNOS; *constitutive*) ismi verildi. Daha sonra köken aldıkları dokulara göre eNOS (endotelial) ve nNOS (nöronal) olarak isimlendirildiler (Akçakoyun 2004). NOS’un tüm izoformları kardiyovasküler sistemde düzenleyici role sahiptirler. Kan damarlarını dilate formda tutarak kan basıncını düzenleyen ve birçok damar koruyucu ve antiaterosklerotik etki gösteren eNOS, en önemli izoformdur (Balligand vd 2009).

Hücre içi ve hücre dışı birçok molekül NO’i stabilize eder veya kimyasal olarak yıkar. Hücre içi yerleşimi kararsız olan NO’in etkilerinin NOS tarafından kontrol edildiği düşünülmüş ve bu konuda birçok çalışma yapılmıştır. NO’in hücre çekirdeğinde guanilat sentaz geninide içeren birçok genin transkripsiyonunu arttırdığı gösterilmesine rağmen, NOS hücre çekirdeğinde saptanamamıştır. NOS’ın mitokondri, endoplazmik retikulum ve golgi cisimciğinde bulunduğunu gösterilmiş fakat fonksiyonu tam olarak açıklanamamıştır. NOS’ın hücre iskelet molekülleri ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Bu ilişkinin kayma stresi için mekanoreseptör olarak görev aldığı tahmin edilmektedir (Akçakoyun 2004).

Değişen kayma streslerinde eNOS; damar çapının akut ve kronik regülasyonu, stres koşullarında kardiyak inotropik, lusitropik ve kronotropik durumlarının kontrolü, kalbin yeniden yapılanması için hücre uyarımını sağlaması açısından önemli fizyolojik etkilere sahiptir. Yapılan genetik çalışmalar sonucunda eNOS’ı kodlayan gen; ateroskleroz ve hipertansiyon gibi hemodinamik kuvvetlere karşı gelişen kronik adaptasyon, egzersizle uyarılan periferel vasküler direnç gibi patolojik durumları değiştirici bir gen olarak işaret edilmektedir. Bu veriler eNOS ve insan hastalıkları arasındaki ilişkiyi desteklemektedir. eNOS’ın bir hastalık geni olduğuna dair hiçbir kanıt olmamakla birlikte birçok kardiyovasküler risk faktörü oksidatif strese, eNOS azalmasına ve endotelial disfonksiyona yol açar (Balligand vd 2009).

Kan basıncı ve organ kan akımının düzenlenmesi için gerekli olan homeostatik mekanizmaların başında, eNOS aracılı olarak gerçekleşen kimyasal olaylar gelmektedir. Kan basıncındaki her hangi bir değişim, sistemik ve lokal fizyolojik düzeltme mekanizmalarının çalışmasını uyarır. Miyojenik tonusun, katekolaminlerin lokal fonksiyonlarının ve RAAS'nin düzenlenmesi endotelden NO'nin parakrin üretimi ile gerçekleşir. Bu geri bildirim mekanizmalarının kan basıncı üzerindeki etkilerinin hızı birbirlerinden çok büyük farklılıklar gösterebilir (Balligand vd 2009).

Endotelde eNOS sürekli olarak sentezlenmektedir. Bunun yanı sıra endotel hücresi ile yapılan hücre kültürü deneylerinde, eNOS sentezinin birçok faktör tarafından artırılıp, azaltıldığı gösterildi. Kayma stresi, lizofosfotidilkolin (yağ asitlerinden birini kaybetmiş bir fosfolipid), cGMP analogları eNOS sentezini doğru orantılı şekilde arttıran faktörlerdir. Düzenli egzersiz yaptırılan köpeklerde eNOS düzeyi artmıştır. eNOS aktivitesini azaltan faktörler ise TNF- α (tümör nekrozis faktör-alfa), okside LDL ve hipoksidir. Bu durumlarda eNOS'a ait haberci ribonükleik asitin (mRNA) posttranskripsiyonel ömrünün kısalması, eNOS sentezinin azalmasında önemli rol oynar. Ayrıca caveolea'nın transmembran proteini olan caveolin de eNOS inhibisyonuna neden olabilir. Bu inhibisyon calmodulin-Ca⁺² kompleksi tarafından tamamen ortadan kaldırılır. Aterosklerotik plak üzerindeki endotel hücrelerinde eNOS sentezinin azalmadığı gösterilmiştir. NO normal şartlarda sürekli olarak salınırken, çeşitli fizyolojik agonistler, kayma stresi ve farmakolojik ajanlar da eNOS enzimini stimüle ederek NO sentezini arttırlar. Endotel kaynaklı NO kardiyovasküler sistemde çeşitli etkilere sahiptir. eNOS mutasyonu endotel disfonksiyona neden olarak; koroner spazma, MI'e ve hipertansiyon eğilimine yol açar (Akçakoyun 2004).

Hipertansiyon vazokonstriktör maddelerde bir artışa veya vazodilatör maddelerdeki bir azalmaya bağlı olarak endotel kaynaklı vazoaktif faktörler arasındaki dengesizlik nedeniyle olabilir. Hipertansiyonda azalmış NO biyoaktivitesi tanımlanmıştır. Hipertansiyondaki anormal endotel fonksiyonunun arkasındaki en önemli mekanizmanın azalmış NO aktivitesi veya NO seviyesi olduğu düşünülmektedir. Hipertansiyonda endotelyal NO seviyesinin veya aktivitesinin azalmasının birkaç nedeni vardır. Bunlar; NO'nin aşırı degradasyonu, eNOS'ın azalmış aktivitesi veya seviyesi, eNOS'ın substratı olan L- arjininde azalma, NO'nin transdüksiyon zincirinde anormallikler, asetilkolinin muskarinik reseptörlerinde anormallikler. Bu

mekanizmalardan L-arjinin seviyesinin, NO seviyelerini azaltacak düzeylere ulaşmadığı anlaşılmıştır. Endotel hücrelerindeki reaktif oksijen türleri, başlıca süperoksid anyonu, NO ile etkileşir ve onu inaktive ederek endotel disfonksiyona yol açarlar. Ayrıca hipertansiyonla birlikte Ang II aktivitesi artar. AngII, damar dış yüzeyinde, düz kas hücresi ve endotelde reaktif oksijen türleri meydana getiren NADPH/ nikotinamid dinükleotid (NADH) oksidazı uyarır. Oluşan reaktif oksijen ajanları endotel disfonksiyona, hücre büyümesi ve inflamasyona yol açar. Hipertansiyon gelişiminde en önemli rolü oynadığı düşünülen olay ise NO'in artmış degradasyonudur (Akçakoyun 2004).

Egzersiz kalp atım hızını arttırarak kan akımı ve damar kayma stresinin artışına neden olur. Deney hayvanları ile yapılan çalışmalar, egzersizin damar dokusundaki endojen NO üretimini arttırdığını göstermektedir. Damar dokusunda endojen NO üretiminin artması egzersizin yararlı etkisi olarak kabul edilmektedir. Hintze ve arkadaşlarının 1993 yılının başlarında yapmış oldukları bir çalışmada, kronik egzersiz yapan köpeklerde L-arjinin bağımlı yolda asetilkolin ile indüklenmiş vazodilatasyonun arttığı gösterilmiştir. Egzersizle artış gösteren NO bağımlı vazodilatasyon aynı zamanda sıçanlar ile yapılan çalışmalarda da tanımlanmıştır. NO ve endotelial fonksiyon gelişimi arasındaki direkt ilişkiyi gösteren insan çalışmaları da bulunmaktadır. Koroner kan akımı için NO'in endotelial fonksiyon gelişimi üzerine olan olumlu etkisi, kronik kalp yetmezliği ve koroner arter hastalarında yapılan egzersiz çalışmaları ile gösterilmiştir (Balligand vd 2009).

Barbieri ve arkadaşlarının 2012 yılında yapmış oldukları bir çalışmada kronik strese maruz kalmış farelerde vasküler endotelial büyüme faktöründeki (VEGF) artışına bağlı olarak eNOS seviyesindeki artış *Western Blot* analizleri ile tayin edilmiştir. Bu çalışmada stres grubundaki tümör örneklerinde kontrol grubuna göre eNOS seviyesinde anlamlı bir artış bulunmuştur. eNOS geninin mutant olduğu farelerde ise kronik stres tümör büyümesini uyarınmamıştır. Bu bulgular, stres ile uyarılmış tümör büyümesinde eNOS enziminin rolünün olabileceğinin kanıtı olarak kabul edilmektedirler (Barbieri vd 2012).

2.1.6. Stres ve Endotelin- 1

Vasküler tonusun sağlanması için vasküler endotelden salgılanan vazoaktif maddeler sadece dilatör etkili mediatörler olmayıp aynı zamanda vazokonstriktör mediatörlerin de varlığı söz konusudur. Vazokonstriktör mediatörlerin en iyi tanımlanmış olanı endotelinlerdir (ET). Endotelinler; ET- 1, 2 ve 3 olmak üzere her biri 21 aminoasit içeren bir peptid ailesidir. Endotelin-1 (ET-1) en çok endotel hücrelerinde bulunur ve bilinen en güçlü vazokonstriktör ajandır. Bunun yanı sıra kalp, böbrek, merkezi sinir sistemi ve arka hipofizde üretilmektedir. ET-2 ise endotel hücrelerinde, kalp ve böbrekte üretilir. ET-3 endotel hücreleri dışında endokrin, gastrointestinal ve merkezi sinir sisteminde üretilir (Agapitov ve Haynes 2002).

ET-1 üretimi vazoaktif hormonlar, büyüme faktörü, hipoksi, kayma stresi, lipoproteinler, serbest radikaller, endotoksin gibi çeşitli birçok uyarıcı tarafından artırılır. ET-1 üretimi baskılanması ise endotel kaynaklı NO, nitrovazodilatörler, natriüretik peptid, heparin ve prostaglandinler tarafından gerçekleştirilir (Agapitov ve Haynes 2002). ET-1 üretiminin artışı birçok deneysel hipertansiyon modelinde gösterilmiş bulunmaktadır (Schiffrin 1998).

ET-1 sentezi karmaşık olup preproendotelin adı verilen öncü bir molekülden sentezlenir daha sonra büyük endoteline dönüşür ve nihayet endotelin dönüştürücü enzimler (*endothelin-converting enzymes*; ECE-1 ve 2) vasıtasıyla aktif ET-1'e dönüşür. Vazodilatör uyarılara cevap olarak hızla salınıp saniyeler içinde inaktive olan NO'nin tersine, ET-1 bağımlı konstrüksiyon yavaş başlangıçlıdır ve saatler hatta günlerce devam eder. ET-1'in vasküler tonus regülasyonunda primer rolü tonik vazokonstriktör etkisine bağlıdır (Schiffrin 1998, Spieker vd 2001, Agapitov ve Haynes 2002, Stephen ve Stephen 2005).

ET-1'in kompleks vazoaktif etkileri Endotelin- A (ET-A) ve Endotelin- B (ET-B) olmak üzere iki reseptör aracılığı ile gerçekleşmektedir. ET-A damar düz kas hücrelerinde yer almaktadır ve vazokonstriksiyondan sorumludur. ET-2 ve 3 ise ET-A üzerinden uzun süreli olarak gerçekleşen bir vazokonstriksiyon öncesi NO ve prostasiklin aracılı geçici bir vazodilatasyona neden olurlar. ET-B reseptörü ise damar endotel hücrelerinde yer almakta ve endotel kaynaklı vazodilatörlerin salınımına

aracılık ederek vazodilatasyonda rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda NO ve ET-1'in otokrin geri bildirim mekanizması ile birbirlerini kontrol ettikleri gösterilmiştir (Agapitov ve Haynes 2002, Stephen ve Stephen 2005,).

ET-1'in ET-A reseptörü aracılığı ile gerçekleştirdiği fizyolojik etkileri kan basıncının korunmasında önemlidir. ET-1'in fizyolojik etkilerinin toplamı kan basıncını arttırıcı yöndedir. Endojen ET-1'in kardiyovasküler etkileri ET-A ve B reseptörleri aracılı etkilerinin arasındaki denge sonucu gerçekleşmektedir. Bu nedenle reseptörlerinin sayı veya fonksiyonlarının değişmesi ile hastalıklarda endojen ET-1'in kardiyovasküler etkileri değiştirilebilir. Örneğin; NO aktivitesindeki azalmaya bağlı olarak gerçekleşen endotel fonksiyon bozukluğu durumlarında ET-B reseptörü aracılı vazodilatasyon azaltılıp, ET-A reseptörü aracılı vazokonstriksiyon arttırılabilir. Endotelin reseptör sayısı birçok değişik faktör tarafından düzenlenmektedir. AngII ve forbol esterleri endotelin reseptörlerinin sayısını azaltırken, iskemi ve siklosporin endotel reseptör sayısını arttırmaları (Agapitov ve Haynes 2002).

Endotelin-1 vazoaktif özelliklerine ek olarak yine aynı reseptörler aracılığı ile düz kas hücre proliferasyonunu uyarır. Bu sayede vasküler yapılanma ve lökosit adhezyonuna katkıda bulunur. ET-1 aynı zamanda inotropik, kemotaksik ve mitojenik özelliklere de sahiptir. Ek olarak RAAS, vazopressin, atriyal natriüretik peptidi etkileyerek ve sempatik sinir sistemini uyararak su ve tuz homeostazisinin düzenlenmesinde görev almaktadır. Endotelinin genel etkisi kan basıncı ve damar tonusunu arttırıcı yöndedir. Bu nedenle endotelin antagonistleri; bölgesel ve sistemik vazokonstriksiyon ve hücre çoğalması ile birlikte görülen hipertansiyon, pulmoner hipertansiyon, kronik kalp yetmezliği ve kronik böbrek yetmezliği gibi kalp, damar ve böbrek hastalıklarının tedavisinde önemli bir role sahip olabilirler (Schiffrin 1998, Spieker vd 2001, Agapitov ve Haynes 2002, Akçakoyun 2004, Stephen ve Stephen 2005).

Endotelinin sempatik sinir sistemi ve renin anjiyotensin sistemi aktivasyonu aracılığı ile neden olduğu vazokonstriktör ve mitojenik etkileri, onun kardiyovasküler hastalıkların patogeneğinde muhtemel bir bileşen olduğunun göstergeleridir. ET-1 in mitojenik etkisinin ateroskleroz gelişiminde katkısı olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. ET-1 platelet kaynaklı büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü ve

epidermal büyüme faktörüne karşı ET-A reseptörü aracılığı ile oluşturduğu yanıt sonucu insan vasküler düz kas hücrelerinde çoğalmaya neden olur. Bu nedenle anti-endotelin tedavisi anti-hipertansif etkisinin yanı sıra beklide anti aterosklerotik olabilir (Agapitov ve Haynes 2002).

ET-1, in vitro koşullarda pozitif inotropik ve kronotropik etkiye sahiptir. Hayvanlarda düşük doz endotelinin pozitif inotropik etkisi varken yüksek dozu negatif inotropik etkiye neden olmaktadır. Bu etkisi muhtemelen koroner vazokonstriksiyon ve yüksek ard yükten kaynaklanan miyokardiyal iskemi nedeniyle gerçekleşmektedir. İnsan ET-1'in sistemik uygulaması kardiyak debiyi azaltır. Bu etkisi ise muhtemelen artmış art yük ve baroreseptör aracılı azalmış kalp atım hızından kaynaklanmaktadır (Agapitov ve Haynes 2002).

ET-1 arteriyal hipertansiyon, aterosklerozis ve kalp yetmezliği gibi önemli hastalıkların patogenezeine katkıda bulunur. Aterosklerotik vasküler rahatsızlığı bulunan hastalarda ET-1 seviyeleri yüksek bulunmuştur (Spieker vd 2001). Kalp içine ET-1 enjeksiyonu koroner vazokonstriksiyon ve bunun nedeni ile gelişen miyokardiyal iskemi ve ölümcül aritmilere neden olur. Bu nedenle endotelin antagonistleri antiaritmik ajan olma potansiyeline sahiptirler (Agapitov ve Haynes 2002). Kardiyovasküler hastalık modellerinde ET reseptör antagonistleri üzerine yapılmış olan birçok çalışma bulunmaktadır. ET reseptör antagonistleri arteriyal hipertansiyonda vasküler ve miyokardiyal hipertrofi gelişimini önlemişlerdir. Deneysel olarak ET reseptör blokajının hiperkolestrolemiye bağlı olarak aterosklerozisde gelişen endotelial fonksiyon bozuklukları ve yapısal vasküler değişimleri önlediği gösterilmiştir. Deneysel iskemi çalışmasında ET reseptör antagonistleri uygulaması; infarkt büyüklüğünü azaltmış ve miyokard infarktüsü sonrası gelişen sol ventrikül yeniden yapılanmasını engellemiştir. Spesifik ET-A reseptör antagonisti olan BQ123 uygulaması, deneysel kalp yetmezliği modelinde yaşama oranını anlamlı bir şekilde yükseltmiştir. Doğumsal kalp yetmezliği, arteriyal hipertansiyon gibi birçok klinik vakada, ET reseptör antagonistlerinin tek başına veya beraber kullanılması hastaların klinik belirtilerinde iyileşmeye neden olmuştur. Primer pulmoner hipertansiyon veya pulmoner hipertansiyon ile ilişkili skleroderma hastalarında ET reseptör antagonistleri ile tedavi egzersiz kapasitesinde iyileşme ile sonuçlanmıştır. ET reseptör antagonistleri RAAS antagonizmasına ek yararlar sağlayarak kalp yetmezliği tedavisinde kullanılabilecek yeni ve umut veren

teröpotikler olarak değerlendirilmektedirler. Bu nedenlerden dolayı çeşitli kardiyovasküler hastalıkların tedavisinin geliştirilmesi için kullanılabilecek potansiyel hedefler haline almışlardır. Klinik çalışmalar, ET reseptör antagonistlerinin hastalık ve ölüm üzerine etkilerini detaylı bir şekilde açıklamaya yönelik olarak devam etmektedirler (Spieker vd 2001, Agapitov ve Haynes 2002).

Uzun dönem anti-endotelin tedavisi, semptomların düzeltilmesi ve kalp yetmezliğinin ilerlemesini olumlu yönde değiştirmeyi sağlayabilir. Endotelinin son dönem böbrek hastalıklarında, skleratik renal değişimlerin oluşmasına katkı sağladığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiş bulunmaktadır. Anti-endotelin kullanımı ile gerçekleşecek olan tedaviler, kronik böbrek yetmezliği için RAAS inhibisyonu ile gerçekleşen ve bilinen yararlarla ek yararlar sağlayabilir. Klinik araştırmalar esansiyel hipertansiyon, pulmoner hipertansiyon ve kalp yetmezliği olan hastalarda endotelin antagonistlerinin potansiyel olarak önemli faydalarını göstermiştir (Agapitov ve Haynes 2002).

ET-1 endotel hücre kültüründe ECE aktivitesini ve izole edilmiş sıçan mezenterik dokusunda doku RAS'ni arttırmaktadır. Ek olarak izole edilmiş kortikal zona glomerulosa hücrelerinde aldosteron salınımını ve medullar kromafin hücrelerden adrenalın salgılanmasını arttırmaktadır. AngII doku düzeyinde ET-1 seviyesini ve ECE aktivitesini arttırmaktadır. AngII'nin hemodinamik ve proliferatif etkileri ET-A reseptör antagonistleri ile bloklanabilmektedir. Bu sonuçlar kalp yetersizliği gibi hastalıklarda AngII ve ET arasında pozitif geri bildirim mekanizmasının yer aldığı bir ilişkinin varlığını göstermektedir. Endotelin sisteminin baskılanması ACE inhibitörü veya anjiyotensin reseptör blokajına direnç gösteren kalıcı RAAS aktivasyonu olan hastalarda yardımcı bir tedavi yöntemi olabilir (Agapitov ve Haynes 2002).

2.1.7. Stres ve Nesfatin-1

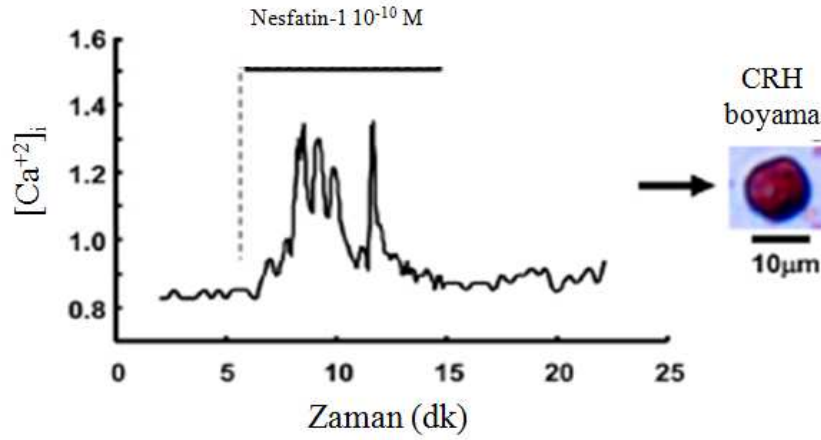
Nesfatin-1 NTS, LC, DR nükleusları ve paraventriküler nükleusu da (PVN) içeren stres ile ilişkili yerlerde dağılım göstermektedir. Nesfatin-1; oksitosin, proopiomelanokortin (POMC), PVN'da CRF, beyin sapında NE ve 5-HT salgılayan nöronlar ile kolokalizedir. PVN'da CRF, ACTH ve kortikosteron salınımını yönetir. Bu olay HPA aksının stres cevabında karakteristik bir rol oynamasına neden olur. NE ve 5-

HT, HPA aksını modüle ederler. Sıçanlarda intraserebroventriküler (icv) nesfatin-1 uygulaması korku ile ilişkili davranış oluşumuna neden olmakla beraber stres ile ilişkili maddeler olan ACTH ve kortikosteron plazma seviyelerini arttırmaktadır. Hipotalamus ve beyin sapında yer alan strese duyarlı nesfatin-1 nöronlarının stres ile ilgili diğer sistemleri aktive etmesi nedeni ile merkezi nesfatin-1 sisteminin stres cevabının oluşumundan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle de merkezi nesfatin-1 sistemi, insanda stres ile ilişkili hastalıkların tedavisi için potansiyel bir terapatik hedef olarak tanımlanmaktadır. Çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular, stres ve nesfatin-1 arasında bir bağlantının olduğunun kanıtları olarak kabul edilmektedir. Fakat halen nesfatin-1'in stres cevabını düzenlemede hangi nöronal mekanizmalar aracılığı ile rol aldığı tam olarak açıklanamamıştır (Yoshida ve Maejima 2010).

Birçok hayvan modelinde nesfatin-1'in merkezi uygulamasının, anoreksik ve stres ilişkili davranışların oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir (Yoshida ve Maejima 2010). Merkezi α -MSH (alfa melanosit stimulan hormon) uygulamasının hipotalamustaki NUCB2 mRNA seviyesini arttırdığı Yosten ve arkadaşlarının 2010 yılında yapmış oldukları çalışma ile gösterilmiştir (Yosten ve Samson 2010). Yapılan başka bir çalışma ile de nesfatin-1'in anoreksik etkisinin CRH yolağını içerdiği gösterilmiştir. CRH ve melanokortin yolakları ise stres ile ilişkili yolaklardır (Liu vd 2007, Stengel vd 2009).

Nesfatin-1'in icv uygulaması plazma ACTH ve kortikosteron seviyelerini arttırmaktadır (Könczöl vd 2010, Yoshida ve Maejima 2010). Bu sonuçlar merkezi nesfatin-1 sisteminin stres tarafından uyarılarak CRH, NE ve 5-HT nöronlarını ve HPA aksını aktive ettiğini göstermektedir. Böylece merkezi nesfatin-1 sistemi, merkezi ve periferel stres cevaplarının oluşmasına yol açmaktadır. Bu mekanizma nesfatin-1 ile indüklenmiş olan stres ile ilişkili davranışların temelini oluşturmaktadır. Nesfatin-1'in CRH salgılamasındaki etkinliğinin, hücre içi kalsiyum seviyesini artırarak gerçekleştirdiği PVN'dan izole edilen ve CRH salgılayan nöronların sitozolik Ca^{+2} seviyesi ölçümü sonucunda gösterilmiştir. Bu çalışmada merkezi nesfatin-1 uygulamasının, stres oluşturulmuş sıçanlarda CRF, NE ve 5-HT nöronlarını aktive ederek plazma ACTH ve glukokortikoid seviyelerini yükselttiği bulunmuştur. Nesfatinin bu etkisini, direkt bu nöronlardaki intrasellüler Ca^{+2} konsantrasyonunu arttırarak gerçekleştirdiği bildirilmektedir (Şekil 2.6). Bu nedenlerle merkezi nesfatin

sistemi stres ilişkili hastalıklarda potansiyel bir terapatik hedef olarak gösterilmektedir (Yoshida ve Maejima 2010).



Şekil 2.6 Nesfatin-1'in PVN bölgesindeki CRH nöronlarında intrasellüler Ca^{+2} konsantrasyonuna etkisi (Yoshida ve Maejima 2010)

Nesfatin-1'in icv enjeksiyonundan sonra plazma ACTH seviyesinin 10 dk ve kortikosteron seviyesinin 15 dk içinde yükselmesi daha sonra aldosteronun 30 dk kortikosteronun ise 60 dk sonra bazal seviyelerine dönüşleri söz konusu olmuştur. Daha önceden yapılmış çalışmalarda stres ile ilişkili diğer peptitlerin merkezi uygulaması veya akut hareketsizlik stresi sonucunda, ACTH plazma seviyesi benzer sürelerde yükselme gösterirken, kortikosteronların plazma seviyelerindeki yükselme daha uzun zamanlarda gerçekleşmiştir. Bu bulgu, büyük ölçüde nesfatinin stres cevabının oluşumunda erken dönemde etkinlik gösterdiğinin bir kanıtı olarak kabul edilebilir (Yoshida ve Maejima 2010).

c-Fos, transkripsiyon faktörlerinin ani erken gen ailesine ait olan bir hücresel proto-onkogendir. Nörobilimciler nöronal aktivitenin dolaylı bir göstergesi olarak c-Fos ekspresyonu ölçümü yaparlar. Çünkü nöronlarda aksiyon potansiyeli başladığı zaman sıklıkla c-Fos eksprese edilir. Bu nedenle nöronlardaki c-Fos mRNA artışı yeni gelişmiş olan aktivitenin bir göstergesi olarak kabul edilir (Vanelzakker vd 2008). Stresin nesfatin-1 üzerine etkisini araştıran çalışmalarda da ilgili nöronal aktivasyonu belirleyebilmek için c-Fos protein ekspresyonlarına bakılmaktadır (Yoshida ve Maejima 2010). Akut hareketsizlik stresi, hipotalamusun PVN ve supraoptik nukleusunda (SON), beyin sapında yer alan NTS, LC, DR nukleusları ve arkuat (ARC) nukleuslarında

bulunan nesfatin-1 üreten nöronların c-Fos ekspresyonunu arttırmaktadır. Aynı zamanda icv nesfatin-1 uygulaması PVN, SON, NTS, LC, DR ve medyan raphe nükleusunda yer alan PVN-CRH, NTS-NE, LC-NE ve DR-5-HT nöronlarının c-Fos ekspresyonunu arttırmaktadır. Bununla beraber akut hareketsizlik stresi ve hatta daha kuvvetli bir stres modeli olan suda hareketsiz tutma stresi plazma nesfatin-1 seviyesini etkilememektedir. (Goebel vd 2009, Yoshida ve Maejima 2010)

Yapılan çalışmalar ile elde edilen sonuçlar, periferal değil fakat merkezi nesfatin-1 sisteminin stres cevabının oluşmasında etkin olduğunu göstermektedir. Özellikle PVN'daki CRF nöronlarının büyük bir kısmı (% 28,3) icv nesfatin-1 enjeksiyonundan sonra c-Fos eksprese etmeye başlarlar. Bununla beraber merkezi nesfatin-1 uygulamasının PVN'dan izole edilen CRF nöronlarının %25'inde direkt olarak hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Bu oran elektriksel aktivitesi değişmiş olan CRF nöronlarının oranı ile uyumlu bulunmuştur. Böylece nesfatin-1'in in vivo ve in vitro çalışmalarda PVN'da yer alan CRF nöronlarını hedef alarak bu nöronları aktive ettiği ve bu sayede stres cevabının oluşumuna katıldığı kanıtlanmış bulunmaktadır (Yoshida ve Maejima 2010).

Xu ve arkadaşlarının 2010 yılında yapmış oldukları bir çalışma ile akut ve kronik değişken hafif (CVM; *chronic variable mild*) streslerin pregangliyonik olmayan Edinger-Westphal nükleusunda (npEW) yer alan kokain-amfitamin düzenleyici transkripsiyon faktörü (CART) ve nesfatin salgılayan nöronları aktive ettiği gösterilmiştir. Bu nöronların %50'sinin aktivasyonu stres ile gerçekleşmektedir. CVM stres, mRNA seviyelerinde bir değişikliğe neden olmadan, CART ve nesfatin proteinlerinin miktarında aynı derecede bir artışa neden olmuştur. Yapılmış olan bu çalışmada CVM stres, depresyon ilişkili davranış çalışmaları ve depresyon gelişiminde stresin ana rolünü belirleyebilmek için iyi tanımlanmış bir stres modeli olarak kullanılmıştır. Akut ve CVM stres uygulaması sonrası, CART ve nesfatin eksprese eden npEW nöronların aktivasyon dereceleri karşılaştırıldığında, sadece CVM stresin bu proteinlerin miktarında aşırı ve anlamlı bir artışa neden olduğu bulunmuştur. Bu bulgu sonucunda, CART ve nesfatinin majör depresyon gibi stres ile ilişkili beyin hastalıklarının gelişiminde rol oynayabilecekleri düşünülmektedir (Xu vd 2010).

2.1.8. Stres ve L- Tipi Kalsiyum (Ca^{+2}) Kanalları

L- tipi Ca^{+2} kanalları özellikle kalp ve düz kaslarda olmak üzere birçok dokuda yer almaktadırlar. Bu kanalların dihidropridinlere, fenilalkilaminlere ve benzodiazepinlere duyarlılıkları yüksektir. L- tipi Ca^{+2} kanalları; alfa-1, alfa-2, beta, gama, delta gibi çeşitli alt birimlerden oluşurlar. L- tipi Ca^{+2} kanallarının fonksiyonu özellikle kalp kasında ikinci haberci sistemi aracılığı ile düzenlenmektedir. Bu nedenle çeşitli ilaçlar, reseptör proteinlerine etki veya ikinci habercileri aktive ederek dolaylı bir şekilde kanal fonksiyonlarını değiştirebilirler (Genç 1997).

L-tipi Ca^{+2} kanallarının kardiyak miyositlerde normal fizyolojik fonksiyonların karakteristiğini belirlemede etkinlik gösterdiği bilinmektedir. L-tipi Ca^{+2} kanalları membran uyarılabilirliği, Ca^{+2} homeostazisi, protein fosforilasyonu ve gen regülasyonu gibi olayları da içeren birçok hücre fonksiyonunda önemli bir rol oynarlar (Brosenitsch vd 1998).

L-tipi Ca^{+2} kanalları boyunca gerçekleşen depolarizasyon kalpteki aksiyon potansiyelinin plato fazının ve düğüm hücrelerinde *pacemaker* potansiyelinin oluşmasına yol açmaktadır. Kalsiyum iyonlarının L-tipi Ca^{+2} kanallarından hücre içine girişi, kalpte uyarılma-kasılma eşleşmesinin gerçekleşmesi için büyük önem taşımaktadır (Bers 2002, Bodi vd 2005).

L-tipi Ca^{+2} kanalları por yapısında alfa-1c ($\alpha 1c$) alt biriminin membranda çoklu geçişlerini içeren ve düzenleyici alfa2/delta ($\alpha 2/\delta$) ve beta (β) alt birimlerinden oluşan bir proteindir. $\alpha 1c$ altbirimi L-tipi Ca^{+2} kanallarının voltaja duyarlı kısmıdır ve kalsiyum kanal antagonist/agonistlerinin farklı sınıfları için reseptör bölgeleri içerir. Bu nedenle $\alpha 1c$ altbirimi L-tipi Ca^{+2} kanallarının temel elektrofizyolojik özelliklerini belirlemede rol alırlar (Schultz vd 1993).

Çeşitli birçok kalp hastalığında L-tipi Ca^{+2} kanallarının fonksiyonu veya yoğunluğundaki değişimlere rastlanmıştır. L-tipi Ca^{+2} kanal yoğunluklarının veya fonksiyonlarının değişmesi; atriyal fibrilasyon, kalp yetmezliği, iskemik kalp hastalığı gibi birçok çeşitli kalp hastalıklarının oluşumuna katılmaktadır. Bu nedenle kardiyovasküler hastalıklar ve L-tipi Ca^{+2} kanalları tarafından düzenlenen Ca^{+2}

homeostazisindeki patofizyolojik değişimler arasında bir ilişkinin varlığı söz konusudur. Bunun yanı sıra birçok çalışmada; L-tipi Ca^{+2} kanal aracılığı ile Ca^{+2} regülasyonunun bozulmasının hücre ölümünün patogeneğinde çok önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Fakat halen hareketsizlik stresi ile indüklenmiş olan kardiyomiyosit hasarında L-tipi Ca^{+2} kanalının rol oynayıp oynamadığı, eğer rolü var ise kanal yoğunluğu ve fonksiyonunun stresten ne derece etkilendiği bilinmemektedir (Zhao vd 2009).

Xu ve arkadaşlarının 2003 yılında yapmış oldukları çalışma ile akut hareketsizlik stresinin, kalsiyum kanallarının aktivasyon karakterinin artışı anlamına da gelen, L-tipi Ca^{+2} kanalı akımını (ICa-L) arttırdığı gösterilmiştir. Bu geri dönüşümlü olay geçici kalsiyum yüklenmesi daha sonra apoptozis ve en sonunda kardiyomiyosit hasarı ile sonuçlanmaktadır. Fakat kronik stres nedeniyle meydana gelen L-tipi Ca^{+2} kanalı değişimleri açıklanmamıştır (Xu vd 2003).

Zhao ve arkadaşlarının 2007 yılında yapmış oldukları bir çalışmada hareketsizlik stresinin kardiyak disfonksiyona ve kalpte yapısal değişimlere neden olduğu gösterilmiştir. Bununla beraber şiddetli kardiyomiyosit apoptozisi ve nekrozunun da hareketsizlik stresi sonrası gerçekleştiği bulunmuştur. Stres ile indüklenmiş kardiyovasküler hasar ve hastalıklar için kardiyomiyosit ölümü en önemli temel hücresel olay olarak kabul edilmektedir. Fakat yine de stresin neden olduğu kardiyomiyosit hasarının patolojik mekanizması bilinmemektedir (Zhao vd 2007).

Yapılmış olan diğer bir çalışmada ise akut hareketsizlik stresinin L-tipi Ca^{+2} kanalı akımında (ICa-L) artışa neden olduğu bir kez daha gösterilmiştir. Bu artış Ca^{+2} kanalının aktivasyon karakterinin artışı ile ilişkili bulunmuştur. Aynı çalışmada kronik hareketsizlik stresine maruz kalan sıçanlarında ventriküler miyosit ICa-L değişimi *patch-clamp* tekniği ile gösterilmiştir. Sonuçlar kronik hareketsizlik stresinin ICa-L arttırdığını göstermektedir. Bununla beraber kronik hareketsizlik stresi sonrası ventrikül L-tipi Ca^{+2} kanalının $\alpha1c$ alt biriminin haberci ribonükleik asidinin (mRNA) anlamlı bir şekilde arttığı, *reverse* transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (rtPCR) ve *Nothern Blot* analizleri ile gösterilmiştir. Aynı zamanda *Western Blot* analizleri ile de $\alpha1c$ alt birimi proteininin miktarındaki artış tayin edilmiştir. Kronik stres maruziyetinde L-tipi Ca^{+2} kanalı $\alpha1c$ alt biriminin ekspresyonundaki artış, akut stresin neden olduğu protein-kinaz-A (PKA) bağımlı kanal aktivasyonundaki değişimlere neden olan düzenleyici

mekanizmadan farklı olarak, ICa-L değişimine katkıda bulunmaktadır. Fakat kanal sayısındaki bu artış kanal aktivasyon veya inaktivasyon karakteristiklerinin değişimi ile ilişkili olarak gerçekleşmemektedir. Bu çalışmanın sonuçları kronik hareketsizlik stresinin, L-tipi Ca^{+2} kanalı $\alpha 1c$ alt biriminin ekspresyonunu arttırarak kanal akımında artışa neden olduğunu göstermektedir. Bu ise stres ile indüklenmiş kalsiyum tutulumunun değişimi ile gerçekleşen kardiyomyosit hasarına neden olmaktadır. Akut hareketsizlik stresinde ise akım artışı PKA aktivasyonu aracılığı ile gerçekleşmektedir. Bu çalışma ile elde edilmiş bulgular; stresle indüklenmiş kardiyomyosit hasarının mekanizmasını anlayabilmek için yeni yaklaşımlar sunmakla beraber, L-tipi Ca^{+2} kanallarının kronik stres ile indüklenmiş kardiyomyosit hasarına neden olduğunun bir göstergesi olarak kabul edilebilirler. Bu nedenle de bu çalışmadan elde edilen sonuçların kardiyovasküler hastalıkların tedavisi ve korunmasında yardımcı olabileceği düşünülmektedir (Zhao vd 2009).

2.2. Deneysel Stres Modelleri

Stres kuşkusuz insan hayatının ayrılmaz bir parçası haline gelmiştir. Stresli koşullar normal fizyolojik fonksiyonları engelleyerek çeşitli hastalık durumlarına yol açmaktadırlar. Hipertansiyon, diyabet, davranış bozuklukları gibi modern çağın en yaygın hastalıklarının çoğunun kronik stres kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Hastalıkların gelişim sürecini anlamak ve yeni terapiler geliştirebilmek adına deneysel stres modelleri önem taşımaktadır. Bu nedenle de deneysel hayvan stres modellerinin geliştirilmesi ihtiyacı her zaman var olmuştur. İdeal model, stres yanıtını her açıdan yeniden üretebilmeli ve hastalık gelişimini her açıdan doğal bir şekilde taklit edebilmelidir. Bugüne kadar kullanılmakta olan farklı stres modelleri strese yanıt olarak değişim gösteren birçok biyokimyasal veya fizyolojik parametreleri değerlendirebilir fakat stresin neden olduğu patofizyolojik değişimleri tamamen taklit etme kapasitesine sahip değildirler. Bazı modeller fiziksel stres ve bununla ilişkili nöroendokrin değişimleri oluşturabilirken, bazıları psikolojik stres ve ilişkili davranış değişimlerini oluşturmakta daha iyidir. Akut modeller nöroendokrin fonksiyon bozuklukları oluşturamazlarken, kronik stres bu durumun oluşturulmasında kullanılabilir bir modeldir. Bu nedenle stres yanıtını belirli yönleri ile değerlendirebilmek için doğru stres modeli kullanılmalıdır. Her modelin kararlı durum eksikliği, doku hasarını tahmin edebilme eksikliği, ayarlanabilme eksikliği gibi kendi içinde doğal sınırlamaları

bulunmaktadır. Yaygın olarak kullanılan hayvan modelleri aşağıda yer aldığı gibi sınıflandırılabilir (Bhatia vd 2011).

A-Fiziksel Stres Modelleri

- 1-Sıcaklık dalgalanmalarına bağlı olarak indüklenen stres
 - Soğuk suya batırıp kaçışın engellenmesi
 - Soğuk ortamda izolasyon
- 2-Hareketsizlik stresi
- 3-Ayağa elektrik şokunun verilmesi ile indüklenen stres
- 4-Zorla yüzdürme ile indüklenen stres

B-Psikolojik Stres Modelleri

- 1-Yeni doğan izolasyon stresi
- 2-Avcı stresi
- 3-Gece-gündüz ışık değişimi ile indüklenen stres
- 4-Gürültü ile indüklenen stres

C-Kronik tahmin edilemeyen stres

2.2.1. Kronik Tahmin Edilemeyen Stres

Adaptasyon veya direnç durumlarının ortaya çıkmaması için hafiften orta şiddetliye doğru farklı stres tiplerinin değişken şekilde uygulanmasıdır. Fiziksel ve psikolojik stres modellerinin rastgele bir şekilde uygulanmasını içermektedir (Bhatia vd 2011).

2.2.2. Hareketsizlik Stresi

Hayvanlarda stres kaynağı olarak kullanılan hareketsizlik stresi, stres ile ilişkili biyolojik, biyokimyasal ve fizyolojik cevapların çalışılabilmesi için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Hareketsizlik stresi iki farklı yol ile elde edilebilir. Hayvan hava geçişi için uygun deliklerin bulunduğu yarı silindirik akrilik tüpe (4,5 cm genişliğinde ve 12 cm uzunluğunda) konularak hareketsiz bırakılabilir. Diğer bir yol ise hayvanın bacaklarından gergin bir şekilde tahta üzerine yapıştırarak hayvanı hareketsiz bırakma olabilir. Baş hareketi ise kafanın üzerine geçirilecek bir metal aracılığı ile kısıtlanabilir. Hareketsiz bırakılan ratlar 150 dk kadar bu şekilde tutulurlarsa akut, 7-10 gün boyunca

belirli zaman dilimlerinde bu şekilde tutulurlarsa kronik hareketsizlik stresi uygulaması gerçekleştirilmiş olunur. Model olarak hareketsizlik stresi kullanmanın en büyük avantajı adaptasyonun nadiren sergilendiği fiziksel ve zihinsel stres üretilmesidir (Bhatia vd 2011).

Yapılmış olan birçok çalışma stresin en çok hedef aldığı sistemin kardiyovasküler sistem olduğunu göstermiştir. Bazı araştırmacılar hipertansiyon, aterosklerozis ve ani kalp yetmezlikleri gibi kardiyovasküler hastalıklarda stresin en önemli etiyolojik faktör olduğunu düşünmektedirler. Hareketsizlik stresi birçok yaygın biyokimyasal ve fizyolojik değişikliklere neden olduğu için spesifik bir stres kaynağı olarak kabul edilmez. Meydana gelen değişimler, HPA aksı ve sempato-adrenomedullar sistemi içeren ve daha sonrasında kortikosteron ve katekolaminlerin aşırı sekresyonunun gerçekleştiği nöroendokrin sistem tarafından düzenlenmektedir. Bu nedenle hayvan modellerinde hareketsizlik stresi uygulaması stresin fizyolojik fonksiyonlardaki ve patolojik süreçlerdeki etkilerini çalışmak için kullanılmaktadır (Das vd 1999, Schwartz vd 2003).

2.3. NESFATİN

2.3.1. Nesfatin Tarihçesi

Nesfatin-1 ilk kez 2006 yılında Japon bilim adamları Oh-I ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir. Oh-I ve arkadaşları yapmış oldukları çalışma ile nesfatinin, hipotalamusun iştah kontrolünden sorumlu çekirdeklerinden salgılandığını göstermişlerdir. Aynı çalışmada leptin geninin mutant olduğu obez farelerde de nesfatin-1'in yiyecek alımını baskıladığı bildirilmiştir (Oh-I ve Shimizu 2006). Nesfatinin iştah kontrolündeki etkinliğini leptin yolağından bağımsız olarak gerçekleştirmesi nedeni ile leptin geninin mutant olduğu kişilerin obezite tedavisinde nesfatin kullanılmasının etkin olabileceği düşünülmektedir (Cowley ve Grove 2006).

2.3.2. Nesfatin Nedir?

Beynin hipotalamus bölgesi beslenme davranışlarını düzenleyen önemli bölgeler ve bu bölgelerden salgılanan molekülleri içerir. Nesfatin-1 besin alımının düzenlenmesinde görevli, salgılanması açlık sırasında azalan, hipotalamus ve beyin sapından salgılanan bir peptittir (Oh-I ve Shimizu 2006).

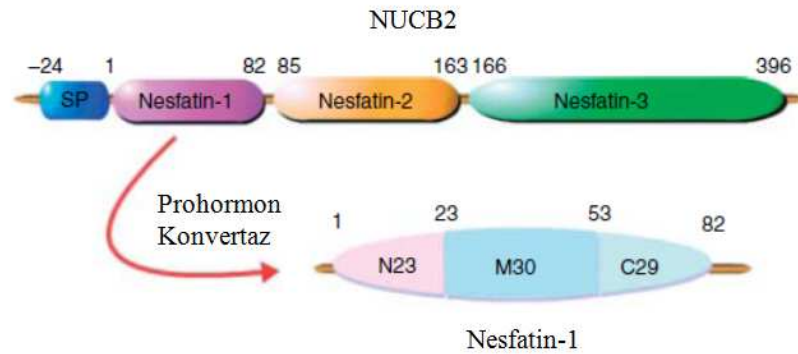
İmmünohistokimyasal işaretleme ile yapılan çalışmalarda; nesfatin-1'in ve öncülü olan NUCB2'nin (*nonesterified fatty acid/nucleobinding 2*, NEFA- DNA bağlayan/ EF-hand/ asidik protein) merkezi sinir sisteminde; hipofiz bezi, hipotalamus, beyin sapı, önbeyin ve orta beyin nukleusları, merkezi amigdaloïd nukleuslar, ventrolateral medulla ve serebellum gibi birçok yerde lokalize olduğu gösterilmiştir. Ayrıca nesfatin-1'in sıçanlarda torakalumbur sempatik ve sakral parasempatik spinal kord pregangliyonik nöronlarında bulunduğu gösterilmiştir (Stengel ve Taché 2010).

Yapılmış olan diğer çalışmalarda nesfatin-1'in merkezi sinir sistemi yanında periferik dokularda da bulunduğu gösterilmiştir. Periferde özellikle adipoz doku, gastrik mukoza, pankreatik endokrin beta hücreleri ve testis dokularında salgılandığı gösterilmiştir. Nesfatinin periferik dokularda salgılandıktan sonra kan beyin bariyerini her iki doğrultuda da geçebildiği gösterilmiştir. Nesfatin-1 segmentinin intravenöz enjeksiyonu sonucunda kanda 20 dakika değişmeden kaldığı bilinmektedir (Pan 2007,

Price vd 2007, Gonzalez vd 2009, Stengel 2009, García-Galiano vd 2010^a, Stengel ve Taché 2010).

2.3.3. Nesfatin Geni

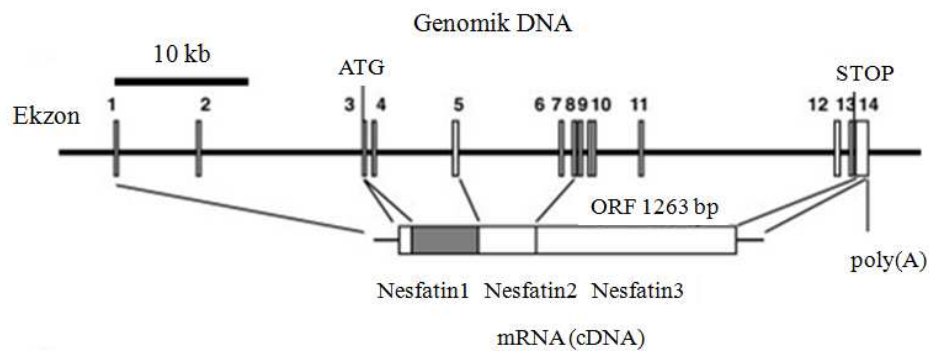
Nesfatin-1, 82 aminoasit (aa) uzunluğunda, memeli ve insan hatta daha düşük organizasyonlu canlılar arasında %85'in üzerinde homolojiye sahip bir polipeptid olup kalsiyum ve DNA bağlayan protein olan NUCB2'den türemektedir (Gonzalez vd 2009). NUCB2 posttranslasyonel modifikasyonlar için birçok bölgeye sahiptir. NUCB2'nin özel prohormon dönüştürücü enzimlerce (*Prohormone convertase*; PC3/1 ve PC2) posttranslasyonel modifikasyonları sonucunda; Nesfatin-1 (1-82 aa'leri arasından kırılma ürünü), Nesfatin-2 (85- 163 aa'leri arasından kırılma ürünü) ve Nesfatin-3 (166- 396 aa'leri arasından kırılma ürünü) oluşmaktadır (Şekil 3.1) (García-Galiano vd 2010^a, Palazs vd 2012). NUCB2 fragmentleri olan nesfatin-2 ve nesfatin-3, kalsiyum bağlayan proteinin DNA yapısı ile aynı yapıya sahiptirler. Fakat bu peptitlerin herhangi bir biyolojik aktivitesi olduğuna dair bir bilgi yoktur. (Cowley ve Grove 2006, García-Galiano vd 2010^a, Ramanjaneya ve Chen 2010, Stengel ve Taché 2010). Nesfatin-1 molekülü N-terminal (N23), orta kısım (M30) ve C-terminal (C29) olmak üzere üç bölgeden oluşmaktadır (Şekil 2.7). Nesfatin-1'in başta anoreksik etkileri olmak üzere tüm fizyolojik etkilerinin oluşmasında M30 bölgesi anahtar rolü oynayan aktif kısımdır (Yamada vd 2010, Palazs vd 2012).



Şekil 2.7 Nesfatin-1'in öncülü olan NUCB2 proteininin primer yapısı ve Nesfatin-1 molekülünün şematik gösterimi (SP- Sinyal Peptit) (García-Galiano vd 2010^a).

NUCB2 plazma membranı ve nöroplazmada yer alan ve önünde 24 amino asitlik sinyal peptidinin yer aldığı 396 amino asit uzunluğunda bir polipeptittir (Şekil 2.7). Bu öncül protein N-terminal sinyal peptid, Leu/ Ile zengin bölgesi, DNA-bağlayıcı bölgesi, çekirdek hedef bölgesi, iki Ca^{+2} -*EF-hand* motifi ve lösin fermuar bölgelerinden oluşmaktadır (Palazs vd 2012).

İnsan NUCB2 geni 55 kb uzunluğunda olup 14 ekzon ve 13 intron bölgesine sahiptir (Şekil 2.8). Transkripsiyon başlama bölgesi translasyon başlama bölgesinden 246 bp önce yer almaktadır. NUCB2, 5889 bp uzunluğunda promotor bölgeye sahiptir ve bu bölge nöron kökenli hücre serilerinde aktiftir. NUCB2 translasyon bölgesi ve olası sinyal dizisi ekzon-3 bölgesi içinde tanımlanmıştır. Nesfatin-1, NUCB2 geninin ekzon-3 ve 5 arasındaki bölgesinde kodlanmaktadır. Diğer kodlanan diziler ise ekzon-5 ve 14 arasında yer almaktadırlar (Yamada vd 2010, Palazs vd 2012). 3'UTR (*untranslated region*- çevrilmemiş bölge) ekzon-14 içinde tanımlanmıştır. İnsan hipotalamusunda 3-RACE (*Rapid amplification of cDNA ends*) ürünlerinin dizi analizleri sonucunda, fonksiyonel çoklu adenillenmiş sinyal (AATAAA) dizilerinin, stop (dur) kodonunun 420 bp gerisinde olduğu ve bu sinyal bölgesinin 22 bp gerisinde ise çoklu adenillenmiş bölgenin bulunduğu saptanmıştır (Şekil 2.8). Stop kodon arkasında 3'UTR bölgesi içinde ise mRNA stabilizasyonundan sorumlu olabileceği düşünülen dört tane ARE (*Adenylate/uridylylate-rich element*) bölgesi bulunmaktadır (Şekil 2.9) (Yamada vd 2010).



Şekil 2.8 İnsan NUCB2 geninin şematik sunumu; Kutular ekzonları işaret etmektedir. İnce çizgiler intronları işaret etmektedirler, AGT translasyonel başlama bölgesini ifade etmektedir, STOP; dur kodonu, poly(A); çoklu adenillenmiş sinyal, ORF; *open reading frame* (açık okuma bölgesi) (Yamada vd 2010).

mRNA (cDNA)

Ekzon 14

```

acagACATTTAAAGTCTGAAGTCCACCAGAACTTGAAGAAAAGCTGTTA
  H I *
ACTCAACATCTATTTTCATCTTTTAGCTCCCTTCCTTTTCTCTGCTCAAT
+1597 AAATATTTTAAAAGCATATTTGAAATAAAGGGAGATACTTTTAAATGAA
AACACTTTTTTTGGGACACAGATATTAAGGATTGAAGTTTATCAGAACC
+1697 AGGAAGAAAACAAACTCACTGTCTGCTCTCTGCTCTCACATTACACAG
TGCTCTTTTATTTAATTTTTTGTTCCTTTAATGATTTAATTAAGTGGCTT
+1797 ATGCCATAATTTAGTGAAACTATTAGGAACTATTTAAGTGAGAAAACCTC
TGCCTCTTGCTTTTAAATTAGATTGCTCTCACTTACTCGTAAACATAGGTA
+1897 TTCTTTTATGGGTGCTTATCATTCTCTTTCAATAAATGTCTGTTTGATAT
TAACAATT

```

Şekil 2.9 İnsan NUCB2 geninin 3'UTR bölgesinin dizisi; 3'UTR içindeki ARE bölgeleri altı iki çizgili olanlar, Çoklu adenillenmiş sinyal dizileri (AATAAA) altı çizili olanlardır (Yamada vd 2010).

2.3.4. Nesfatin Nerelerde Bulunur?

Nesfatin-1 ve öncülü, merkezi sinir sisteminde birçok yerde bulunmaktadır. Bulunduğu yerler; hipofiz bezi, hipotalamik ve beyin sapı nükleusları olan ARC ve paraventriküler (PVH) nükleuslar, SON, lateral hipotalamik alan, NTS, dorsomedyal hipotalamik nükleuslar, tüberal hipotalamik alan, periventriküler nükleus, npEW, medüller raphe nükleusları, vagusun dorsal motor nükleuslarıdır. Ayrıca nesfatinin önbeyin, orta beyin nükleuslarında, merkezi amigdaloid nükleuslarda, ventrolateral medulla ve serebellumda, ayrıca ratların torasik, lomber sempatik ve sakral parasempatik spinal kord preganglionik nöronlarında bulunduğu gösterilmiştir (Stengel ve Taché 2010).

Yapılan çalışmalar ile nesfatin-1'in beyin yanı sıra adipoz doku, gastrik mukoza, endokrin pankreatik beta hücrelerinde ve testis gibi periferik dokularda da salgılandığı tespit edilmiş ve salgılandıktan sonra kan beyin bariyerini her iki doğrultuda da geçebildiği gösterilmiştir. Mide oksintik mukozadaki ekspresyon düzeyi beynekinden 20 kat fazla bulunmuştur (Pan 2007, Price vd 2007, Gonzalez vd 2009, Stengel 2009, García-Galiano vd 2010^a, Stengel ve Taché 2010).

2.3.5. Nesfatinin Görevleri

2.3.5.1. Nesfatin ve Besin Alımı

Nesfatinin besin alımını nasıl inhibe ettiği henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır ve bu konuda çalışmalar devam etmektedir. Nesfatin-1'in sıçanların farklı beyin bölgelerine enjeksiyonu ile gerçekleştirilmiş çalışmalarda, besin alımını inhibisyon etkisinin olası mekanizmaları açıklanmaya çalışılmıştır (Cowley ve Grove 2006, García-Galiano vd 2010^a). Nesfatin-1'in leptin reseptörlerinin mutant olduğu sıçanlarda beyne enjekte edilmesi ile besin alımının baskılandığı bildirilmiştir (Oh-I ve Shimizu 2006, Stengel ve Taché 2010). Bu sayede nesfatinin leptinden bağımsız olarak melatonin sistemini aktive etmesinin anlaşılması, nesfatinin besin alımının inhibisyonunda nasıl bir rol oynadığını açıklayan birinci mekanizmayı oluşturmaktadır (Cowley ve Grove 2006, García-Galiano vd 2010^a).

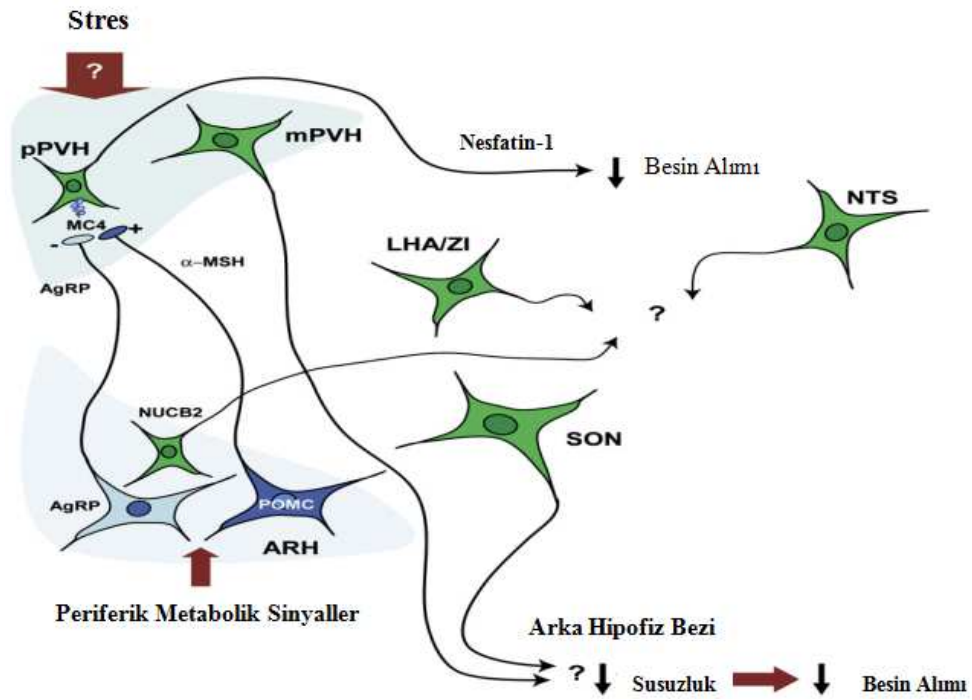
Nesfatinin besin alımını nasıl inhibe ettiği konusunu açıklanmaya çalışılan ikinci bir mekanizma ise; nesfatinin direkt olarak oreksijenik madde salınımını inhibe etmesi yönündedir. Yapılan in vitro çalışmalarda nöropeptit-Y (NPY) salgılamasında görev alan arkuat nöronlarda nesfatinin hiperpolarizasyona yol açtığı bulunmuştur. Bu şekilde NPY salınımını inhibe ederek beslenmeyi azaltmaktadır (Cowley ve Grove 2006, García-Galiano vd 2010^a, Stengel ve Taché 2010).

Sıçanlarda icv nesfatin-1 uygulaması, karanlıkta besin alımını akut, geçici ve doz bağımlı olarak inhibe etmektedir. Aynı zamanda nesfatin-1'in periferik enjeksiyonu da besin alımını baskılamaktadır (Cowley ve Grove 2006, Shimizu ve Oh-I 2009).

Nesfatin-1'in icv uygulanması gıda alımını inhibe ederken, nesfatin-1'in bloklanması ise gıda alımını arttırmaktadır. Nesfatin-1'in enerji dengesindeki rolü ve etkin olduğu mekanizmaları tam anlamıyla açıklığa kavuşturmak için çalışmalar devam etmektedir (Cowley ve Grove 2006).

2.3.5.2. Nesfatin ve Sinir Sistemi

Nesfatin-1'in öncülü olan NUCB2 eksprese eden nöronlar beyinde birçok bölgede bulunmuşlardır (Stengel ve Taché 2010). Parvoselüler bölgedeki (pPVH) bazı nöronlar, NUCB2 melanokortin reseptörü (MC4) eksprese ederler ve α -MSH ile aguti ilişkili protein (AgRP) liflerinden sinyal alırlar. α -MSH, nesfatin-1'in ekspresyonunu ve salınımını artırır (Şekil 2.10). Oh-I ve arkadaşları 2006 yılında yapmış oldukları çalışma ile pPVH'deki NUCB2 nöronlarının nesfatin-1 salgısı ile anoreksiya neden olduğunu iddia etmektedirler. Fakat halen nesfatin-1'in nasıl etkinlik gösterdiği bilinmemektedir (Cowley ve Grove 2006, García-Galiano vd 2010^a).



Şekil 2.10 Beyinde nesfatin salgıyan hücreler ve besin alımında olası etkileri. LHA/ZI; lateral hipotalamus/zona interca (Cowley ve Grove 2006).

Metabolik faaliyetlerin değişimine bağlı olarak nesfatinin merkezi salınımı değişmektedir. 24 saatlik bir açlık sürecinden sonra PVH ve SON nesfatin transkripsiyon ve translasyonu azalmaktadır. 24 saatlik bir açlıktan sonra tekrar beslenme sonucunda ise; SON'da nesfatin üretimi ve salgılanması aktive olmaktadır. Anoreksik ajanlar olan α -MSH ve serotonin-5-HT reseptör antagonistinin periferik enjeksiyonu kemirgenlerde hipotalamustan salgılanan nesfatin-1 miktarını

arttırmaktadır. Oreksijenik dozda ghrelinin periferik uygulamasında arkuat nükleustaki (ARH) nesfatin-1 salgılayan nöronların aktivitesinde artışa neden olmaktadır. Bunların yanı sıra bir tokluk peptidi olan kolesistokininin (CCK) periferik enjeksiyonu da pPVN ve NTS'da yer alan nesfatin-1 salgılayan nöronların aktivitesinde artışa neden olmaktadır. Bu bulgular nesfatin-1'in tokluk sinyalinde yer alan beslenme peptitlerini etkilediğinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Stengel ve Taché 2010).

Açlığın, leptin ve ghrelin aracılı olarak periferik metabolik sinyallerden etkilendiği düşünülmektedir. Bunlardan ghrelin ARH'a etkileri ile POMC nöronlarının aktivitesini azaltırken, AgRP nöronlarının aktivitelerini arttırmaktadır (Şekil 2.10). Oh-I ve arkadaşları açlığın melanokortin yolu ile pPVH nöronların NUCB2 aktivitesini azalttığını ileri sürmektedirler (Cowley ve Grove 2006, García-Galiano vd 2010^a, Stengel ve Taché 2010).

2.3.5.3. Nesfatin ve Sempatik Sinir Sistemi

Yakın zamanlarda yapılmış olan bir çalışmada; icv nesfatin-1 enjeksiyonunun ratlarda anlamlı bir şekilde böbrek sempatik aktivitesinin artışı sağladığı aynı zamanda kan basıncının artışına da neden olduğu gösterilmiştir ve nesfatin-1'in bu etkisinin belli bir noktaya kadar doz bağımlı olarak gerçekleştirdiği bulunmuştur. Yine aynı çalışmada nesfatin-1'in melanokortin yolağı ve sempatik sistem aktivasyonu ile olan ilişkilerine bakılmıştır. Bunun için melanokortin 3/4 reseptör antagonisti olan SHU9119 kullanılmıştır. Bu uygulama sonucunda nesfatin-1'in kan basıncını yükseltici etkisi ve sempatik sinir sistemini aktive edici etkisi ortadan kalkmıştır. Bu nedenlerden dolayı, nesfatin-1'in böbrek üzerinde yapmış olduğu sempatik sinir sistemi aktivasyonunun, merkezi melanokortin sistemi aracılığı ile gerçekleştirdiği düşünülmektedir (Tanida ve Mori 2011).

2.3.5.4. Nesfatin ve Stres

Nesfatin-1'in besin alımını düzenlenmesinde rolü olduğu gibi stres koşullarında stres cevaplarının düzenlenmesinde de rolü olduğu sanılmaktadır. Stres anoreksiya neden olmaktadır. Belki de bu etkinliğini pPVH'deki NUCB2 salgılayan nöronları aktive ederek gerçekleştirmektedir. Supraoptik çekirdeklerdeki nöronların ve magnoselüler

nöronların arka hipofize uzantılarının olduğu ve bunların su dengesinin sağlanmasında görevli oldukları bilinmektedir. Bu bölgedeki NUCB2 nöronlarının besin alımını düzenleme işlevi beklide indirekt olarak su dengesinden etkilenmektedir. Şaşırtıcı bir şekilde mPVH, SON, ARH, lateral hipotalamus/zona interca (LHA/ZI) ve NTS'daki NUCB2 nöronları açlık veya melanokortinlerden etkilenmemektedirler. İşte bu nedenlerden dolayı bunların fonksiyonları hala açık değildir (Şekil 2.10) (Cowley ve Grove 2006, García-Galiano vd 2010^a, Stengel ve Taché 2010).

2.3.5.5. Nesfatin ve Anksiyete

Nesfatin-1'in beslenme davranışını düzenlemesinin yanı sıra anksiyete üzerinde de etkisinin bulunduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Yapılmış olan bir çalışmada nesfatin-1'in merkezi uygulaması sonucu anksiyete davranışlarındaki artış gösterilmiştir. Diğer bir çalışmada ise depresif durumlarda beslenme davranışının değişmiş olmasından dolayı serum nesfatin-1 düzeyleri arasındaki farklılıklar araştırılmıştır. Depresyon teşhisi konulmuş hastalarda kontrollere göre serum nesfatin-1 seviyesi daha yüksek bulunmuştur. Bu çalışmalar nesfatin-1'in beslenme üzerine olan etkisine ek olarak, anksiyete davranışlarında da bir aracı rolünün olabileceği sonucunu göstermektedir (Merali ve Cayer 2008, Ari ve Ozturk 2011).

2.3.5.6. Nesfatin ve Endokrin Sistem

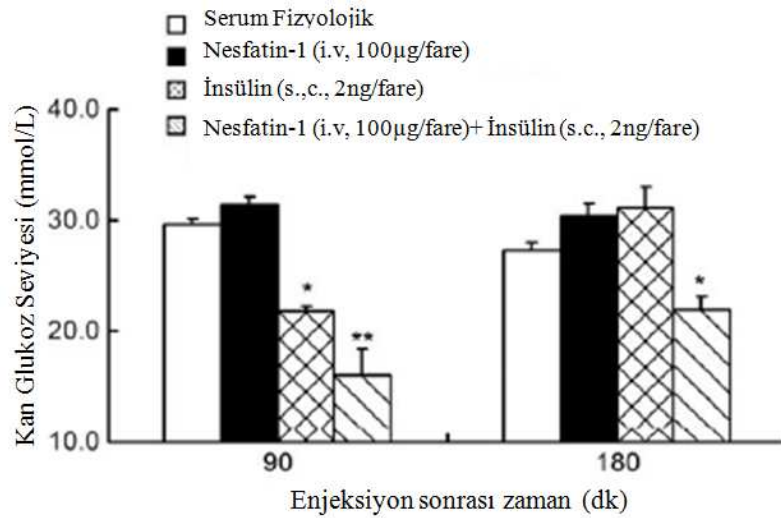
Nesfatin-1'in beyinde eksprese edildiği alanlarda aynı zamanda; beslenme davranışında, nöroendokrin düzenlemede, otonom kontrolde, viseral fonksiyonlarda, uyku, duygulanım ve ağrı durumlarında etkili olan birçok madde salgılanmaktadır. Bu nedenle nesfatinin beslenme dışındaki diğer fonksiyonlar ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Stengel ve Taché 2010). Nesfatin-1'in endokrin dokularda bol bulunması hormon salgılanmasında bir işlevi olabileceğini, midede bulunması besin alımında henüz açıklanamayan bir görevi olabileceğini ve pankreasta bulunması da özellikle insülin ve glukagon aracılı glikoz metabolizmasında görev alabileceğini işaret etmektedir. Nesfatin-1'in periferde bulunması ise hipotalamusta anoreksik sinyali düzenlemenin yanı sıra enerji homeostazisinde integral düzenleme ve nöroendokrin ilişkili fonksiyonlarının da olduğu görüşlerini kuvvetlendirmektedir (García-Galiano vd 2010^a, Stengel ve Taché 2010). Nesfatin-1'in aynı zamanda plazmada bulunması

dolaşımsal bir düzenleyici faktör olduğunun kanıtı olarak kabul edilmektedir (Bonnet ve Pecchi 2009).

Nesfatin-1'in öncülü olan NUCB2 ekspresyonu, dişi ratlarda pubertal dönemde artmakta ve bu artışa paralel olarak lüteinize hormon (LH) artışı gözlenmektedir. Erişkin ratlarda nesfatin-1 enjeksiyonu LH seviyesinde bir değişiklik meydana getirmemektedir. Bu sonuçlar nesfatin-1'in pubertaya geçişte bir rolünün olduğunu ortaya çıkarmakla beraber enerji homeostazisinde düzenleyici bir rolünün olduğu görüşlerini de desteklemektedir (García-Galiano vd 2010^b).

2.3.5.7. Nesfatin ve Diyabet

Yapılan bir çalışmada nesfatin-1'in antihiperglisemik etkisi gösterilmiş bulunmaktadır. Hiperglisemik db/db farelerde (Tip2 diyabet modeli taklidi), intravenöz nesfatin-1 uygulaması anlamlı bir şekilde kan glukoz seviyesini düşürmüştür. Elde edilen sonuçlar nesfatin-1'in antihiperglisemik etkisinin periferik ve zaman-doza-insülin bağımlı olduğunu göstermektedir (Şekil 2.11). Nesfatin-1'in bu etkisinin insülin bağımlı olduğu, streptozosin aracılı diyabet modelinde glukoz seviyesini düşürmemesi ile ilişkilendirilmiştir. Kan glukoz seviyesini düşürmede insüline yardımcı bir rolü bulunmaktadır. Fakat nesfatin-1'in kan glukoz seviyesini düşürmede rol alan intrasellüler etki mekanizması halen bilinmemektedir (Su ve Zhang 2010).



Şekil 2.11 Nesfatinin antihiperglisemik etkisi (Su ve Zhang 2010).

Yapılmış olan bu çalışmada; db/db farelere icv nesfatin-1 uygulaması sonucunda besin alınımı inhibe olmakta fakat yüksek kan glukoz seviyesi etkilenmemektedir. Bu nedenle nesfatin-1'in antihiperglisemik etkisinin anoreksik etkisinden bağımsız yani periferik etkili olduğu bu çalışma ile kanıtlanmış bulunmaktadır. Nesfatin-1'in anoreksik ve antihiperglisemik etkileri sırasıyla; beslenme ve glukoz metabolizmalarını etkilemektedirler. Bu sonuçlar ise nesfatin-1'in vücutta metabolik kontrol mekanizmalarında önemli bir rolünün olduğunu göstermektedir. Metabolik hastalıklarda özellikle Tip-2 diyabet ve obezite tedavilerinde nesfatin-1'in potansiyel bir teropatik ajan olarak kullanılabilceği düşünülmekte ve bu nedenle de nesfatin-1 bu alanda yapılan çalışmalar için iyi bir hedef oluşturmaktadır (Su ve Zhang 2010).

Bu çalışmanın sonucuna göre diyebiliriz ki; nesfatin-1 insülin etkisini ve salınımını arttırıcı etkisi ile anti-diyabetik olarak kullanılabilir. Fakat halen nesfatinin glukoz ve enerji metabolizmasındaki kesin fizyolojik ve fizyopatolojik etkileri bilinmemektedir.

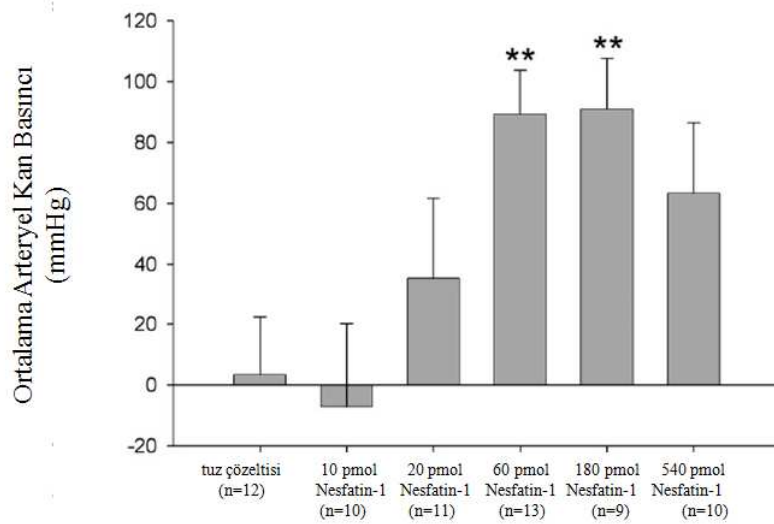
2.3.5.8. Nesfatin ve Bağışıklık Sistemi

Yapılmış olan bir çalışmada, subaraknoid hemoraj modelinde ratlarda nesfatin-1'in antiapoptatik ve antiinflamatuvar özellikte olduğu gösterilmiştir. Subaraknoid hemoraj oluşturulmuş ratlarda beyin TNF- α , interlökin-1 β (IL-1 β), interlökin-6 (IL-6) seviyeleri yükselirken antioksidant enzim seviyeleri düşmüştür. Nesfatin-1 uygulanan grupta serum fizyolojik uygulanan gruba göre nörolojik bozukluklar ve oksidatif beyin hasarında iyileşme görülmüştür. Ayrıca baziller arterin morfolojik değişimlerinde nesfatin-1 uygulanan grupta iyileşme gözlenmiştir. Subaraknoid hemoraj ile gerçekleşen plazma proinflamatuvar sitokin artışı yine nesfatin-1 uygulanan grupta baskılanmıştır. Bu sonuçlar oksidatif mekanizmalar ile oluşan beyin hasarını önlemede nesfatin-1'in olumlu etkilerini göstermektedirler (Ozsavci ve Erşahin 2011).

2.3.5.9. Nesfatin ve Kardiyovasküler Sistem

Beyin nesfatin-1 sinyalizasyonu stres koşullarında kardiyovasküler cevabın düzenlenmesinde de görev almaktadır. Örneğin, intraserebrospinal nesfatin-1 enjeksiyonu ortalama arteriyel kan basıncını yükseltmektedir (Şekil 2.12) (Yosten ve Samson 2009). Melanokortin ve oksitosin reseptör antagonistleri ile yapılan

çalışmalarda nesfatin-1'in beslenme ve kan basıncını artırıcı etkileri ortadan kalkmıştır. Nesfatin, PVN'da oksitosin ile birlikte kolokalizedir ve oksitosin salgılanmasını depolarizasyon yolu ile uyarmaktadır. Nesfatin-1'in oksitosin aracılığı ile melonokortin yolunun aktivasyonunu yaptığı bilinmektedir. Bu nedenlerden dolayı hipertansif etkisinin merkezi oksitosin-melanokortin yolaklarından biri ile ilişkili olduğu dūřünlmektedir. Fakat nesfatin-1'in bu iki sistem üzerinde aynı anda mı yoksa belli bir sıra ile mi etki gösterdiği ve ilişkinin diğer bileşenleri halen ayrıntıları ile bilinmemektedir (Yosten ve Samson 2009, Garcıa-Galiano vd 2010^a, Yosten ve Samson 2010).



şekil 2.12 Farklı konsantrasyonlardaki nesfatin-1 uygulamasının ortalama arteriyel basınca etkisi (Yosten ve Samson 2010).

2.3.5.10. Nesfatin-1 ve L- Tipi Kalsiyum (Ca^{+2}) Kanalları

Sıçan hipotalamik nöron hücre kültüründe yapılmış olan bir çalışmada nesfatin-1'in farmakolojik karakteristiklerinin G proteini ile ilişkili reseptöre benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Nesfatin-1'in intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonunu arttırdığını işaret eden bu çalışmada, kalsiyum kanal altbirimlerine spesifik inhibitörler kullanılması sonucunda nesfatin-1 tarafından aktive edilen kanalların L, P ve Q tipi kalsiyum kanalları olduğu bulunmuştur. Yapılmış olan bu çalışma ile nesfatin-1'in hipotalamus ve beyin sapı nöronlarında eksprese edildiği ve bu peptidin hipotalamik nöron hücre kültürü çalışmalarında G protein ilişkili reseptör ile etkileşmesi sonucu kalsiyumun hücre içine alınmasını uyardığı gösterilmiştir (Brailoiu vd 2007).

Yapılan bir diğer çalışmada ise nesfatin-1'in pankreas adacık beta hücreslerinde L-tipi Ca^{+2} kanal aktivasyonu aracılığı ile insülin salgılanmasını arttırdığı gösterilmiştir. Kalsiyumun hücre içindeki artışı ise PKA ve fosfolipaz A₂'den bağımsız olarak gerçekleşmektedir. Fakat bu etkisi ile voltaj bağımlı Ca^{+2} kanalları arasındaki ilişki halen bilinmemektedir. Hücre içi Ca^{+2} seviyesini arttırması glikoz bağımlı olarak gerçekleşmektedir. Yemeklerden sonra plazma glukoz seviyesindeki artış ile beraber nesfatin-1 pankreas adacık beta hücrelerinde glukoz ile uyarılmış hücre içi Ca^{+2} seviyesini daha da arttırmakta ve buna bağlı olarak insülin salınımı da artış göstermektedir (Nakata ve Manaka 2011).

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Deneyde Kullanılan Hayvanlar:

Çalışmamızda; Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Birimi'nden sağlanan 3 aylık, 200–250 gr ağırlığında 28 adet, Wistar cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar çalışma süresi boyunca standart şartlar altında havalandırılmalı, sabit ısı odalarda, %50±5 nem ortamında, 12 saatlik aydınlık–karanlık döngüsü bulunan laboratuvar koşullarında barındırıldı. Sıçanlar veteriner hekim kontrolü altında bakıldı ve özel hazırlanmış kafeslerde tutuldu. Tüm deney prosedürlerinde “Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu” prensiplerine titizlikle uyuldu.

3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması:

Sıçanlar rastgele seçilerek dört ayrı çalışma grubu oluşturuldu.

Grup 1: Normal kontrol sıçanlar (K), (n= 7),

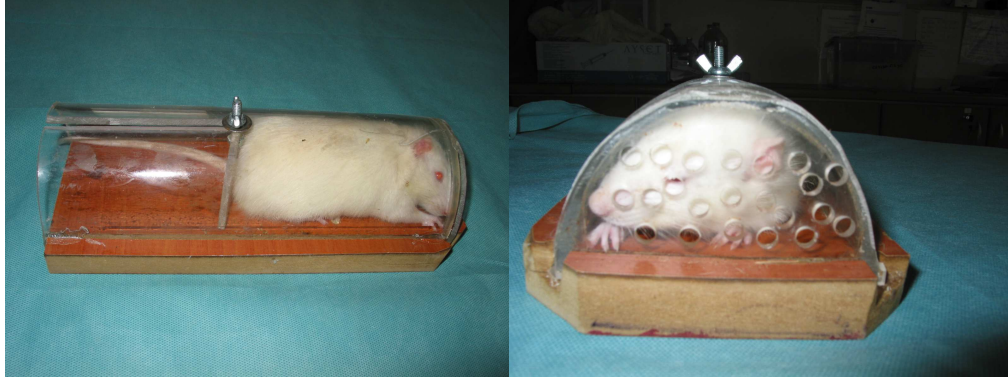
Grup 2: Kronik stres protokolü uygulanan sıçanlar (Stres= S), (n= 7),

Grup 3: Nesfatin verilen kontrol sıçanlar (Kontrol+Nesfatin= K+N), (n=7),

Grup 4: Nesfatin verilen ve kronik stres protokolü uygulanan sıçanlar (Stres+Nesfatin= S+N), (n= 7).

3.3. Kronik Hareketsizlik Stresi Oluşturma Protokolü:

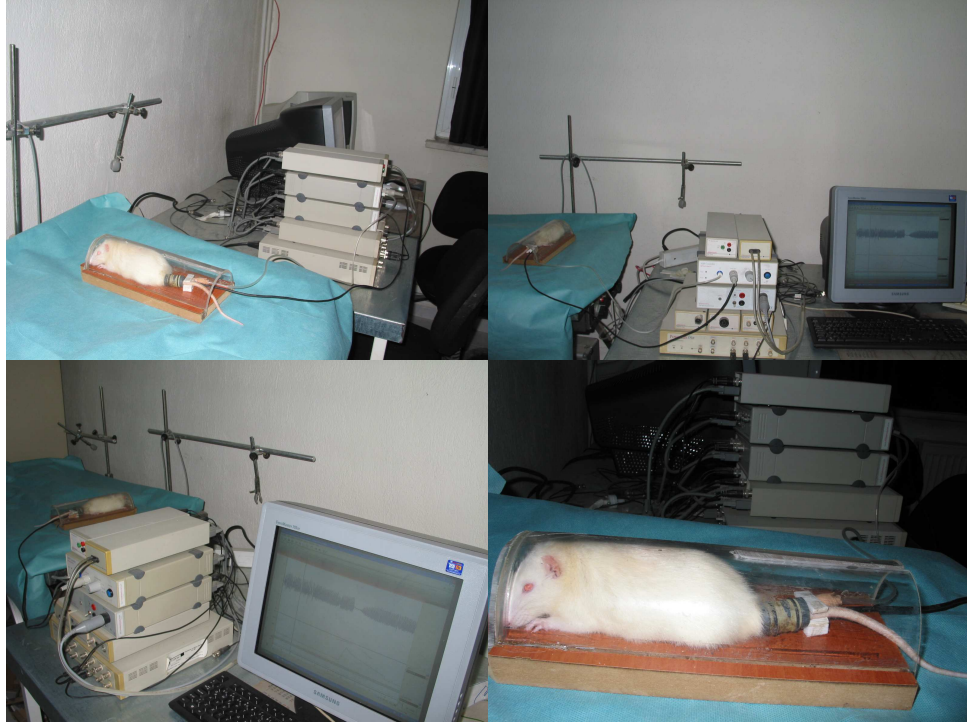
Stres ve S+N gruplarındaki toplam 14 sıçan için, birbirini takip eden 10 gün boyunca, günde 2 saat (sabah 10:00- 12:00 arası) olmak üzere, yemek ve su almalarına izin vermeden, hava geçişi için uygun deliklerin bulunduğu yarı silindirik akrilik tüpe (4,5 cm genişliğinde ve 12 cm uzunluğunda) sıçanlar yerleştirilerek kısıtlama stresi uygulaması yapıldı (Şekil 3.1) (Vyas vd 2002, Bhatia vd 2011).



Şekil 3.1 Kronik Hareketsizlik Stresi Uygulaması

3.4. Kan Basıncı Ölçme Yöntemi:

Kan basıncı ölçümleri, sıçanların bilinci açık iken Powerlab/8SP veri kayıt cihazı kullanılarak kuyruktan indirekt kuyruk manşonu yöntemi ile yapıldı. Sıçanların kan basıncı ölçümleri tüm denekler için deney başında ve sonunda olmak üzere 0. gün ve 10. günlerde ölçüldü. Her bir denek tek başına muhafaza edici bir kutuya yerleştirilerek, kuyruğuna *tail-cuff* cihazının manşonu ve sensörü takıldı. Sıçanların kuyrukları düzenli sinyal ve atım alınıncaya kadar 37°C’de 10-20 dakika süreyle ısıtıldı. Ölçümler sessiz ve sakin laboratuvar ortamında sıçanların rahat ve sakin olduğu, düzenli sinyal sesinin alındığı anda yapıldı. Değerler bilgisayara kaydedildi. Her bir sıçan için en az 5 ölçüm yapıldı. Elde edilen değerlerden en yüksek ve en düşük olanları çıkarılıp geri kalan 3 değerın ortalamaları alınarak kan basınçları hesaplandı (Şekil 3.2) (Erken vd 2013).



Şekil 3.2 Kan Basıncı Ölçme Yöntemi

3.5. Nesfatin-1 Uygulaması:

Kontrol+nesfatin ve S+N gruplarındaki toplam 14 sıçana, günde bir kez 0,25 nmol/gr (vücut ağırlığına göre) olmak üzere 10 gün boyunca sıçan nesfatin-1 segmenti, intraperitoneal olarak uygulandı (Shimizu ve Oh-I 2009).

3.6. Örneklerin Toplanması:

Deneyin başında ve sonunda olmak üzere tüm sıçanların ağırlıklarının ve kan basınçlarının ölçümü yapıldı. Tüm deneysel periyodun sonunda Ketamin-HCl/Xylazine-HCl (75 mg/kg-10 mg/kg) anestezisi uygulanan sıçanların abdominal aortalarından en az 6 ml kan alınarak antikoagülan içeren tüplere konuldu. Sıçanlar kansızlaştırıldıktan hemen sonra her bir sıçanın kalp dokusu, etrafındaki bağ ve yağ dokuları temizlenerek, standart bir şekilde total olarak çıkarıldı. Kalp doku örnekleri serum fizyolojik ile yıkanarak sıvı nitrojende donduruldu ve *Western-Blot* analizinin yapılacağı güne kadar -80°C'de muhafaza edildi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 Örneklerin Toplanması

3.7. Biyokimyasal Analizlerin Yapılması:

Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) içeren tüplere konulan venöz kan örnekleri, +4°C’de 5.000 rpm’de 15 dk santrifüj edilerek plazmalarına ayrıldı. Bu plazmalar analiz işlemlerinin yapılacağı güne kadar -80°C’de saklandı. Plazma örneklerinin tamamı ELISA yöntemi kullanılarak çalışıldı.

Anjiyotensinojen (Cusabio Biotech, Cat No CSB-E08565r), ACE2 (Cusabio Biotech, Cat No CSB-E14308r), AngII (Cusabio Biotech, Cat No CSB-E04494r), endotelin-1 (Cusabio Biotech, Cat No CSB-E06979r), eNOS (Cusabio Biotech, Cat No CSB-E08323r), aldosteron (Cusabio Biotech, Cat No CSB-E07025r), kortizol (Cusabio Biotech, Cat No CSB-E05112r), Nesfatin-1 (Phoenix Pharma., Cat No EK-003-22) plazma düzeyleri uygun ELISA kitleri kullanılarak ölçüldü.

3.7.1. Anjiyotensinojen, ACE2, AngII, Endotelin-1, eNOS ELISA Kit Protokolü:

1. Plazma örnekleri çalışılacak parametreye uygun olarak dilüsyon solüsyonu ile dilüe edildi (Plazma örnekleri sample dilüent ile endotelin- 1 için 20 kat, Anjiyotensinojen ve eNOS ELISA uygulaması için ise 400 kat dilüe edildi, ACE2 ve AngII ELISA uygulaması için dilüsyon yapılmadı).
2. Her bir ELISA uygulaması için uygun olan standartlar hazırlandı.
3. Mikroplate kuyularına ayrı ayrı olmak üzere 100 µl hazırlanan standartlardan, 100 µl dilüe edilen plazma örneklerinden eklendi. Mikroplate’in üzeri yapışkan bir bant ile kapatılarak 37°C’de 2 saat boyunca inkübasyona bırakıldı.

4. İnkübasyon sonrasında her bir kuyuya 100 µl biotin ile işaretli antibody solüsyonu eklendi ve 37°C'de 1 saat boyunca inkübasyona bırakıldı.
5. Her bir kuyu, 200 µl yıkama solüsyonu (*Wash Buffer*- WB) ile 3 kez yıkandı.
6. Her bir kuyuya 100 µl *horseradish peroxidase* (HRP)- avidin solüsyonu eklendi ve 37°C'de 1 saat boyunca inkübe edildi.
7. Her bir kuyu, 200 µl Wash Buffer ile 5 kez yıkandı.
8. Her bir kuyuya 90 µl 3,3',5,5'-*tetramethylbenzidine* (TMB) solüsyonu eklendi ve 37°C'de 30 dk karanlıkta inkübe edildi.
9. İnkübasyon sonrasında her bir kuyuya 50 µl Stop solüsyonu eklendi. Bu solüsyonun eklenmesiyle kuyudaki açık mavi renk sarı renge dönüştü.
10. Stop solüsyonu eklendikten sonra 15 dk içinde, bir mikroplate okuyucu yardımıyla her bir kuyunun optik yoğunluk değeri 450 nm dalga boyunda okutuldu.

3.7.2. Kortizol ve Aldosteron ELISA Kit Protokolü:

1. Blank kuyusu boş bırakılarak diğer kuyulara 50 µl standart ve örnekler eklendi.
2. Blank kuyusu hariç, diğer tüm kuyulara 50 µl HRP solüsyonu ve 50 µl antibody eklendi.
3. Plate'in üzeri yapışkan bir bant ile kapatılarak 37°C'de 1 saat boyunca inkübasyona bırakıldı.
4. Her bir kuyu, 200 µl WB ile 3 kez yıkandı.
5. Her bir kuyuya 50 µl *Substrate A* ve 50 µl *Substrate B* eklendi daha sonra 37°C'de 15 dk karanlıkta inkübasyona bırakıldı.
6. Her bir kuyuya 50 µl Stop solüsyonu eklendi ve yavaşça karıştırılarak 15 dk bekletildi.
7. Bir mikroplate okuyucu yardımıyla her bir kuyunun optik yoğunluk değeri 450 nm dalga boyunda okutuldu.

3.7.3. Nesfatin- 1 ELISA Kit Protokolü:

1. Protokolü uygulamadan önce tüm kit bileşenleri 24-45 dk oda ısısında bekletildi.
2. 20X *assay buffer* solüsyonunu 950 ml distile su ile dilüe edildi ve böylece kit içinde yer alan diğer solüsyonların dilüsyonu veya oluşturulması için

kullanılacak olan 1X *assay buffer* solüsyonu hazırlanmış oldu. NOT: 20X *assay buffer* solüsyonunda kristal var ise 30 dk sıcak su banyosunda kristalize görüntü gidene kadar bekletilmelidir. Kullanılmadan önce iyice karıştırılmalıdır.

3. Standart peptit santrifüj edildikten sonra 1ml 1X *assay buffer* eklenerek dilüe edildi. Elde edilen stok solüsyonunun konsantrasyonu 1,000 ng/ml'dir. Standart tamamen solüsyonda çözününceye kadar en az 10 dk oda ısısında (20-23°C) bekletildi. Kullanmadan hemen önce santrifüj ve vorteks işlemleri uygulandı.
4. Stok standart solüsyonu kullanılarak diğer standart solüsyonları aşağıda yer alan tablodaki gibi hazırlandı.

Tablo 3.1 Nesfatin- 1 ELISA kiti standartları için uygulanan dilüsyon oranları.

Standart No	Standart Hacmi	1X <i>Assay Buffer</i>	Ulaşılan Konsantrasyon
Stok	----	1000 µl	1,000 ng/ml
*1	100 µl stok	900 µl	100 ng/ml
*2	100 µl *1	900 µl	10 ng/ml
*3	100 µl *2	900 µl	1 ng/ml
*4	100 µl *3	900 µl	0,1 ng/ml

5. 5 ml 1X *assay buffer* ile primer anti- serum sulandırılarak iyice karıştırıldı ve tamamen çözününceye kadar en az 5 dk oda ısısında bekletildi.
 6. Biotin ile işaretli peptit 5 ml 1X *assay buffer* ile sulandırılarak iyice karıştırıldı ve tamamen çözününceye kadar en az 5 dk oda ısısında bekletildi.
 7. Pozitif kontrol 200 µl 1X *assay buffer* ile sulandırıldı sulandırılarak iyice karıştırıldı ve tamamen çözününceye kadar en az 5 dk oda ısısında bekletildi.
 8. İki kuyu blank olmaları için boş bırakıldı.
 9. Toplam bağlanma (*Total Binding*) ölçümü yapabilmek için B-1 ve B-2 kuyularına 50 µl 1X *assay buffer* eklendi.
 10. Sırasıyla C-1 ve C-2 kuyularından G-1 ve G-2 kuyularına doğru, hazırlanmış olan peptit standartından 50 µl eklendi.
- NOT: Peptit standartları ikili (*duplicate*) çalışılmalıdır.
11. H-1 ve H-2 kuyularına 50 µl pozitif kontrol eklendi.

NOT: Peptit kontrolleri ikili (*duplicate*) çalışılmalıdır.

12. Diğer kuyulara ise 50 µl hazırlanmış olan örnekler çiftler çiftler (*duplicate*) eklendi.
13. Blank kuyusu hariç tüm kuyulara 25 µl sulandırılmış olan primer anti-serum eklendi.
14. Blank kuyusu hariç tüm kuyulara 25 µl sulandırılmış olan biotinli peptit eklendi.
15. İmmünoplate'in üzeri asetat plate kapatıcı (APS) ile kapatıldı ve 2 saat oda ısısında (20-23°C) inkübe edildi. İnkübasyon süresinde orbital çalkalayıcıda 300-400 rpm'de çalkalama işlemi uygulandı.
16. HRP solüsyonu santrifüj edildi (3.000-5.000 rpm, 5 sn) ve 12 µl'si 12 ml 1X *assay tamponu* içinde iyice vortekslenerek çözüldü.
17. APS immünoplate'in üzerinden alındıktan sonra kuyular boşaltıldı.
18. Her kuyucuk 350 µl 1X *assay tamponu* ile 4 kez yıkandı.
19. Her kuyucuğa 100 µl HRP solüsyonu eklendi.
20. İmmünoplate tekrar APS ile kapatılarak 1 saat oda ısısında (20-23°C) inkübe edildi. İnkübasyon süresinde orbital çalkalayıcıda 300-400 rpm'de çalkalama işlemi uygulandı.
21. İnkübasyondan sonra immünoplate'in üzerinden APS uzaklaştırıldı.
22. Her kuyucuk 350 µl 1X *assay tamponu* ile 4 kez yıkandı.
23. Her bir kuyuya TMB substrat solüsyonundan 100 µl eklenerek karanlıkta ve 1 saat oda ısısında (20-23°C) inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinde orbital çalkalayıcıda 300-400 rpm'de çalkalama işlemi uygulandı.
24. İnkübasyon sonrasında her bir kuyuya 2N HCl eklenerek reaksiyon durduruldu ve kuyulardaki rengin maviden sarıya dönüşmesi gözlemlendi.
25. Stop solüsyonu eklendikten sonra 20 dk içinde, bir mikropate okuyucu yardımıyla her bir kuyunun optik yoğunluk değeri 450 nm dalga boyunda okutuldu.

3.8. *Western Blot* Tekniği ile Kalp Dokusundan L-Tipi Ca⁺² Kanal α 1c Altbirimi Protein Miktarı Tayini:

Çalışmada kullanılacak olan kalp dokusu örneklerinden *Western Blot* tekniği ile L-Tipi Ca⁺² kanal α 1c altbirimi protein miktarının tayin edilebilmesi için öncelikle kalp dokusu homojenizatı hazırlandı. Daha sonra homojenizatların toplam protein miktarı *Lowry* Yöntemi kullanılarak tayin edildi. Toplam protein miktarları belirlenmiş olan homojenizatlar *Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jele* (SDS- PAGE) yüklenerek elektroforez işlemi uygulandı. Elde edilen bantlar antiodiler ile işaretilenerek kimyasal ışıma (*Chemiluminescence*) gerçekteşti ve bu ışıma *UVP BioSpectrum Imaging System* (Upland, California, USA) cihazı yardımı ile görüntüledi. Görüntülenen bantların alan yoğunlukları yine aynı cihazın alan yoğunluk belirleme programı ile hesaplandı.

3.8.1. Kalp Dokusu Homojenizatı Hazırlanışı:

Kalp dokusundan protein izolasyonu için yapılan homojenizasyon işlemleri aşağıda belirtilen aşamalar takip edilerek uygulanmıştır.

1. Radioimmünopresipitasyon (RIPA) lizis tamponu hazırlandı (Tablo 3.2).

Tablo 3.2 RIPA solüsyonu hazırlanışı.

Bileşenler	Bileşen Miktarı
50 mM Tris	500 ml (0,1 M pH: 8 Tris)
%1 Triton X-100	10 ml
%0,1 SDS	10 ml (%10 SDS)
150 mM NaCl	150 ml (1 M NaCl)
%0,5 Sodium deoxycholate	5 gr
Saf su (dH ₂ O)	1 litreye tamamlanır

2. 10 ml RIPA içine 1 tane proteinaz kokteyl tablet (sc-29130) eklendi.
3. Tüm kalp dokusu 4 ml RIPA+ proteinaz kokteyl tablet solüsyonu içine kondu.
4. Homojenizatör (D8, Art-Micra, Germany) (Devir 8) ile kalp dokusu homojenize edildi. Tüm homojenizasyon işlemleri buz içinde ve tüm kalp parçalanıncaya kadar yapıldı.
5. Elde edilen homojenizatlar 1 saat buzda bekletildi.

6. Homojenizatlar daha sonra 13.500 g'de, +4°C'de 20 dk santrifüj edildi.
7. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant kısımları eppendorf tüplerine konuldu ve toplam protein miktarı *Lowry* Yöntemi ile tayin edildi.

3.8.2. *Lowry* Yöntemi ile Homojenizatın Toplam Protein Miktarının Hesaplanması:

Western Blot Analizinin yapılabilmesi için kalp dokusundan elde edilen homojenizatlardan jele yüklenecek miktarların tayini *Lowry* yöntemi ile homojenizatın toplam protein miktarının belirlenmesi sonucu gerçekleşmiştir. *Lowry* yöntemi aşağıda belirtilen şekilde uygulanmıştır.

1. *Lowry* Solüsyonları hazırlandı (Tablo 3.3).

Tablo 3.3 *Lowry* Solüsyonlarının hazırlanışı.

Ayıraç A	%2 Na ₂ CO ₃ (0,1 N NaOH içinde)
Ayıraç B	%1 NaK- Tartarat
Ayıraç C	%0,5 CuSO ₄ -5H ₂ O
Ayıraç D	1 M Folin ayıracağı+ dH ₂ O (1:1)
Ayıraç X	AyıraçA+AyıraçB+AyıraçC (48:1:1)
Standart Ana Stok	%0,1 Bovin Serum Albümin (BSA) Solüsyonu

2. ELISA plate kuyularına 50 µl standart ve homojenizat örnekleri yüklendi.
3. Yüklenecek her bir kuyuya 200 µl Ayıraç X eklendi.
4. ELISA plate karanlıkta 10 dk inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonrası her bir kuyuya 20 µl Ayıraç D eklendi.
6. ELISA plate karanlıkta 30 dk inkübe edildi.
7. Yükleme yapılan kuyuların optik yoğunluk değeri mikropate okuyucu ile 630 nm dalga boyunda okutuldu.
8. Homojenizatların toplam protein miktarları oluşturulan standart kalibrasyon grafiğinden yararlanarak hesaplandı.

3.8.3. Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel (SDS- PAGE) Elektroforezi:

3.8.3.1. SDS- PAGE Hazırlanışı:

L- Tipi Ca⁺² kanal α 1c altbirimi proteini için %10'luk SDS-PAGE uygulaması aşağıda belirtilmiş olan basamaklara göre yapıldı.

1. Jelin döküleceği camlar kullanımdan önce metanol ile kalıntı kalmayacak şekilde temizlendi.
2. Elektroforez aparatı tezgâha yatay olarak yerleştirildi.
3. Kulaklı cam yatırılıp üstüne jelin sızması için plastik tıkaç yerleştirildi ve diğer cam bunun üstüne konarak jelin yükleneceği hazne hazırlandı.
4. Üzerine elektroforez aparatının diğer parçası konularak kelepçeler yardımıyla birbirlerine kenetlendi.
5. Camların arasına önce içine distile su konarak sızdırmazlığı kontrol edildi.
6. Seçilen konsantrasyondaki ayırıcı jel için monomer karışımı, aşağıdaki tablo izlenerek hazırlandı (Tablo 3.4). Not: Amonyum persülfat (APS) ve tetramethylenediamine (TEMED) aynı anda eklenmelidir ve eklendikten sonra hemen karıştırılmalı anında kullanılmalıdır.

Tablo 3.4 % 10'luk ayırıcı jel hazırlanışı.

Bileşenler	Bileşen Miktarı (ml)
Saf su (dH ₂ O)	4
1,5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2,5
% 10 SDS	0,1
% 30 Akrilamid/Bis-akrilamid	3,3
% 10 APS	0,1
TEMED	0,004

7. Hazırlanan çözelti camlı sisteme üzerindeki şeffaf çizgiye ulaşılan kadar kabarcık oluşmamasına dikkat edilerek dolduruldu. Not: Jelin bir kısmının kullandığımız kaptaki kalmasına dikkat edilir, böylece polimerizasyon dışarıdan kontrol edilebilir.
8. Yüklenen jelin yüzeyi n-bütanol ile kaplandı.
9. Jelin polimerize olması için 30-45 dk beklendi.

10. Jel yüzeyindeki n-bütanol döküldü.

11. Paketleyici (Stacking) jel için monomer karışımı aşağıdaki tablo izlenerek hazırlandı (Tablo 3.5).

Tablo 3.5 Paketleyici jeli hazırlanışı.

Bileşenler	Bileşen Miktarı (ml)
Saf su (dH ₂ O)	2,7
1,5 M Tris-HCl (pH 6.8)	0,63
% 10 SDS	0,05
%30 Akrilamid/Bis-akrilamid	0,83
% 10 APS	0,05
TEMED	0,005

12. Hazırlanan jel beklemeden ayırıcı jelin üstüne hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilerek döküldü.

13. Jel tarafları polimerize olmamış karışım içine yerleştirildi.

14. Jelin polimerize olması için 30-45 dk beklendi.

3.8.3.2. Elektroforetik Yürütme:

Elektroforetik yürütme aşağıda belirtilmiş olan basamaklara göre yapıldı.

1. Elektroforez için kullanılacak olan yürütme tamponu (*Running Buffer*) aşağıdaki tablo izlenerek hazırlandı (Tablo 3.6).

Tablo 3.6 Elektroforez yürütme tamponu hazırlanışı.

Bileşenler	Bileşen Miktarı
0,25 M Tris Base	3 gr
1,92 M Glycine	14,4 gr
%1 SDS	1 gr
Saf su (dH ₂ O)	1 litreye tamamlanır

2. Yükleme uçları kullanılarak marker (HiMark™ Pre-Stained Protein Standard Cat. No. LC5699) 7 µl ve örnekler 15 µl olacak şekilde jele yüklendi.

3. Örnek yüklendikten hemen sonra sistem kapatıldı ve elektrotlar bağlandı.

4. Örnekler ayırıcı jele girinceye kadar 90 V gerilim 15 dk uygulandı.
5. Örnek ayırıcı jele geçtikten sonra ise gerilim 110 V'a çıkarıldı ve 1 saat uygulandı.
6. Brom fenol mavisi jelin alt ucuna ulaşınca akım kesildi ve jel tanktan uzaklaştırıldı.

3.8.4. Blotlama (*Semi-Dry Transfer*):

Elektroforetik yürütmeden sonra gerçekleştirilen blotlama işlemi aşağıda belirtilmiş olan basamaklara göre yapıldı.

1. Transfer için kullanılacak *polyvinylidene difluoride* (PVD) membran (Millipore, Bedford, MA, USA) uygun bir plastik kaba konularak üzeri metanol ile kaplandı ve 5 dk yatay çalkalayıcıda çalkalandı.
2. 3 mm kalınlığındaki filtre kâğıtları uygun boyutlarda kesilerek transfer tamponunda 5 dk boyunca bekletildi. Transfer tamponu aşağıdaki tablo izlenerek hazırlandı (Tablo 3.7).

Tablo 3.7 Transfer tamponu hazırlanışı.

Bileşenler	Bileşen Miktarı
48 mM Tris Base	5,82 gr
39 mM Glycine	2,93 gr
%1 SDS	1 gr
Saf su (dH ₂ O)	1 litreye tamamlanır

3. Membranın içinde bulunduğu kaptaki metanol uzaklaştırıldı ve transfer tamponu eklenerek 5 dk yatay çalkalayıcıda çalkalandı.
4. Jel uygun bir kapta transfer tamponu içinde 5 dk bekletildi.
5. Trans-Blot SD cihazı (Bio-Rad, USA) tankına en alta filtre kâğıdı, üzerine membran, membranın üzerine jel, jelin üstüne ise tekrar bir filtre kâğıdı yerleştirildi.
6. Bu aşamalar sırasında katmanlar arasında hava kabarcığı kalmaması için dikkat edildi.
7. Kapaklar kapatıldıktan sonra 350 mAmp akımda 50 dk süreyle transfer işlemi gerçekleştirildi.

3.8.5. Bloklama:

Transfer işlemi tamamlandıktan sonra membran bloklama işlemi aşağıda belirtilmiş olan basamaklara göre yapıldı.

1. Bloklama solüsyonu hazırlayabilmek için öncelikle TBS (*Tris Buffered Saline*) solüsyonu aşağıdaki tablo izlenerek hazırlandı (Tablo 3.8).

Tablo 3.8 TBS solüsyonu hazırlanışı.

Bileşenler	Bileşen Miktarı
20 mM Tris Base	4,84 gr
500 mM NaCl	58,48 gr
Saf su (dH ₂ O)	2 litreye tamamlanır
HCl ile solüsyonun pH'sı 7,5 olarak ayarlandı.	

2. Bloklama solüsyonu aşağıdaki tablo izlenerek hazırlandı (Tablo 3.9).

Tablo 3.9 Bloklama solüsyonu hazırlanışı.

Bileşenler	Bileşen Miktarı
TBS	10 ml
%1 BSA	10 mg

3. Transfer işlemi tamamlanan membran bloklama solüsyonunda +4°C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı.

3.8.6. Birincil ve İkincil Antikor ile İnkübasyon:

1. Bloklama işlemi bitmiş membranlar bloklama solüsyonundan uzaklaştırılarak uygun plastik bir kaba alındı.
2. Membranlar yıkama solüsyonu (TBS) ile 3 kez 15'er dk yıkandı.
3. Yıkama solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra membran üzerine 10 ml TBS içinde 1/500 kez dilüe edilmiş olan primer antikor (sc-25686) solüsyonu eklendi ve oda ısısında 2 saat boyunca yatay çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.
4. Membranlar yıkama solüsyonu (TBS) ile 3 kez 15'er dk yıkandı.
5. Yıkama solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra membran üzerine 10 ml TBS içinde 1/5000 kez dilüe edilmiş olan *horseradish peroxidase* (HRP) bağlı sekonder

antikor (sc-2030) solüsyonu eklendi ve oda ısısında 1 saat boyunca yatay çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.

6. Membranlar yıkama solüsyonu (TBS) ile 3 kez 15'er dk yıkandı.

3.8.7. Antikor ile İşaretli Bantların Görüntülenmesi ve Alan Yoğunluklarının Hesaplanması:

İkincil antikora bağlı bulunan *horseradish peroxidase* (HRP) enzimi, *Western Blotting Luminol Reagent* kitindeki (sc-2048) ECL solüsyonunda bulunan *Lumigen PS-3* substratını katalizler. Bu reaksiyon sonucu açığa çıkan luminol ışımaya yol açar. Bu ışımaya ile işaretli olan protein bantları *UVP BioSpectrum Imaging System* cihazı yardımı ile görüntülendi. Görüntülenen bantların alan yoğunlukları yine aynı cihazın alan yoğunluk belirleme programı ile hesaplandı.

3.9. İstatiksel Analiz:

İstatiksel değerlendirmeler SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 16.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Bütün değerler ortalama±standart sapma (ort±ss) şeklinde verildi. Aynı grubun uygulama öncesi ve sonrası parametrelerine ait verilerin karşılaştırmasında Wilcoxon Testi, ikiden fazla grupların karşılaştırmalarında Kruskal-Wallis testi, ikili grupların karşılaştırılmasında ise Mann-Whitney U testi kullanılarak istatistiksel analizler yapıldı. Elde edilen değerler $p < 0.05$ 'den küçük ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Normal ve kronik stres oluşturulmuş sıçanlarda nesfatinin kan basıncı düzenlenmesine etkilerinin araştırıldığı bu çalışmada, nesfatin ve stres uygulaması öncesi ve sonrasında, sıçanların canlı vücut ağırlıkları ve kan basınçları (KB) ölçüldü. Kontrol (K), Stres (S), Kontrol+Nesfatin (K+N), Stres+Nesfatin (N+S) gruplarının deney başlangıcı ve sonrasında kendi kontrolleri (Tablo 4.1A, Tablo 4.1B) ve birbirleri arasında (Tablo 4.2) bu parametreler açısından farklılıklar karşılaştırıldı.

Tablo 4.1A Kontrol (K), Stres (S), Nesfatin (N) ve Stres+Nesfatin (S+N) gruplarındaki sıçanların deney önce ve sonrası vücut ağırlıkları (ort±ss).

Gruplar	Vücut Ağırlığı Önce (gr)	Vücut Ağırlığı Sonra (gr)	p
K (n=7)	353.14±34.94	353.71± 35.74	0.194
S (n=7)	328.14±11.96	317.42±16.56	0.028
K+N (n=7)	353.71±35.74	328.85±41.05	0.018
S+N (n=7)	333.71±12.48	309.71±12.16	0.018

p: Grup içindeki anlamlılığı ifade eder (Wilcoxon Testi).

Kontrol, S, K+N ve S+N grupları nesfatin ve stres uygulaması öncesi ve sonrasında olmak üzere kendi içlerinde sıçanların vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında stres, K+N ve S+N gruplarındaki sıçanların uygulama sonrasında uygulama öncesine göre vücut ağırlıklarındaki azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü, sırasıyla; p=0.028, p=0.018, p=0.018 (Tablo 4.1A).

Tablo 4.1B Kontrol (K), Stres (S), Nesfatin (N) ve Stres+Nesfatin (S+N) gruplarındaki sıçanların deney önce ve sonrası kan basıncı düzeyleri (ort±ss).

Gruplar	KB Önce (mm-Hg)	KB Sonra (mm-Hg)	p
K (n=7)	121.37 ± 4.21	123.09 ± 4.16	0.237
S (n=7)	127.92± 11.85	131.60± 10.31	0.310
K+N (n=7)	128.14 ±10.25	151.63 ± 10.2	0.028
S+N (n=7)	128.17 ± 7.63	146.81 ± 12.70	0.080

p: Gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder (Wilcoxon Testi).

Kontrol, S, K+N ve S+N grupların nesfatin ve stres uygulaması öncesi ve sonrası kan basınçları karşılaştırıldığında K+N grubu sıçanların uygulama sonrasında uygulama öncesine göre kan basınçlarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi (p=0.028) (Tablo 4.1B).

Tablo 4.2 Kontrol, S, K+N, S+N gruplarındaki sıçanların vücut ağırlıkları ve kan basıncı düzeyleri (ort±ss).

Gruplar	K (n=7)	S (n=7)	K+N (n=7)	S+N (n=7)	p
Vücut Ağırlığı Önce (gr)	353.14±34.94	328.14±11.96	353.71±35.74	333.71±12.48	0.333
Vücut Ağırlığı Sonra (gr)	353.71± 35.74 ^a	317.42±16.56	328.85±41.05	309.71±12.16 ^a	0.108
KB Önce (mm-Hg)	121.37 ± 4.21	127.92± 11.85	128.14 ±10.25	128.17 ± 7.63	0.193
KB Sonra (mm-Hg)	123.09 ± 4.16 ^{aa,bb}	131.60± 10.31 ^{cc,d}	151.63 ± 10.21 ^{aa,cc}	146.81 ± 12.70 ^{bb,d}	0.001

p: Çoklu gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder (Kruskal Wallis).

^{a,b,c,d}; Aynı satırda, aynı harfi taşıyanlar arasındaki fark istatistiksel olarak p<0.05 düzeyinde anlamlıdır (Mann Whitney U test).

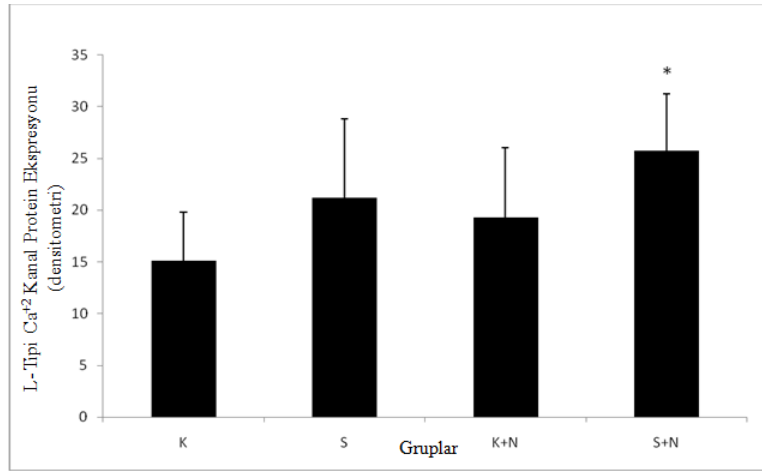
^{aa,bb,cc}; Aynı satırda, aynı harfi taşıyanlar arasındaki fark istatistiksel olarak p<0.01 düzeyinde anlamlıdır (Mann Whitney U test).

Kontrol, S, K+N ve S+N gruplarındaki sıçanların vücut ağırlıklarının çoklu karşılaştırılmasında, nesfatin ve stres uygulaması öncesi ve sonrası, aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü (Tablo 4.2). İkili karşılaştırmalarda ise, S+N grubunda K grubuna göre sıçanların vücut ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p=0.017$).

Çalışmamızda nesfatin ve stres uygulaması öncesi K, S, K+N ve S+N gruplarının kan basınçlarının çoklu karşılaştırılmasında aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü (Tablo 4.2). Nesfatin ve stres uygulaması sonrasında ise tüm grupların kan basınçlarının çoklu karşılaştırılmasında aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi ($p=0.001$) (Tablo 4.2). Yapılan ikili karşılaştırmalarda, K grubuna göre K+N grubundaki sıçanların kan basıncı değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ($p=0.001$). Stres ve nesfatin uygulaması sonrasında ise K grubu sıçanların kan basıncı değerlerine göre S+N grubu sıçanların kan basıncı değerlerindeki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p=0.005$). Stres ve K+N gruplarının stres ve nesfatin uygulaması sonrası kan basıncı değerleri karşılaştırıldığında, K+N grubu sıçanların kan basıncı değerlerinin S grubu sıçanlarınıninkine göre arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi ($p=0.005$). Uygulama sonrasında S+N grubundaki kan basıncı değerlerinin S grubuna göre artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.03$).

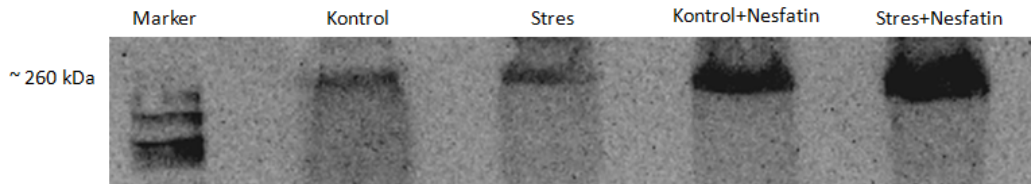
4.1. L-Tipi Ca^{+2} Kanal $\alpha 1c$ Altbirimi Proteini Ekspresyon Düzeylerinin Western Blot Analiz Sonuçları

Çalışmamızda, K (15.06 ± 4.71), S (21.17 ± 7.63), K+N (19.23 ± 6.74) ve S+N (25.73 ± 5.52) grupları arasında çoklu karşılaştırmada L-Tipi Ca^{+2} kanal $\alpha 1c$ altbirimi proteini ekspresyon düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi ($p=0.178$). Yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda ise K grubuna göre S+N grubunda L-Tipi Ca^{+2} kanal $\alpha 1c$ altbirimi proteini ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı ($p=0.032$) (Şekil 4.1) Her grup içinden rastgele seçilen sıçanların kalp örneklerinden yapılmış olan *Western Blot* analiz görüntüsü, K grubuna göre S+N grubundaki L-Tipi Ca^{+2} kanal $\alpha 1c$ alt birimi proteini ekspresyon düzeyindeki artışı görsel bir şekilde temsil etmektedir (Şekil 4.2).



Şekil 4.1 Kontrol, S, K+N, S+N gruplarının kalbinde L-tipi Ca²⁺ kanal α 1c altbirimi proteini ekspresyon düzeyi.

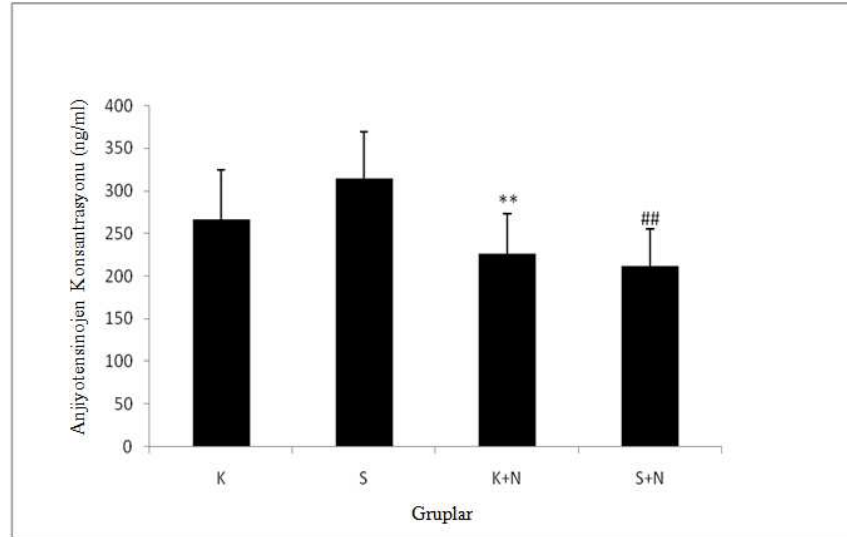
*; Kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ($p < 0.05$) ifade eder (Mann Whitney U test).



Şekil 4.2 Kalp L-Tipi Ca²⁺ kanal α 1c altbirimi proteini *Western Blot* görüntüsü

4.2. Plazma Anjiyotensinojen (Ang) Konsantrasyonu

Çalışmamızda K (266.3 ± 58.53 ng/ml), S (314.37 ± 54.52 ng/ml), K+N (225.66 ± 47.51 ng/ml) ve S+N (212.15 ± 43.64 ng/ml) grupları plazma Ang düzeyleri karşılaştırıldı. Gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p=0.006$). Ayrıca ikili karşılaştırmalarda, S grubuna göre K+N ve S+N gruplarında plazma anjiyotensinojen seviyelerinin düştüğü görüldü, bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulundu, sırasıyla; $p=0.007$, $p=0.002$ (Şekil 4.3).

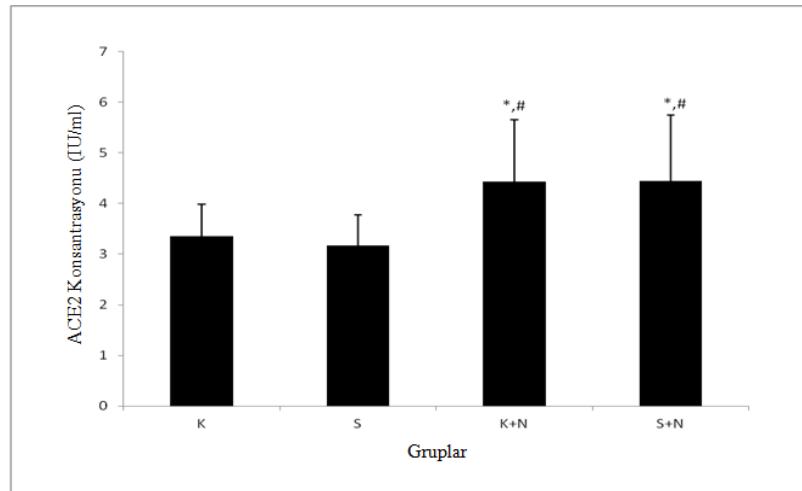


Şekil 4.3 Kontrol, S, K+N, S+N gruplarında plazma anjiyotensinojen konsantrasyonu.

**##; Stres grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ($p < 0.01$) ifade eder (Mann Whitney U test).

4.3. Plazma Anjiyotensinojen Dönüştürücü Enzim 2 (*Anjiyotensinojen Converting Enzyme; ACE2*) Konsantrasyonu

Kontrol (3.36 ± 0.63 IU/ml), S (3.17 ± 0.61 IU/ml), K+N (4.43 ± 1.23 IU/ml) ve S+N (4.45 ± 1.30 IU/ml) grupları arasında plazma ACE2 düzeylerinin anlamlı farklı olduğu gözlemlendi ($p = 0.021$). Ayrıca ikili yapılan karşılaştırmalarda, K grubuna göre K+N ve S+N gruplarında, S grubuna göre K+N ve S+N gruplarında plazma ACE2 seviyelerinin istatistiksel açıdan anlamlı olarak arttığı görüldü, sırasıyla; $p = 0.038$, $p = 0.038$, $p = 0.038$, $p = 0.017$ (Şekil 4.4).



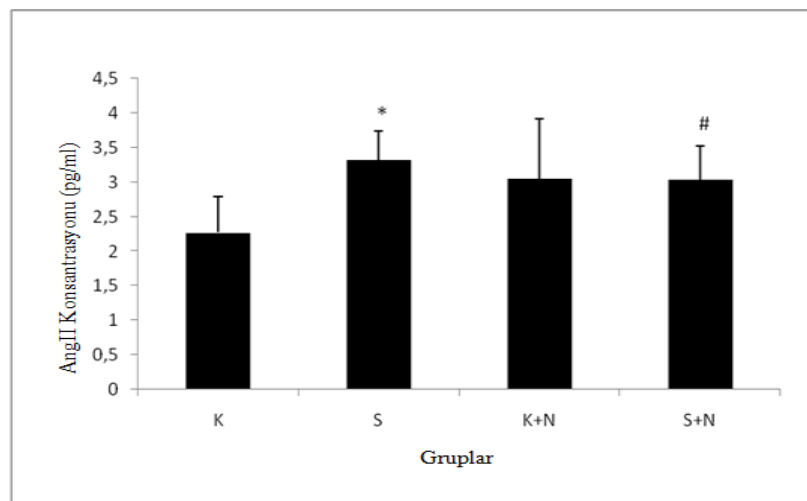
Şekil 4.4 Kontrol, S, K+N, S+N gruplarında plazma ACE2 konsantrasyonu.

*; Kontrol ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ($p < 0.05$) ifade eder (Mann Whitney U test).

#; Stres ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ($p < 0.05$) ifade eder (Mann Whitney U test).

4.4. Plazma Anjiyotensin II (AngII) Konsantrasyonu

Kontrol (2.27 ± 0.52 pg/ml), S (3.32 ± 0.42 pg/ml), K+N (3.05 ± 0.87 pg/ml) ve S+N (3.04 ± 0.49 pg/ml) grupları arasında plazma AngII düzeyleri açısından anlamlı fark gözlenmedi ($p = 0.05$). Yapılan ikili karşılaştırmalarda ise K grubuna göre S ve S+N gruplarında, plazma AngII seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı arttığı gözlemlendi, sırasıyla; $p = 0.01$, $p = 0.03$ (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 Kontrol, S, K+N, S+N gruplarında plazma AngII konsantrasyonu.

*.#; Kontrol ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ($p < 0.05$) ifade eder (Mann Whitney U test).

4.5. Plazma Aldosteron, Kortizol, Endotelin-1 Konsantrasyonları

Kontrol, S, K+N ve S+N gruplarının plazma aldosteron, kortizol ve endotelin-1 konsantrasyonları karşılaştırıldığında aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi (Tablo 4.3).

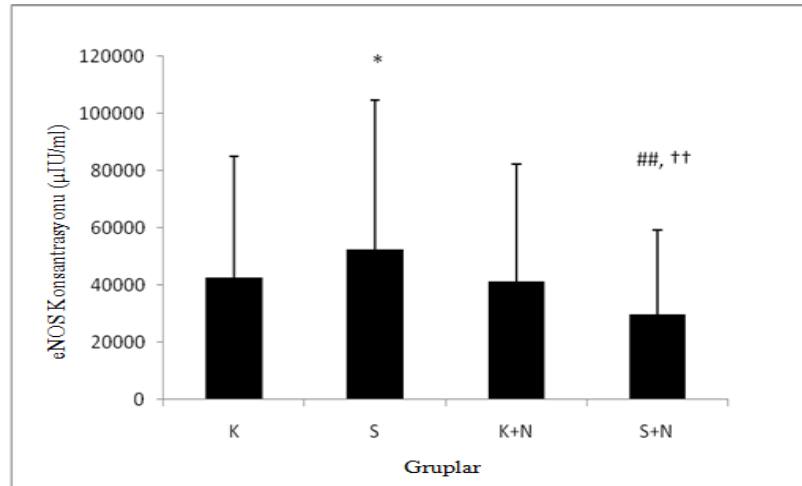
Tablo 4.3 Kontrol, S, K+N, S+N gruplarında plazma aldosteron, kortizol ve endotelin-1 konsantrasyonlarının karşılaştırılması (ort \pm ss)

Gruplar	K (n=7)	S (n=7)	K+N (n=7)	S+N (n=7)	p
Aldosteron	475.86 \pm 85.46	517.74 \pm 30.75	506.58 \pm 84.74	503.88 \pm 57.12	0.814
Kortizol	11.52 \pm 1.78	12.22 \pm 1.19	11.65 \pm 1.56	11.71 \pm 1.96	0.854
Endotelin-1	32.84 \pm 16.40	20.13 \pm 6.66	22.06 \pm 3.85	22.06 \pm 9.59	0.307

p: Çoklu gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder (Kruskal Wallis).

4.6. Plazma eNOS Konsantrasyonu

Kontrol (42418.45 \pm 3441.17 μ lU/ml), S (52296.51 \pm 7436.33 μ lU/ml), K+N (41148.78 \pm 15617.25 μ lU/ml) ve S+N (29651.22 \pm 6835.19 μ lU/ml) grupları arasında plazma eNOS düzeyi açısından anlamlı fark gözlemlendi (p=0.004). Yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda, K grubuna göre S grubunda plazma eNOS seviyesinin istatistiksel açıdan anlamlı olarak arttığı görüldü (p=0.01) (Şekil 4.6). Kontrol ve S gruplarına göre S+N grubunda plazma eNOS seviyesinin istatistiksel açıdan anlamlı olarak azaldığı görüldü, sırasıyla p=0.009, p=0.001 (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 Kontrol, S, K+N, S+N gruplarında plazma eNOS konsantrasyonu.

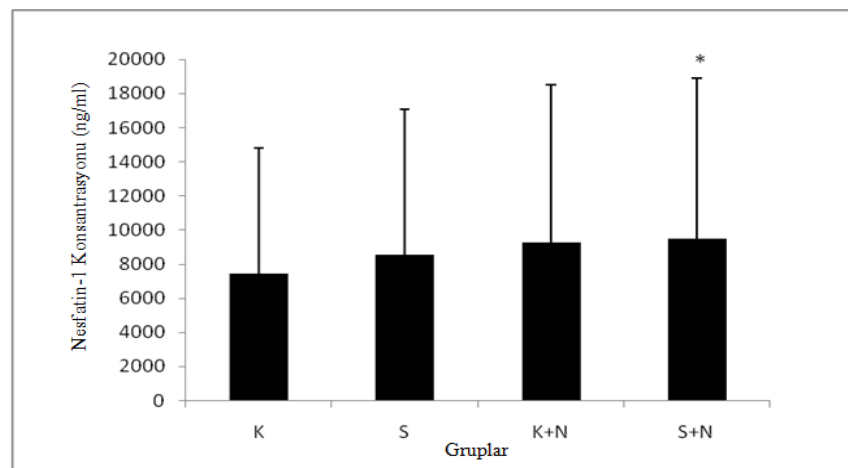
*; Kontrol ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ($p < 0.05$) ifade eder (Mann Whitney U test).

##; Kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ($p < 0.01$) ifade eder (Mann Whitney U test).

††; Stres grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ($p < 0.01$) ifade eder (Mann Whitney U test).

4.7. Plazma Nesfatin Konsantrasyonu

Kontrol (7402.38 ± 1630.94 ng/ml), S (8530.40 ± 1712.69 ng/ml), N (9265.18 ± 1736.66 ng/ml) ve S+N (9450.97 ± 1498.08 ng/ml) grupları arasında plazma nesfatin-1 düzeyi açısından anlamlı fark gözlenmedi ($p = 0.136$). Yapılan ikili karşılaştırmalarda ise, K grubuna göre S+N grubunda plazma nesfatin-1 seviyesinin istatistiksel açıdan anlamlı olarak arttığı görüldü ($p = 0.026$) (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 Kontrol, S, K+N, S+N gruplarında plazma Nesfatin-1 konsantrasyonu.

*; Kontrol ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ($p < 0.05$) ifade eder (Mann Whitney U test).

5. TARTIŞMA

Hipertansiyon birçok genetik ve çevresel faktöre bağlı olarak meydana gelebilen kompleks, multifaktöryel ve önemli bir sağlık problemidir (Sun ve Zhang 2005). Akut ve kronik strese bağlı olarak ortaya çıkan aşırı kardiyovasküler yanıtlar hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalık riskini artırabilir (Bechtold vd 2009). Kronik strese bağlı olarak glukokortikoidlerin bazal seviyesindeki yükseliş, stresin kalp ve damar sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerine katkı sağlamaktadır (Bechtold vd 2009). Aralarında kuvvetli ilişkilerin bulunduğu hipertansiyon ve stres günümüzde oldukça sık görülen ve yaşam kalitesini etkileyen önemli sağlık sorunlarıdır. Tedavi edilmedikleri veya ortadan kaldırılmadıkları durumlarda daha ciddi sağlık sorunlarına yol açabilmektedirler.

Nesfatin-1 hipotalamus ve beyin sapından salgılanan, leptin yolağından bağımsız olarak iştah kontrolünde etkinlik gösteren bir peptiddir (Cowley ve Grove 2006, Oh-I ve Shimizu 2006). Bu nedenle de obezite tedavisinde etkin bir terapotik ajan olarak kullanılması düşünülmektedir. Kan beyin bariyerini her iki doğrultuda geçebilen ve literatürde beslenme üzerine olan etkileri daha detaylı olarak çalışılmış olan bu peptidin, diğer fizyolojik parametrelere etkisi ve etki mekanizmaları halen tam olarak aydınlığa kavuşturulamamıştır. Yapılan çalışmalar nesfatin-1 ve stres arasında bağlantının olabileceğini göstermektedir (Liu vd 2007, Goebel vd 2009, Stengel vd 2009, Xu vd 2010, Yoshida ve Maejima 2010). Bunların yanı sıra stres koşullarında merkezi sinir sisteminde nesfatin-1 düzeyinin arttığı bildirilmektedir (Yoshida ve Maejima 2010). Nesfatin-1'in kan basıncını arttırıcı etkisi bildirilmiş ancak kan basıncını hangi mekanizmayla arttırdığı netlik kazanmamıştır (Yosten ve Samson 2009, Yamawaki vd 2012).

Yapılmış olan bazı çalışmalarda nesfatin-1'in kan basıncı üzerine olan etkisinden bağımsız olarak hipotalamus L, P ve Q tipi kalsiyum kanallarını aktive ettiği, pankreas adacık beta hücrelerinde L-tipi Ca^{+2} kanal aktivasyonu aracılığı ile insülin salgılanmasını arttırdığı gösterilmiştir (Brailoiu vd 2007, Nakata ve Manaka 2011). Fakat nesfatin-1'in kalp L-tipi Ca^{+2} kanallarına etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya literatürde rastlanamamıştır. Bu bilgiler doğrultusunda nesfatin-1'in kalpte de L-tipi Ca^{+2} kanalları üzerine etkili olabileceği ve bu etkisinin kan basıncının artışı ile ilişkili olduğunu düşünerek çalışmamızın hipotezini kurgulamış bulunmaktayız.

Leptin yolağından bağımsız olarak beslenmeyi baskıladığı için obezite tedavilerinde etkin bir şekilde kullanılması düşünülen nesfatin-1'in muhtemel hipertansif etkisinin ciddi sağlık problemlerine yol açabileceğini öngörerek planlamış olduğumuz bu çalışmada, normal ve stres oluşturulmuş sıçanlarda kronik sistemik nesfatin-1 uygulamasının kan basıncı üzerine olan etkileri gözlemlendi. Yapmış olduğumuz çalışmada nesfatin-1'in kalp L- tipi Ca^{+2} kanalı $\alpha 1c$ altbirimi proteini, plazma endotelin-1, eNOS, kortizol ve RAAS elemanlarından olan; anjiyotensinojen, ACE2, AngII, aldosteron parametrelerine olan etkisi araştırılarak, nesfatin-1 aracılığı ile meydana gelen kan basıncı değişikliklerinin nedenleri açıklanmaya çalışıldı.

Çalışmamızın başlangıcında ve bitiminde tüm gruptaki sıçanların vücut ağırlıkları ölçüldü. Vücut ağırlıkları her grubun kendi içinde karşılaştırıldığında, K grubu dışındaki diğer tüm grupta kilo kaybı görüldü. Gruplar arası ikili karşılaştırmalarda K grubuna göre S+N grubundaki sıçanların vücut ağırlıklarındaki azalma anlamlıdır. Bugüne kadar yapılmış olan çalışmalar nesfatin-1'in hem merkezi hem de periferik uygulamasının beslenmeyi baskılayarak vücut ağırlığında azalışa neden olduğunu bildirmektedir (Oh-I ve Shimizu 2006, Shimizu ve Oh-I 2009). Çalışmamızda gözlemlemiş olduğumuz nesfatin-1 verilen grupların uygulama sonrasında vücut ağırlıklarındaki azalış literatür ile uyumluluk göstermektedir. Literatürde nesfatin-1'den bağımsız olarak kronik hareketsizlik stresinin diyet ya da davranış ile ilişkili bir şekilde kilo kaybına neden olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Harris vd 1998, Harris vd 2006, Hennebelle vd 2012). Bunun yanı sıra stres ile nesfatin-1 ilişkisini incelemiş olan çalışmalar bize kronik hareketsizlik stresi sonucunda meydana gelen kilo kaybını açıklayabilmek için farklı bir bakış açısı sunmaktadırlar (Liu vd 2007, Goebel vd 2009, Stengel vd 2009, Könczöl vd 2010, Xu vd 2010, Yoshida ve Maejima 2010, Yosten ve Samson 2010). Xu ve arkadaşlarının 2010 yılında yapmış oldukları bir çalışma ile akut ve CVM streslerin pregangliyonik olmayan npEW yer alan nesfatin-1 salgılayan nöronları aktive ettiği gösterilmiştir (Xu vd 2010). Yapılmış olan diğer çalışmalara göre ise akut hareketsizlik stresi, hipotalamusun PVN'u ve SON'u, beyin sapında yer alan NTS'da, LC, DR nukleusları ve ARC nukleuslarda bulunan nesfatin-1 üreten nöronların aktivasyonlarındaki artışa bağlı olarak nesfatin-1 üretimini arttırmaktadır. Aynı zamanda icv nesfatin-1 uygulaması PVN, SON, NTS, LC, DR ve medyan raphe nukleusunda yer alan PVN-CRH, NTS-NA, LC- NA ve DR-5-HT nöronlarının aktivasyonunu başka bir deyişle stres cevabını arttırmaktadır (Goebel vd 2009, Yoshida

ve Maejima 2010). Yapılmış olan bu çalışmalar sonucunda elde edilen veriler stres ile nesfatin arasındaki bağlantıyı ortaya koymaktadır. Literatür bilgilerine dayanarak; uygulamış olduğumuz kronik hareketsizlik stresinin merkezi nesfatin-1 üretiminde muhtemel bir artışa neden olduğunu söyleyebiliriz. Bu nedenle de; S grubu sıçanlarda kendi kontrollerine göre kilo kaybının istatistiksel açıdan anlamlı bulunmasının, artmış merkezi nesfatin-1 üretimi ile gerçekleşmesi söz konusu olabilecek baskılanmış besin alımı sonucunda gerçekleştiğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda merkezi nesfatin-1 seviyesine bakmadık ancak plazma nesfatin-1 düzeylerine bakabildik. Sadece stres ve nesfatin-1 uygulanan S ve K+N gruplarına ait plazma nesfatin-1 bir düzeylerinde anlamlı artış gözlenmezken, her iki uygulamanın beraber yapıldığı S+N grubundaki plazma nesfatin-1 düzeyindeki artış anlamlıdır. Yapmış olduğumuz taramalar sonucunda, literatürde kronik hareketsizlik stresinin plazma nesfatin-1 seviyesine olan etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak günümüze kadar yapılmış olan çalışmalarda, akut stres uygulamasının merkezi nesfatin-1 seviyesindeki artışa neden olduğu gösterilmiş (Liu vd 2007, Goebel vd 2009, Stengel vd 2009, Könczöl vd 2010, Xu vd 2010, Yoshida ve Maejima 2010, Yosten ve Samson 2010) bunun yanı sıra plazma nesfatin-1 seviyesini değiştirmedeği tespit edilerek (Yoshida ve Maejima 2010) stres ve nesfatin-1 arasındaki ilişki açıklanmaya çalışılmıştır. Çalışmamızda K grubuna göre S ve K+N gruplarında plazma nesfatin-1 seviyesindeki istatistiksel olarak anlam taşımayan artışın, S+N grubunda istatistiksel olarak anlamlılık kazanması, akut hareketsizlik stresinin aksine kronik hareketsizlik stresinin plazma nesfatin-1 seviyesinde artışa neden olabileceği yönünde değerlendirilebilir. Bu bilgiler ışığında kronik hareketsizlik stresinin plazma nesfatin-1 seviyesini arttırdığını söyleyebiliriz.

Yapmış olduğumuz çalışmada K+N grubu sıçanların uygulama sonrasında uygulama öncesine göre kan basınçlarındaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda nesfatin-1 ve stres uygulaması sonrasında tüm gruplar arasında yapılan karşılaştırma sonucunda gözlenen kan basınçlarındaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlılık taşımaktadır. Yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda K grubu ve S grubuna göre K+N ve S+N gruplarının kan basıncı değerlerinde artış saptanmış ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlılık taşıdığı tespit edilmiştir. Stres grubuna göre S+N grubundaki sıçanların kan basıncı değerindeki artış, K grubuna göre S+N grubundaki kan basıncı artışının sadece nesfatin-1 nedeniyle gerçekleştiğinin bir kanıtı olarak kabul edilmiştir. Günümüze kadar yapılmış olan çalışmalar kronik stres uygulamasının

sıçanlarda kan basıncı değerlerini değiştirmediğini göstermiş bulunmaktadırdır (Scheuer vd 2007, Scheuer 2010, Bechtold vd 2009). Bu bilgilerin yanı sıra nesfatin-1'in kan basıncı üzerine olan artırıcı etkisi yapılmış olan başka çalışmalar ile gösterilmiştir (Yosten ve Samson 2009, Garcıa-Galiano vd 2010^a, Yosten ve Samson 2010). Yosten ve arkadaşlarının 2009 yılında yapmış oldukları çalışmada, icv nesfatin-1 uygulamasının kan basıncını yükseltici etkisi bildirilmektedir (Yosten ve Samson 2009). Yine aynı grup tarafından 2010 yılında yapılmış olan başka bir çalışmanın sonuçlarına dayanarak, merkezi nesfatin-1 uygulamasının kan basıncını artırıcı etkisinin merkezi oksitosin-melanokortin yolakları aracılığı ile gerçekleşen sempatik sinir sistemi aktivasyonundan kaynaklanabileceği bildirilmektedir (Yosten ve Samson 2010). Yakın zamanlarda yapılmış olan bir başka çalışmada ise, intravenöz nesfatin-1 uygulamasının ortalama kan basıncı değerinde artışa neden olduğu rapor edilmektedir. Bu çalışmada nesfatin-1'in NO azalması aracılığı ile mezenterik arter gevşemesi üzerindeki baskılayıcı etkisi bulunmuştur. Bu sonuçlara dayanarak nesfatin-1'in hipertansif etkisinin hem merkezi sinirler hem de kan damarları üzerindeki etkinliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Buna ek olarak nesfatin-1 aracılı kan basıncı düzenlenmesinde kalp ve damarların kasılabilirliklerinin değişiminin söz konusu olduğu göz önünde bulundurulmaktadır (Yamawaki vd 2012). Bu bilgilere dayanarak; çalışmamızda elde etmiş olduğumuz veriler kronik periferik nesfatin-1 uygulamasının hem normal hem de kronik stres oluşturulmuş sıçanlarda kan basıncını artırıcı etkisini gösterir yöndedir ve literatür ile uyumludur diyebiliriz.

Yapmış olduğumuz çalışmada grupların kalp L-Tipi Ca^{+2} kanal $\alpha 1c$ alt birimi protein ekspresyon düzeyleri açısından tüm gruplar arasında yapılan çoklu karşılaştırmalarda istatistiksel açıdan anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda, K grubuna göre S ve K+N gruplarındaki sıçanların kalp L-tipi Ca^{+2} kanalı $\alpha 1c$ alt birimi proteininin ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış saptanmıştır. Elde edilen diğer bir veri ise K grubuna göre S+N grubunda kalp L-Tipi Ca^{+2} kanal $\alpha 1c$ alt birimi proteini ekspresyon düzeyindeki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu işaret etmektedir (şekil 4.1). Bugüne kadar yapılmış olan araştırmalarda kronik stres ve L-tipi Ca^{+2} kanalları arasındaki ilişki açıklanmaya çalışılmıştır. Bu alışmalar sonucunda, kronik stres ile beyinde ve kalpte L-tipi Ca^{+2} kanal aktivasyonunun ve ekspresyon düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (Mamczarz vd 1999, Xu vd 2003, Zhao vd 2007, Zhao vd 2009). Zhao ve arkadaşları yapmış oldukları

çalışmada kronik hareketsizlik stresinin ventrikül L-tipi Ca^{+2} kanal $\alpha 1c$ alt birimi proteininin ekspresyon düzeyi üzerine olan etkilerini *Western Blot* analizi ile tayin etmişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda elde edilen veriler, kronik hareketsizlik stresinin ventrikül L-tipi Ca^{+2} kanalı $\alpha 1c$ alt birimi proteininin ekspresyonunu arttırarak kalsiyum kanal akımında artışa neden olduğunu göstermektedir (Zhao vd 2009). Aynı zamanda nesfatin-1'in L-tipi Ca^{+2} kanalı üzerine olan etkisinin araştırıldığı çalışmalar literatürde yerini almış bulunmaktadır (Brailoiu vd 2007, Nakata ve Manaka 2011). Brailoiu ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, nesfatin-1 tarafından aktive edilen kanalların L, P ve Q kalsiyum kanalları olduğu ve buna bağlı olarak hipotalamus hücre kültüründe nesfatin-1'in intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonunu arttırdığı saptanmıştır (Brailoiu vd 2007). Yapılmış olan bir diğer çalışmada ise nesfatin-1'in pankreas adacık beta hücrelerinde L-tipi Ca^{+2} kanal aktivasyonu aracılığı ile insülin salgılanmasını arttırdığı gösterilmiştir (Nakata ve Manaka 2011). Biz bu bilgiler ışığında nesfatin-1'in kalp L-tipi Ca^{+2} kanalı $\alpha 1c$ alt birimi proteininin ekspresyonunu arttırabileceğini düşünerek çalışmamızın hipotezini kurgulamış bulunmaktayız. Çalışmamızda elde etmiş olduğumuz verilere göre tek başına stres ve tek başına nesfatin-1 uygulaması ile gerçekleşen kalp L-tipi Ca^{+2} kanalı $\alpha 1c$ alt biriminin ekspresyonundaki istatistiksel açıdan anlamlı olmayan artış, her iki etkinin birlikte uygulanması sonucunda kuvvetlenmiş ve istatistiksel açıdan anlamlılık kazanmıştır. Bu nedenle çalışmamızın sonuçları, çalışmamızı kurgularken oluşturduğumuz hipotezimizi destekler niteliktedir diyebilmekteyiz.

Plazma anjiyotensinojen parametresi açısından gruplar arasında yapılan çoklu karşılaştırmalarda, tüm gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark gözlenmiştir. Yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda, K grubuna göre S grubu plazma anjiyotensinojen seviyesinde istatistiksel açıdan anlamlı olmayan bir artış saptanmıştır. Stres grubuna göre ise K+N ve S+N gruplarında plazma anjiyotensinojen seviyelerindeki azalışın istatistiksel olarak anlamlılık taşıdığı tespit edilmiştir. Literatürde kronik hareketsizlik stresi ve/veya nesfatin-1'in plazma anjiyotensinojen seviyesi üzerine direkt etkisinin araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bugüne kadar yapılmış olan çalışmalar kronik stres uygulamasının HPA aksını aktive ettiğine dair bilgi vermektedir (Uresin vd 2004, Erbaş vd 2006, Guilliams ve Edwards 2010). Aynı zamanda HPA aksı ve sempatik sinir sistemi ile beraber RAAS'nin stres cevabında yer aldığını bilmekteyiz (Häfner vd 2012). Stres maruziyeti sonucunda

RAAS'nin aktivasyonu anjiyotensinojen plazma seviyesinde artışı gerektirmektedir. Bu nedenle çalışmamızda K grubuna göre S grubu plazma anjiyotensinojen seviyesindeki istatistiksel açıdan anlam taşımayan artış gözlenmesini beklenen bir sonuç olarak değerlendirmekteyiz. Uygulanan stres modelleri ve sürelerinin plazma anjiyotensinojen seviyesi artışına farklı oranlarda katkı sağlıyor olacağı kanısındayız. Bu nedenle de çalışmamızda gözlemlemiş olduğumuz bu artışın istatistiksel açıdan anlam taşıyıp taşımadığını, uyguladığımız stres modelinden kaynaklanıyor olabileceği düşüncesindeyiz. Kontrol grubuna göre K+N grubu plazma anjiyotensinojen seviyesindeki istatistiksel açıdan anlamlı olmayan bir azalışın gözlenmesi sonucunu ise nesfatin-1'in normal fizyolojik süreçlerde periferik etkinliğinin var olduğunun bir kanıtı olarak değerlendirilebilir kanısındayız. Stres grubuna göre S+N ve K+N gruplarındaki anjiyotensinojen plazma konsantrasyonlarındaki istatistiksel olarak anlamlı olan azalış ise nesfatin-1'in hipertansif etkisinin, anjiyotensinojen aracılı olarak gerçekleşmediğinin bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Aynı zamanda stres grubunda uzun vadede hipertansiyon gelişimi sürecinde etkin rol oynayacak olan plazma anjiyotensinojen konsantrasyon artışının nesfatin-1 uygulaması sonucunda istatistiksel açıdan anlamlı olarak azalması, nesfatin-1 aracılı henüz ayrıntıları tam olarak açıklanmamış olası bir negatif geri besleme mekanizmasının olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda plazma ACE2 düzeyleri için yapılan ikili karşılaştırmalarda; K grubuna göre K+N ve S+N gruplarında, yine S grubuna göre K+N ve S+N gruplarında plazma ACE2 seviyelerinin istatistiksel açıdan anlamlı olarak artışı gözlenmiştir. ACE2'nin substratı olan AngII plazma seviyelerinin karşılaştırılmasında ise K grubuna göre S ve S+N gruplarında plazma AngII seviyelerinin istatistiksel açıdan anlamlı olarak artışı saptanmıştır. İki binli yılların başında keşfi gerçekleştirilmiş olan ACE2; RAAS'nin negatif düzenleyicisi olarak bilinmekte ve beraberinde düzenleme mekanizması ayrıntıları ile açıklanmaya çalışılmaktadır (Sarkissian ve Matthew 2006). Literatürde yer alan sıçanlar ile yapılmış olan bir çalışmada, 16 haftalık kronik orta şiddetli egzersiz uygulaması sonucunda sıçanların beyin ACE2 protein miktarında artış saptanmıştır (Agarwal vd 2011). Literatür taramaları sonucunda kronik hareketsizlik stresi uygulamasının, plazma ACE2 seviyesine olan etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Biz çalışmamızda kronik hareketsizlik stres grubu sıçanların plazma ACE2 seviyesinde artış gözlemlemedik. Elde etmiş olduğumuz veri kronik stres modeli ve/veya süresi nedeniyle literatürden farklılık göstermektedir şeklinde

yorumlanabileceği gibi uygulamış olduğumuz stres modelinin plazma ACE2 seviyesine etkisinin olmadığı şeklinde de yorumlanabilir. Bu bağlamda K ve S gruplarına göre K+N ve S+N gruplarındaki plazma ACE2 seviyesindeki artışın nesfatin-1 uygulaması sonucunda gerçekleştiğini söyleyebiliriz. Elde etmiş olduğumuz bu veriler, nesfatin-1'in normal fizyolojik süreçlerde kan basıncının düzenlenmesinde rol oynadığının bir göstergesi olarak literatürde nesfatin-1'in homeostazisin düzenlenmesinde etkin olabileceğini açıklayan çalışmaları destekler niteliktedir. Aynı zamanda elde edilen veriler ile nesfatin-1'in kronik stres koşullarında ACE2 yolağını aktifleyerek RAAS'nin negatif kontrolünün sağlanmasında bir görevi olabileceğini göstermiş bulunmaktayız. Bunun yanı sıra yapmış olduğumuz literatür taramaları sonucunda, nesfatin-1'in RAAS elemanları ile ilişkilendirilmiş olduğu bir çalışma ile karşılaşılmamıştır. Fakat akut ve kronik stres uygulamalarının, renin aktivasyonu aracılığı ile RAAS'nin elemanlarının plazma konsantrasyonlarını arttırıcı etkisini gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (Cody 1997, Saavedra vd 2004, Zucker vd 2009, Groeschel ve Braam 2011). Bu nedenle çalışmamızda elde etmiş olduğumuz AngII açısından K grubuna göre S grubundaki istatistiksel açıdan anlamlı artış literatür ile uyumludur diyebilmekteyiz. Kontrol grubuna göre S+N grubunda plazma AngII seviyesindeki anlamlı artışa nesfatin-1'in etkisinin olup olmadığı ise elde edilen veriler ile tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Çünkü K grubuna göre K+N grubundaki sıçanlarda plazma AngII seviyesinde gözlenen artış istatistiksel olarak anlamlılık taşımamaktadır. Bu noktada K grubuna göre S grubundaki AngII artışının S+N grubunda azalmış olmasına dikkat edersek, nesfatin-1'in özellikle stres koşullarında plazma AngII seviyesinde azalışa neden olacak yönde etki göstermiş olabileceğini söyleyebiliriz. Çalışmamızda elde edilen ACE2 ve AngII verileri beraber değerlendirildiğinde ise nesfatin-1'in plazma ACE2 seviyesinde sağlamış olduğu artışın plazma AngII seviyesindeki azalışa neden olacağı beklenen bir sonuçtur ve çalışmamızda gösterilmiş bulunmaktadır.

Bu çalışmada plazma aldosteron ve kortizol düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda ise S ve S+N gruplarında K grubuna göre plazma aldosteron ve kortizol seviyelerinde istatistiksel olarak anlam taşımayan bir artış saptanmıştır. Strese maruziyet sonucu HPA aksının aktive olduğunu ve bu aktivasyonun glukokortikoid seviyesinde artışa neden olduğunu bilmekteyiz. Yapılan çalışmalar sonucunda kronik veya tekrarlayan stresin bazal kan basıncı ve glukokortikoidlerin artışı ile ilişkili olduğu gösterilmiş

bulunmaktadır (McEwen 2007, Bechtold vd 2009, Ulrich-Lai ve Herman 2009). Aynı zamanda yapılan çalışmalar sonucunda stres cevabının oluşmasında HPA aksı ve RAAS arasında sıkı bir bağlantı bulunduğu gösterilmiştir. Stres süresince sempatik aktivasyondaki artış renin üretimindeki artışa ve bu artışta plazma AngII seviyesinin yükselmesine neden olmaktadır. Stres süresince dolaşımdaki AngII artışı; ön hipofiz ACTH, adrenal glukokortikoid, aldosteron, katekolaminlerin oluşumu ve salınımına katkı sağlar (Häfner vd 2012). Çalışmamızda gözlemlemiş olduğumuz K grubuna göre S ve S+N gruplarında plazma aldosteron ve kortizol seviyelerinde artışın uygulamış olduğumuz stres modeli ve/veya süresi nedeni ile istatistiksel açıdan anlam taşımadığını düşünmekteyiz. Yapılan çalışmalar sonucunda sıçanlarda akut hareketsizlik stresinin veya tek başına merkezi nesfatin-1 uygulamasının, CRF, NE ve 5-HT nöronlarını aktive ettiği gösterilmiştir (Könczöl vd 2010, Yoshida ve Maejima 2010). Gerçekleşen aktivasyona bağlı olarak bu nöronların intrasellüler Ca^{+2} konsantrasyonundaki artış sonucunda plazma adrenokortikotropik hormon ve glukokortikoid seviyelerindeki yükseliş, Yoshida ve arkadaşlarının yakın yıllarda yapmış oldukları bir çalışma ile gösterilmiş bulunmaktadır. Aynı zamanda periferik nesfatin-1 uygulamasının ise stres cevabının oluşmasında etkin olmadığı yine bu çalışma ile ortaya konmuştur (Yoshida ve Maejima 2010). Yapmış olduğumuz çalışmada literatür ile uyumlu olarak kronik periferik nesfatin-1 uygulamasının, sıçanlarda plazma aldosteron ve kortizol seviyelerinde anlamlı bir değişiklik meydana getirmediğini gözlemlemiş bulunmaktayız. Bu bilgiler ışığında; periferik nesfatin-1 uygulaması sonucu kan basıncındaki yükselişin, aldosteron ve kortizol aracılığı ile gerçekleşmediğini söyleyebiliriz. Plazma aldosteron ve kortizol düzeylerindeki artışın sempatik sinir sistemi aktivasyonu sonucunda gerçekleştiğini göz önünde bulundurarak, plazma nesfatin-1 artışının kan basıncı yükselmesine yönelik göstermiş olduğu etkisinin, sempatik sinir sistemi aktivasyonundan bağımsız olarak gerçekleştiğini düşünmekteyiz.

Bu çalışmada tüm grupların plazma endotelin-1 düzeyi açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır. Literatürde yer alan çalışmalar sonucunda ET-1 üretiminin vazoaktif hormonlar, büyüme faktörü, hipoksi, kayma stresi, lipoproteinler, serbest radikaller, endotoksin gibi çeşitli birçok uyarıcı tarafından arttırıldığını, endotel kaynaklı NO, nitrovazodilatörler, natriüretik peptid, heparin ve prostaglandinler tarafından ise ET-1 üretiminin baskılandığını bilmekteyiz (Agapitov ve Haynes 2002). ET-1 üretiminin artışı birçok deneysel hipertansiyon modelinde de gösterilmiş

bulunmaktadır (Schiffrin 1998). Yine yapılmış olan çalışmalar sonucunda NO ve ET-1'in otokrin geri bildirim mekanizması ile birbirlerini kontrol ettikleri gösterilmiştir. Bunun yanı sıra yapılan çalışmalar ile hayvanlara uygulanan düşük doz endotelinin pozitif inotropik etkisi varken yüksek doz endotelinin negatif inotropik etkiye sahip olduğu gösterilmiş bulunmaktadır (Agapitov ve Haynes 2002, Stephen ve Stephen 2005). Fakat literatürde, nesfatin-1'in plazma endotelin-1 üzerine olan etkisinin araştırıldığı bir çalışma ile karşılaşılmamıştır. Elde etmiş olduğumuz veriler ve literatür bilgilerinin ışığında, uygulan stres ve nesfatin-1'in plazma endotelin-1 seviyesini etkilemediğini, aynı zamanda periferik nesfatin-1 uygulamasının hipertansif etkinliğinin endotelin-1 aracılı olarak gerçekleşmediğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda plazma eNOS düzeyi açısından ise tüm gruplar arasında anlamlı fark gözlenmiştir. Yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda ise K grubuna göre S grubunda plazma eNOS seviyesinin istatistiksel açıdan anlamlı olarak artışı, K ve S gruplarına göre S+N grubunda plazma eNOS seviyesinin istatistiksel açıdan anlamlı olarak azalışı saptanmıştır. Barbieri ve arkadaşlarının 2012 yılında yapmış oldukları bir çalışmada kronik strese maruz kalmış farelerde VEGF artışına bağlı olarak eNOS seviyesindeki artış bildirilmiştir (Barbieri vd 2012). Yakın zamanlarda yapılmış olan başka bir çalışmada ise intravenöz nesfatin-1 uygulamasının NO üretimini baskılayarak damar kasılmasını arttırdığı tespit edilmiştir (Yamawaki vd 2012). Plazma eNOS seviyesi açısından K grubuna göre S grubunda gözlenen artışın literatür ile uyumlu olduğunu ve kronik stres adaptasyonundan kaynaklandığını söyleyebiliriz. Kontrol ve stres gruplarına göre S+N grubundaki eNOS azalışı nesfatin-1 uygulamasının bir sonucunu oluşturmakta ve literatür ile uyumluluk göstermektedir. Elde edilen bu veriler doğrultusunda nesfatin-1'in eNOS baskılanması aracılığı ile gerçekleşen periferik vazokonstriktör bir etkisinin olduğunu söyleyebiliriz.

6. SONUÇ

Sonuç olarak araştırmamızda:

1. Stres, Kontrol+N ve S+N gruplarındaki sıçanların vücut ağırlıklarının ortalamaları kendi kontrollerine göre azalmıştır. Bu kilo kaybı; kronik stres ve nesfatin-1 uygulaması ile plazma nesfatin-1 seviyesindeki artışa bağlı olarak gerçekleşmiştir diyebilmekteyiz. Bu bağlamda plazma nesfatin-1 seviyesindeki artışın kilo kaybına neden olduğu literatür ile uyumlu olarak bir kez daha çalışmamızın sonuçları ile gösterilmiş bulunmaktadır.
2. Kontrol grubuna göre S, K+N, S+N gruplarındaki sıçanların plazma nesfatin-1 seviyelerinde dereceli bir artış gerçekleşmiş ve bu artış S+N grubunda istatistiksel bir anlamlılık kazanmıştır. Günümüze kadar yapılmış olan çalışmalarda kronik hareketsizlik stresinin plazma nesfatin-1 düzeyine olan etkisi gösterilmemiştir. Yapmış olduğumuz bu çalışmada gözlenen gruplar arasındaki plazma nesfatin-1 seviyesinde meydana gelen değişim, kronik hareketsizlik stresinin plazma nesfatin-1 seviyesini arttırıcı yönde etki gösterdiğine dair elde edilmiş bir sonuç olarak değerlendirilebilir.
3. Nesfatin-1 ve stres uygulaması sonrasında sadece K+N grubu sıçanların kan basıncı değerlerinde kendi kontrollerine göre gerçekleşen bir artış saptandı. Bu nedenle nesfatin-1'in kan basıncını arttırıcı etkisi çalışmamızda gösterilmiş bulunmaktadır diyebilmekteyiz. Yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda ise nesfatin-1 ve stres uygulaması sonrası, K grubuna göre K+N ve S+N gruplarının ve S grubuna göre ise yine K+N ve S+N gruplarının kan basıncı değerlerinde artış saptandı. Stres grubuna göre K+N ve S+N gruplarının her ikisinde birden kan basıncı değerlerinin artışını, kan basıncını arttıran faktörün nesfatin-1 uygulaması olduğu yönünde yorumlayabiliriz. Elde ettiğimiz verilere dayanarak nesfatin-1'in kronik periferik uygulamasının, hem normal hem de kronik stres oluşturulmuş sıçanlarda kan basıncını yükseltebileceğini söyleyebilmekteyiz.
4. Kalp L-tipi Ca^{+2} kanalı $\alpha 1c$ alt birimi proteininin ekspresyonu açısından K grubuna göre S ve K+N gruplarında bir artış saptanmış fakat bu artış K grubuna göre S+N grubunda istatistiksel açıdan anlamlılık kazanmıştır. Çalışmamızda elde edilmiş olan bu veri sayesinde, kronik periferik nesfatin-1 uygulamasının kalp L-tipi Ca^{+2} kanalı $\alpha 1c$ alt birimi proteininin ekspresyonunu arttırdığını göstermiş bulunmaktayız. Nesfatin-1'in kalp L-tipi Ca^{+2} kanalı $\alpha 1c$ alt birimi

proteininin ekspresyonunu arttırmasının, nesfatin-1'in kan basıncı üzerine olan yükseltici etkisinin nedenlerinden biri olduğunu düşünmekteyiz.

5. Kontrol+Nesfatin ve S+N gruplarındaki sıçanların plazma anjiyotensinojen seviyelerinde S grubu sıçanlarınkine göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalış saptanmıştır. Elde edilmiş olan bu veriler nesfatin-1'in hipertansif etkisinin, anjiyotensinojen aracılı olarak gerçekleşmediğinin bir göstergesi olarak kabul edilebilir.
6. Kontrol grubu sıçanlarınkine göre K+N ve S+N grubu sıçanların, S grubu sıçanlarınkine göre yine K+N ve S+N grubu sıçanların plazma ACE2 seviyelerindeki artışın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Sadece S grubu ile K grubu arasında plazma ACE2 seviyeleri açısından bir farklılık gözlenmemiştir. Bu verilere dayanarak uygulamış olduğumuz kronik hareketsizlik stresinin plazma ACE2 seviyesine bir etkisinin olmadığını söyleyebiliriz. Kontrol ve S gruplarına göre K+N ve S+N gruplarındaki plazma ACE2 seviyesindeki artışın nedeni nesfatin-1 uygulaması olabilir. Bu nedenle nesfatin-1'in kronik stres koşullarında ACE2 yolağını aktifleyerek RAAS'nin negatif kontrolünün sağlanmasında bir görevi olabileceğini düşünmekteyiz.
7. ACE2'nin substratı olan AngII plazma seviyelerinin karşılaştırılmasında ise K grubuna göre S ve S+N gruplarındaki plazma AngII seviyelerinin istatistiksel açıdan anlamlı olarak artışı saptanmıştır. Bu veri kronik hareketsizlik stresinin plazma AngII seviyesini artırıcı yönde etki gösterdiğini açıklamaktadır. Fakat kontrol grubuna göre S+N grubundaki plazma AngII seviyesindeki artışın nesfatin-1 uygulamasına bağlı olarak gerçekleşip gerçekleşmediği hakkında kesin bir yorum yapılamamaktadır. Çünkü K grubuna göre K+N grubundaki plazma AngII seviyesindeki artış anlamlılık taşımamaktadır. Stres grubuna göre S+N grubunda plazma AngII seviyesinde meydana gelen anlamlı olmayan azalış, kronik stres koşullarında artış gösteren plazma AngII seviyesinin kronik periferik nesfatin-1 uygulamasına bağlı olarak azaldığının bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Bu öngörümüzü göz önünde bulundurup madde 8 ile 9 beraber irdelenirse, özellikle kronik stres koşullarında hipertansiyon gelişiminde etkin rol oynayacak olan AngII artışına karşı kronik periferik nesfatin-1 uygulamasının, RAAS'inde ACE2 yolağını aktive ederek AngII'den Ang1-7 üretimini arttırması ve bunun bir sonucu olarak da vazodilatasyona neden olabileceğini düşünmekteyiz.

8. Yapmış olduğumuz çalışmada gruplar arasında plazma aldosteron ve kortizol seviyeleri karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Elde edilen veriler kronik periferik nesfatin-1 uygulamasının sıçanlarda plazma aldosteron ve kortizol seviyelerini etkilemediğini göstermektedir. Bu nedenle kronik periferik nesfatin-1 uygulamasının hipertansif etkisinin oluşmasında aldosteron ve kortizol parametrelerinin etkinliğinin söz konusu olmadığını düşünmekteyiz. Plazma aldosteron ve kortizol seviyelerinin AngII artışı ile uyumlu olarak artması gerekliliğini göz önünde bulundurursak, bu sonucun aynı zamanda madde 6 ve 7 için belirtilmiş olan sonuçlar ile uyumlu olduğunu söyleyebiliriz. Aynı zamanda elde edilen bu veriler, plazma nesfatin-1'in kan basıncı üzerine olan arttırıcı etkisinin sempatik sinir sistemi aktivasyonundan bağımsız bir şekilde gerçekleştiğinin bir göstergesi olarak kabul edilebilirler. Bu nedenle de kronik stres süresince kan basıncının düzenlenmesi için gerçekleşen adaptasyonlar, aynı süreçte plazma nesfatin-1 seviyesinin artışının da gerçekleşmesi nedeni ile koruyucu rollerini kaybediyor olabilirler.
9. Yapmış olduğumuz çalışmada plazma endotelin-1 seviyeleri açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır. Elde edilmiş olan bu veri uygulanan stres ve nesfatin-1'in plazma endotelin-1 seviyesini etkilemediğini, aynı zamanda periferik nesfatin-1 uygulamasının hipertansif etkinliğinin endotelin-1 aracılı olarak gerçekleşmediğinin bir göstergesi olarak kabul edilebilir.
10. Yapmış olduğumuz çalışmada K grubuna göre S grubunda plazma eNOS seviyesinin istatistiksel açıdan anlamlı olarak artışı, K ve S gruplarına göre S+N grubunda plazma eNOS seviyesinin istatistiksel açıdan anlamlı olarak azalışı saptanmıştır. Stres grubunda K grubuna göre gözlenen plazma eNOS seviyesindeki artışın, kronik stres adaptasyonunu gösteren bir sonuç olarak değerlendirmekteyiz. Kontrol ve stres gruplarına göre S+N grubundaki eNOS azalışı daha önceki çalışmalarda da gösterilmiş olduğu gibi periferik nesfatin-1 uygulamasının bir sonucudur. Elde edilen bu veriler doğrultusunda literatürü destekler nitelikte, periferik nesfatin-1 uygulamasının hipertansif etkinliğinin sebeplerinden birinin eNOS baskılanmasına bağlı olarak gerçekleşen periferik vazokonstriksiyon olduğunu söyleyebiliriz.

KAYNAKLAR

- Adams KF. Jr. (2004) Pathophysiologic role of the renin-angiotensin-aldosterone and sympathetic nervous systems in heart failure. *Am J Health Syst Pharm.*, May 1; 61 Suppl 2:S4-13.
- Agapitov A.V., Haynes W.G. (2002) Role of endothelin in cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.*, Mar; 3(1):1-15.
- Agarwal D., Welsch M.A., Keller J.N., Francis J. (2011) Chronic exercise modulates RAS components and improves balance between pro- and anti-inflammatory cytokines in the brain of SHR. *Basic Res Cardiol.*, Nov;106(6):1069-85.
- Agyemang C., Van Hooijdonk C., Wendel-Vos W., Ujcic-Voortman J.K. , Lindeman E., Stronks K., Droomers M. (2007) Ethnic differences in the effect of environmental stressors on blood pressure and hypertension in the Netherlands. *BMC Public Health*, Jun 23;7:118.
- Akçakoyun M. (2004) Koroner Arter Hastalığı Olgularında Koroner Risk Faktörleri ile Endotel Fonksiyonların Arasındaki İlişki. *Kardiyoloji Uzmanlık Tezi*, TC. Sağlık Bakanlığı Koşuyolu Kalp Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul.
- Arıcı M., Çağlar Ş. (2002) Hipertansiyon ve oluşturduğu sorunlar. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 33(1): 4–9.
- Ari M., Ozturk O.H. (2011) High plasma nesfatin-1 level in patients with major depressive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.*, Mar 30; 35(2): 497-500.
- Balligand J.L., Feron O., Dessy C. (2009) eNOS Activation by Physical Forces: From Short-Term Regulation of Contraction to Chronic Remodeling of Cardiovascular Tissues. *Physiol Rev.*, Apr;89(2):481-534.
- Barbieri A., Palma G., Rosati A., Giudice A., Falco A., Petrillo A., Petrillo M., Bimonte S., Di Benedetto M., Esposito G., Stiuso P., Abbruzzese A., Caraglia M., Arra C. (2012) Role of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in chronic stress-promoted tumour growth. *J Cell Mol Med.*, Apr;16(4):920-6.
- Bechtold A.G., Patel G., Hochhaus G., Scheuer D. A. (2009) Chronic blockade of hindbrain glucocorticoid receptors reduces blood pressure responses to novel stress and attenuates adaptation to repeated stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, May; 296: R1445–R1454.
- Behrendt D., Ganz P. (2002) Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol.*, Nov 21;90(10C):40L-48L.
- Bers D.M. (2002) Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature*, Jan 10;415(6868):198-205.

- Bhatia N., Maiti P. P., Choudhary A., Tuli A., Masih D., Khan M. M. U., Ara T., Jaggi A. S. (2011) Animal models in the study of stress: A review. *NSHM Journal of Pharmacy and Healthcare Management*, February; Vol. 02, pp. 42-50 42.
- Bodi I., Mikala G., Koch S.E., Akhter S.A., Schwartz A. (2005) The L- type calcium channel in the heart: the beat goes on. *J Clin Invest.*, Dec;115(12):3306-17.
- Bonnet M.S.,Pecchi E. (2009) Central nesfatin-1-expressing neurons are sensitive to peripheral inflammatory stimulus. *J Neuroinflammation*, Sep; 24,6:27.
- Brailoiu G. C., Dun S.L., Brailoiu E., Inan S., Yang J., Chang J.K., Dun N.J. (2007) Nesfatin-1: Distribution and Interaction with a G Protein-Coupled Receptor in the Rat Brain. *Endocrinology*, October; 148(10):5088–5094.
- Brosenitsch T.A., Salgado C.D., Kunze D.L., Katz D.M. (1998) A role for L-type calcium channels in developmental regulation of transmitter phenotype in primary sensory neurons. *Neurosci.*, Feb 1;18(3):1047-55.
- Burt V.L., Whelton P., Roccella E.J. (1995) Prevalence of hypertension in the US adult population. *Hypertension*, Mar;25(3):305-13
- Cannon W.B. (1935) Stresses and strains of homeostasis. *Am J MedSci.*, 189: 1-14.
- Cody R.J. (1997) The Sympathetic Nervous System and the Renin–Angiotensin–Aldosterone System in Cardiovascular Disease. *Am J Cardiol.*, Nov 13;80(9B):9J-14J.
- Coretti M.C., Anderson T.J., Benjamin E.J., Celermajer D., Charbonneau F., Creager M.A., Deanfield J., Drexler H., Gerhard-Herman M., Herrington D., Vallance P., Vita J., Vogel R. (2002) Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the international brachial artery reactivity task force. *J Am Coll Cardiol.*, Jan 16;39(2):257-65.
- Chrousos C.P., Gold P.S. (1992) The concepts of stress and stress system disorders: Overview of physical and behavioral homeostasis. *J Am Med Assoc.*, Mar 4; 267: 9:1244-52.
- Cowley M.A.,Grove K.L. (2006) To be or NUCB2, is nesfatin the answer? *Cell Metab.*, Dec; 4(6):421-2.
- Das D.K., Engelman R.M., Maulik N. (1999) Oxygen free radical signaling in ischemic preconditioning. In: Das DK (ed) *Heart in stres*. *Ann NY Acad Sci.*, Jun 30; 874:49–65.
- Davignon J., Ganz P. (2004) Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*, Jun 15;109: 27-32.
- Endres M., Laufs U., Huang Z., Nakamura T., Huang P., Moskowitz M.A., Liao J. K. (1998) Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase

- inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase (cerebral blood flow/cerebral ischemia). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Medical Sciences*, July; Vol. 95, pp. 8880–8885.
- Erbaş B, Uresin Y, Ozek M, Doğru-Abbasoğlu S. (2006), Effects of valsartan on stress-induced changes of serum vascular endothelial growth factor and nitric oxide in mice. *Int J Neurosci.*, May;116(5):601-11.
- Erken H.A., Erken G., Genç O. (2013) Blood Pressure Measurement in Freely Moving Rats by the Tail Cuff Method. *Clin Exp Hypertens.*, 35(1):11-5.
- García-Galiano D., Navarro V.M., Gaytan F., Tena-Sempere M. (2010^a) Expanding roles of NUCB2/nesfatin-1 in neuroendocrine regulation. *J Mol Endocrinol.*, Nov;45(5):281-90.
- García-Galiano D., Navarro V.M., Roa J., Ruiz-Pino F., Sánchez-Garrido M.A., Pineda R., Castellano J.M., Romero M., Aguilar E., Gaytán F., Diéguez C., Pinilla L., Tena-Sempere M. (2010^b) The anorexigenic neuropeptide, nesfatin-1, is indispensable for normal puberty onset in the female rat. *J Neurosci.*, Jun 9;30(23):7783-92.
- Genç O. (1997) Voltaj Bağımlı Kalsiyum Kanalları. *Genel Tıp Derg.*, 7(1): 43-6.
- Goebel M., Stengel A., Wang L., Taché Y. (2009) Restraint stress activates nesfatin-1-immunoreactive brain nuclei in rats. *Brain Res.*, Dec 1; 1300:114-124.
- Gonzalez R., Tiwari A., Unniappan S. (2009) Pancreatic beta cells colocalize insulin and nesfatin immunoreactivity in rodents. *Biochem Biophys Res Commun.*, Apr 17;381(4):643-8.
- Groeschel M., Braam B. (2011) Connecting chronic and recurrent stress to vascular dysfunction: no relaxed role for the renin-angiotensin system. *Am J Physiol Renal Physiol.*, Jan; 300(1):F1-10.
- Guilliams T.G., Edwards L. (2010) Chronic Stress and the HPA Axis: Clinical Assessment and Therapeutic Considerations. *Point Institute of Nutraceutical Research*, Vol:9 No:2.
- Gurley S. B., Allred A., Le T. H., Griffiths R., Mao L., Philip N., Haystead T.A., Donoghue M., Breitbart R.E., Acton S.L., Rockman H.A., Coffman T.M. (2006) Altered blood pressure responses and normal cardiac phenotype in ACE2-null mice. *J Clin Invest.* 2006 Aug;116(8):2218-25.
- Guyton A.C. and Hall J.E. (2006) Dolaşım Sistemi; Arter basıncının uzun süreli düzenlenmesi ve Hipertansiyonda böbreklerin baskın rolü. *Endokrin Sistemi; İnsülin, Glukagon ve Diyabetes Mellitus. Tıbbi Fizyoloji*, (Çeviri editörleri: Çavuşoğlu H, Çağlayan Yeğen B), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul; s220-223; s972-977.

- Häfner S., Baumert J., Emeny R.T., Lacruz M.E., Bidlingmaier M., Reincke M., Kuenzel H., Holle R., Rupprecht R., Ladwig K.H.; MONICA/KORA Study Investigators (2012) To live alone and to be depressed, an alarming combination for the renin-angiotensin-aldosterone-system (RAAS). *Psychoneuroendocrinology*, Feb;37(2):230-7.
- Han S., Chen X., Cox B., Yang C.L., Wu Y.M., Naes L., Westfall T. (1998) Role of neuropeptide Y in cold stress-induced hypertension. *Peptides*, 19(2):351-8.
- Harris R.B., Zhou J., Youngblood B.D., Rybkin I.I., Smagin G.N., Ryan D.H. (1998) Effect of repeated stress on body weight and body composition of rats fed low- and high-fat diets. *Am J Physiol.*, Dec; 275(6 Pt 2):R1928-38.
- Harris R.B., Palmondon J., Leshin S., Flatt W.P., Richard D. (2006) Chronic disruption of body weight but not of stress peptides or receptors in rats exposed to repeated restraint stress. *Horm Behav.*, May;49(5):615-25.
- Hayashi M., Takeda H., Takada K. (1998) Age-related decline in emotional adaptability to short-term stressful situation: The participation of the monoaminergic nervous systems in the cerebral limbic system. *Pathophysiology*, 5: 125-30.
- Hennebelle M., Balasse L., Latour A., Champeil-Potokar G., Denis S., Lavielle M., Gisquet-Verrier P., Denis I., Vancassel S. (2012) Influence of omega-3 Fatty Acid status on the way rats adapt to chronic restraint stress. *PLoS One.*, 7(7):e42142.
- Janssens S.P., Shimouchi A., Quertermous T. (1992) Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *J Biol Chem.*, 267:14519.
- Joannides R., Haefeli W.E., Linder L., Richard V., Bakkali E.H., Thuillez C., Lüscher TF. (1995) Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*, Mar 1;91(5):1314-9.
- Kearney P.M., Wheltona M., Reynolds K., Wheltona P.K., Hea J. (2004) Worldwide prevalence of hypertension: a systematic review. *Journal of Hypertension*, 22:11–19.
- Kearney P.M., Whelton M., Reynolds K., Muntner P., Whelton P.K., He J. (2005) Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet.*, Jan 15-21;365(9455):217-23.
- Kocatürk U. (1994) Açıklamalı Tıp Terimleri Sözlüğü. 6. basım. 730.
- Kocatürk P. A. (2000) Strese cevap. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, Cilt 53, Sayı 1,49-56.
- Könczöl K., Bodnár I., Zelena D., Pintér O., Papp R.S., Palkovits M., Nagy G.M., Tóth Z.E. (2010) Nesfatin-1/NUCB2 may participate in the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats. *Neurochem Int.*, 57:189-197.

- Liu J., Garza J.C., Truong H.V., Henschel J., Zhang W., and Lu X.Y. (2007) The melanocortineric pathway is rapidly recruited by emotional stress and contributes to stress-induced anorexia and anxiety-like behavior. *Endocrinology*, 148:5531-5540.
- Lowenstein C.J., Dinerman J.L., Snyder S.H. (1994) Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med.*, Feb 1;120(3):227-37.
- Mamczarz J., Budziszewska B., Antkiewicz-Michaluk L., Vetulani J. (1999) The Ca²⁺ channel blockade changes the behavioral and biochemical effects of immobilization stress. *Neuropsychopharmacology*, Mar;20(3):248-54.
- McEwen B.S., Seeman T. (1999) Protective and damaging effects of mediators of stress. Elaborating and testing the concepts of allostasis and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci.*, 896:30-47.
- McEwen Bruce S. (2000) The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Research*, 886: 172–189.
- McEwen Bruce S. (2007) Physiology and Neurobiology of Stress and Adaptation: Central Role of the Brain. *Physiol Rev.*, 87: 873–904.
- McEwen Bruce S., Gianaros Peter J. (2010) Central role of the brain in stress and adaptation: Links to socioeconomic status, health, and disease. *Ann N Y Acad Sci.*, February; 1186: 190–222.
- Merali Z., Cayer C. (2008) Nesfatin-1 increases anxiety- and fear-related behaviors in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*, Nov; 201(1):115-23.
- Murck H., Uhr M., Ziegenbein M., Künzel H., Held K., Antonijevic I.A., Schüssler P., Steiger A. (2006) Renin-angiotensin-aldosterone system, HPA-axis and sleep-EEG changes in unmedicated patients with depression after total sleep deprivation. *Pharmacopsychiatry*, Jan;39(1):23-9.
- Murck H., Schüssler P., Steiger A. (2012), Renin-angiotensin-aldosterone system: the forgotten stress hormone system: relationship to depression and sleep. *Pharmacopsychiatry*. May;45(3):83-95.
- Nakata M., Manaka K. (2011) Nesfatin-1 enhances glucose-induced insulin secretion by promoting Ca (2+) influx through L-type channels in mouse islet β -cells. *Endocr J.*, Feb 17.
- Oh-I, S., Shimizu H. (2006) Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature*, 12; 443(7112):709-12.
- Onat A., Şenocak M., Örnek E. (1991) Türk erişkinlerinde kalp hastalığı ve risk faktörleri taraması: 5. hipertansiyon ve sigara içimi. *Türk Kardiyol Derneği Arş*, 19:169-177.

- Oudit G. Y., Kassiri Z., Patel M. P. (2007) Angiotensin II mediated oxidative stress and inflammation mediate the age dependent cardiomyopathy in ACE2 null mice. *Cardiovascular Research.*, vol. 75, no. 1, pp. 29–39.
- Ozsavci D., Erşahin M. (2011), The novel function of nesfatin-1 as an anti-inflammatory and antiapoptotic peptide in subarachnoid hemorrhage-induced oxidative brain damage in rats. *Neurosurgery.*, Feb 16.
- Palasz A., Krzystanek M., Worthington J., Czajkowska B., Kostro K., Wiaderkiewicz R., Bajor G. (2012) Nesfatin-1, a unique regulatory neuropeptide of the brain. *Neuropeptides*, 46; 105–112.
- Pan W., Hsueh H., Kastin A.J. (2007) Nesfatin-1 crosses the blood-brain barrier without saturation. *Peptides*, Nov; 28(11):2223-8.
- Price T.O., Samson W.K., Niehoff M.L., Banks W.A. (2007) Permeability of the blood-brain barrier to a novel satiety molecule nesfatin-1. *Peptides*, Dec;28(12):2372-81.
- Ramanjaneya M., Chen J. (2010) Identification of nesfatin-1 in human and murine adipose tissue: a novel depot-specific adipokine with increased levels in obesity. *Endocrinology*, Jul;151(7):3169-80.
- Ross R. (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.*, Jan; 14,340(2):115-26.
- Rubbo H., Trostchansky A., Botti H., Batthyány C. (2002) Interactions of nitric oxide and peroxynitrite with low-density lipoprotein. *Biol Chem.*, Mar-Apr;383(3-4):547-52.
- Saavedra J.M., Ando H., Armando I., Baiardi G., Bregonzio C., Jezova M. and Zhou J. (2004) Brain Angiotensin II, an Important Stress Hormone: Regulatory Sites and Therapeutic Opportunities. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1018: 76–84.
- Sarkissian S.D., Matthew J. (2006) ACE2: A novel therapeutic target for cardiovascular diseases. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 91: 163–198.
- Selye H. (1946) The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *J Clin Med.*, 6:117-230.
- Scheuer D.A., Bechtold A.G., Vernon K.A. (2007) Chronic activation of dorsal hindbrain corticosteroid receptors augments the arterial pressure response to acute stress. *Hypertension*, Jan;49(1):127-33.
- Scheuer D. A. (2010) Regulation of the stress response in rats by central actions of glucocorticoids. *Exp Physiol.*, Jan; 95(1):26-31.
- Schiffrin E.L. (1998) Endothelin and endothelin antagonists in hypertension. *J Hypertens.*, Dec;16(12 Pt 2):1891-5.

- Schultz D., Mikala G., Yatani A. (1993) Cloning, chromosomal localization, and functional expression of the α_1 subunit of the L-type voltage-dependent calcium channel from normal human heart. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 90:6228–6232.
- Schwartz A.R., Gerin W., Davidson K.W., Picking T.G., Brosschot J.F., Thayer J.F., Christenfeld N., Linden W. (2003) Toward a causal model of cardiovascular responses to stress and the development of cardiovascular disease. *Psychosom Med.*, 65:22–35.
- Shimizu H., Oh-I S. (2009) Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: the leptin-independent mechanism. *Endocrinology*, Feb;150(2):662-71.
- Spieker L.E., Noll G., Lüscher T.F. (2001) Therapeutic potential for endothelin receptor antagonists in cardiovascular disorders. *Am J Cardiovasc Drugs*, 1(4):293-303.
- Stengel A., Goebel M., Wang L., Rivier J., Kobelt P., Mönnikes H., Lambrecht N.W., and Taché Y. (2009) Central nesfatin-1 reduces darkphase food intake and gastric emptying in rats: differential role of corticotropin-releasing factor2 receptor. *Endocrinology*, 150: 4911- 4919.
- Stengel A. (2009) Identification and characterization of nesfatin-1 immunoreactivity in endocrine cell types of the rat gastric oxyntic mucosa. *Endocrinology*, Jan; 150(1):232-8.
- Stengel A., Taché Y. (2010) Nesfatin-1 role as possible new potent regulator of food intake. *Regul Pept.*, 9;163(1-3):18-23.
- Stephen W., Stephen M. B. (2005) Endothelin-1 decreases endothelial NOS expression and activity through ETA receptor-mediated generation of hydrogen peroxide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, 288: L480–L487.
- Su Y.,Zhang J. (2010) The novel function of nesfatin-1: anti-hyperglycemia. *Biochem Biophys Res Commun.*, Jan; 1,391(1):1039-42.
- Sun Z.J., Zhang Z.E. (2005)Historic perspectives and recent advances in major animal models of hypertension. *Acta Pharmacol Sin.*,26:295-301.
- Tanida M.,Mori M. (2011) Nesfatin-1 stimulates renal sympathetic nerve activity in rats. *Neuroreport.*, Apr; 20,22(6):309-12.
- Thomas M. C., Pickering R. J., Tsorotes D. (2010) Genetic Ace2 deficiency accentuates vascular inflammation and atherosclerosis in the ApoE knockout Mouse. *Circulation Research.*, vol. 107, no. 7, pp. 888–897.
- Tikellis C., Thomas MC. (2012) Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) Is a Key Modulator of the Renin Angiotensin System in Health and Disease. *Int J Pept.* 2012; 2012:256294.

- Tripodiadis F., Karayannis G., Giamouzis G., Skoularigis J, Louridas G., Butler J. (2009) The Sympathetic Nervous System in Heart Failure Physiology, Pathophysiology, and Clinical Implications. *J Am Coll Cardiol.*, 54:1747–62.
- Ulrich-Lai Yvonne M., Herman James P. (2009) Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature Reviews/ Neuroscience.*, June Vol 10.
- Uresin Y., Erbas B., Ozek M., Ozkök E., Gürol AO. (2004) Losartan may prevent the elevation of plasma glucose, corticosterone and catecholamine levels induced by chronic stress. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.*, Jun;5(2):93-6.
- Vanelzakker M., Fevurly R.D., Breindel T., Spencer R.L. (2008) Environmental novelty is associated with a selective increase in Fos expression in the output elements of the hippocampal formation and the perirhinal cortex. *Learn Mem.*, 15 (12): 899–908.
- Vollhardt L.T. (1991) Psychoneuroimmunology; A literature review: *Am J Orthopsychiatric*, 61:1: 35-47.
- Volpe M., Cosentino F., Tocci G., Palano F., Paneni F. (2011) Antihypertensive therapy in diabetes: the legacy effect and RAAS blockade. *Curr Hypertens Rep.*, Aug;13(4):318-24.
- Vyas A., Mitra R., Rao S. B. S., Chattarji S. (2002) Chronic Stress Induces Contrasting Patterns of Dendritic Remodeling in Hippocampal and Amygdaloid Neurons. *The Journal of Neuroscience*. August; 1, 22(15):6810–6818.
- Xu J., Ma Q., Duan H.F., Qian L.J. (2003) Effects of stress on L-type calcium channels of rat ventricular myocytes. *Chin J Applied Physiol.*, 19: 216–219.
- Xu L., Bloem B., Gaszner B., Roubos E. W., Kozicz T. (2010) Stress-Related Changes in the Activity of Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript and Nesfatin Neurons in the Midbrain Non- Preganglionic Edinger- Westphal Nucleus in the Rat. *Neuroscience*, 170: 478–488.
- Yamada M., Horiguchi K., Umezawa R., Hashimoto K., Satoh T., Ozawa A., Shibusawa N., Monden T., Okada S., Shimizu H. and Mori M. (2010) Troglitazone, a Ligand of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α , Stabilizes NUCB2 (Nesfatin) mRNA by Activating the ERK1/2 Pathway: Isolation and Characterization of the Human NUCB2 Gene. *Endocrinology*, 151: 2494–2503.
- Yamawaki H., Takahashi M., Mukohda M., Morita T., Okada M., Hara Y. (2012) A novel adipocytokine, nesfatin-1 modulates peripheral arterial contractility and blood pressure in rats. *Biochem Biophys Res Commun.*, Feb 24;418(4):676-81.
- Yoshida N., Maejima Y. (2010) Stressor-responsive central nesfatin-1 activates corticotropin-releasing hormone, noradrenaline and serotonin neurons and evokes hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Aging (Albany NY)*, Nov;2(11):775-84.

- Yosten G.L., Samson W.K. (2009) Nesfatin-1 exerts cardiovascular actions in brain: possible interaction with the central melanocortin system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, Aug; 297(2):R330-6.
- Yosten G.L., Samson W.K. (2010) The anorexigenic and hypertensive effects of nesfatin-1 are reversed by pretreatment with an oxytocin receptor antagonist. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 298(6):R1642-7.
- Zhao Y., Wang W.Y., Qian L.J. (2007) Hsp70 may protect cardiomyocytes from stress - induced injury by inhibiting Fas-mediated apoptosis. *Cell Stress Chaperones*, 12:83–95.
- Zhao Y., Xu J., Gong Ji., Qian L. (2009) L-type calcium channel current up-regulation by chronic stress is associated with increased α_1c subunit expression in rat ventricular myocytes. *Cell Stress and Chaperones*, 14: 33–41.
- Zucker I.H., Schultz H.D., Patel K. P., Wang W. and Gao L. (2009) Regulation of central angiotensin type 1 receptors and sympathetic outflow in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 297: H1557–H1566.

ÖZGEÇMİŞ

15 Aralık 1980 yılında İzmir Alsancak'ta dünyaya geldim. İlkokul eğitimime Denizli'de başlayarak İzmir'in Torbalı ilçesinde tamamladım. Daha sonra Torbalı'da başlamış olduğum ortaokul eğitimime Denizli'de devam ettim ve lise eğitimimi de Denizli'de tamamladım. 1998 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimime başladım ve 2003 yılında lisans eğitimimi tamamladım. Aynı yıl Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım ve 2006 yılının Aralık ayında yüksek lisans eğitimimi tamamladım. Yüksek lisans eğitimim sırasında 2005 yılında bir sene süresince Macaristan'ın *Szeged* ilinde bulunan *Biological Research Center* tarafından düzenlenen *International Training Course* programına katıldım ve eğitimimi 2006 yılında tamamladım. Aynı yıl Avrupa Birliği'nin vermiş olduğu *Marie Curie* bursunu alarak *Szeged* Üniversitesi Fen Fakültesi Bitki Biyolojisi alanında doktora programına başladım ve *Biological Research Center*'da çalışmalarına devam ettim. Buradaki eğitimime bir buçuk sene devam ettikten sonra 2008 yılının Şubat ayında Belçika Hükümeti tarafından verilen FWO (*Flanders-Walloon Organization-Research Foundation Flanders*) bursunu alarak *Gent* Üniversitesi Biyoteknoloji alanında doktora programına başladım ve Belçika'nın *Gent* ilinde bulunan *Plant Systems Biology* adlı araştırma enstitüsünde çalışmalarına dokuz ay boyunca devam ettim. Daha sonra ülkeme geri döndüm, bir sene boyunca sınavlara girdim ve çalışma imkânı aradım. Son olarak 2009 yılında Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı'nda üçüncü doktora eğitimime başladım. Halen, 14 Şubat 2012 yılında Dumlupınar Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda Öğretim Görevlisi olarak başlamış olduğum görevime devam etmekteyim.

