

OPIOİD VE KARDİYOAKTİF PEPTİTLERİN *RANA RİDİBUNDA* (PALLAS, 1771)'NİN SİNİR SİSTEMİ İLE *CALLİNECTES SAPİDUS* (RATHBUN, 1896)'un SİNİR SİSTEMİ VE BAĞIRSAK DOKUSUNDA İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK BELİRLENMESİ

YUSUF ÇAMLICA

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ
ANA BİLİM DALI**

DOKTORA TEZİ

**MERSİN
TEMMUZ-2007**

**OPIOİD VE KARDİYOAKTİF PEPTİTLERİN *RANA RIDİBUNDA*
(PALLAS, 1771)'NİN SİNİR SİSTEMİ İLE *CALLINECTES SAPİDUS*
(RATHBUN, 1896)'UN SİNİR SİSTEMİ VE BAĞIRSAK
DOKUSUNDA İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK
BELİRLENMESİ**

YUSUF ÇAMLICA

**Mersin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Biyoloji
Ana Bilim Dalı**

DOKTORA TEZİ

**Tez Danışmanı
Yrd.Doç.Dr. Ali AŞKIN**

**MERSİN
TEMMUZ-2007**

Bu tezin gerek bilimsel içerik, gerekse elde edilen sonuçlar açısından tüm gerekleri sağladığı kanaatine ulaşan ve aşağıda imzaları bulunan biz jüri üyeleri, sunulan tezi oy birliği ile Doktora Tezi olarak kabul ediyoruz.

Tez Danışmanı
Yrd.Doç.Dr. Ali AŞKIN

Jüri Üyesi
Prof.Dr. Mehmet BAŞHAN

Jüri Üyesi
Prof.Dr. Tülin BAYKAL

Jüri Üyesi
Prof.Dr. Serap ERGENE

Jüri Üyesi
Doç.Dr. Yasemin KAÇAR

Bu tezin Fen Bilimleri Enstitüsü yazım kurallarına uygun olarak yazıldığı Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../.....tarih ve/..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr.Mahir TURHAN
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

ÖZ

Bu çalışmada, lös-enk ve FMRF-amid'in, Mersin Müftü (Efrenk) Deresi'nden yakalanan *Rana ridibunda*'nın beyin, omurilik ve siyatik sinir dokularındaki, Mersin Göksu Deltası'ndan yakalanan *Callinectes sapidus*'un ise beyin, göz sapı, torakal gangliyon ve barsak dokularındaki lokalizasyonları araştırılmıştır. Bu iki peptitin immüno pozitifliği, peptitler, eşeyler, dokular, kesitler ve her iki canlı grubunun benzer dokuları arasında karşılaştırılmıştır.

Lös-enk ile FMRF-amid'in, her iki türün dokularında yüksek düzeyde lokalize olduğu bulunmuştur. FMRF-amid, kurbağa beyin, omurilik ve siyatik sinir dokularında lös-enk'e göre daha fazla immüno reaktivite oluşturmuştur. Lös-enk, dişi kurbağa arka beyin dokusunda erkeklere göre daha fazla immüno pozitiflik gösterirken, erkek bireylerin siyatik sinirinde daha yüksek düzeyde immüno reaktivite meydana getirmiştir. Lös-enk, diğer bir hayvan grubu olan yengeç beyin ve torakal gangliyon dokularında FMRF-amid'e göre daha yüksek düzeyde immüno pozitiflik oluşturmuştur. Buna karşılık FMRF-amid'e oranla barsak dokuda daha az immüno reaktivite meydana getirmiştir. Cinsiyete bağlı olarak lös-enk'in immüno pozitifliği dişi yengeçlerin barsak dokusunda daha fazla bulunmuştur. Göz sapı kesitlerinde ise, her iki peptit, optik sinirde lamina ganglionaris'e göre daha yüksek oranda immüno reaktivite göstermiştir. FMRF-amid kurbağa beyin dokusunda yengeçlere göre daha fazla immüno pozitiflik oluştururken, lös-enk bakımından her iki hayvan grubunun beyin dokusunda, önemli bir farklılık gözlenmemiştir. Bununla beraber, lös-enk dişi yengeçlerin torakal gangliyon dokusunda, dişi kurbağaların omurilik dokusuna göre daha fazla immüno reaktivite meydana getirmiştir. Erkek bireylerde ise, bu immüno pozitiflik anlamlı olmamıştır. Aynı şekilde, FMRF-amid tarafından meydana getirilen immüno reaktivite de anlamlı olmamıştır.

Anahtar kelimeler: *Rana ridibunda*, *Callinectes sapidus*, immünohistokimya, sinir dokusu, bağırsak dokusu, Lös-enk, FMRF-amid.

ABSTRACT

In this study, leu-enk and FMRF-amide localizations were investigated in brain, spinal cord and sciatic nerve tissues of *Rana ridibunda* caught from Mersin Müftü (Efrenk) river and in the brain, eyestalk, thoracal ganglion and intestine tissues of *Callinectes sapidus* caught from Mersin Göksu delta respectively. Immunopositivity of these two peptides were compared between the peptides, sexes, tissues, sections and similar tissues of both animals.

The results revealed that leu-enk and FMRF-amide produced high degree of localization in in both species tissues. Compared with leu-enk, FMRF-amide created more immunoreactivity in the frog brain, spinal cord and sciatic nerve tissues. While leu-enk showed more immunoreactivity in the hind brain tissue of female frog than that of male, it showed more immunopositivity in the sciatic nerve of male individuals than that of female. While leu-enk created higher degree of immunoreactivity in the crab brain and thoracal ganglion tissues compared with the effect of FMRF, leu-enk created less immunoreactivity in the crab intestine tissue. Depending on the sexes, leu-enk caused more immunopositivity in the female crab intestine tissue than that of male. Observation on the sections of eyestalk revealed that both peptides produced higher degree of immunoreactivity in optic nerve compared with lamina ganglionaris. FMRF-amide caused more immunopositivity in the frog brain tissue than that of crab, however leu-enk showed no significant difference in immunoreactivity between the two animal groups. However, leu-enk produced more immunopositivity in the female thoracal ganglion tissue than female frog spinal cord tissue. In contrast, immunopositivity showed no significant difference in males. Similarly, immunoreactivity caused by FMRF-amid was not significant either.

Key words: *Rana ridibunda*, *Callinectes sapidus*, immunohistochemistry, nerve tissue, intestine tissue, Leu-enk, FMRF-amide.

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu çalışma süresince bilgi, görüş ve önerilerinden yararlandığım tez danışmanım sayın **Yrd.Doç.Dr. Ali AŞKIN**'a, tez izleme komitesi üyeleri sayın **Prof.Dr. Tülin BAYKAL**'a, sayın **Doç.Dr. Yasemin KAÇAR**'a, mevcut olanaklardan yararlanabilmem için kolaylık sağlayan Biyoloji Bölümü başkanı sayın **Prof.Dr. Serap ERGENE**'ye, tez çalışmalarımın yürütülmesinde yardım ve katkılarını esirgemeyen sayın **Doç.Dr. Nejat YILMAZ**'a, sayın **Arş.Gör.Dr. Savaş AKTAŞ**'a, tez çalışmasının istatistiksel değerlendirmeler kısmında yardımlarını gördüğüm sayın **Yrd.Doç.Dr. Bahar TAŞDELEN**'e, sayın **Arş.Gör. Mehmet Ali SUNGUR**'a, tez çalışması süresince manevi destekleri ile daima yanımda olan eşim **Cemile ÇAMLICA**'ya ve oğlum **Kerem Deniz ÇAMLICA**'ya en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZ	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. ENDOJEN OPIOİD PEPTİDLERİN GRUPLANDIRILMASI.....	4
2.1.1. Enkefalinergic Sistem (Pro-Enkefalin A Sistemi).....	4
2.1.2. Endorfinergic Sistem (Pro-opiomelanokortin Sistemi - POMC)....	4
2.1.3. Dinorfin Sistemi (Pro-Enkefalin B Sistemi).....	4
2.2. OPIOİD PEPTİDLERİN SİNİR SİSTEMİNDE DAĞILIŞLARI.....	5
2.3. MERKEZİ SİNİR SİSTEMİNDEKİ OPIOİD RESEPTÖRLERİ.....	6
2.3.1. Delta (δ - OP ₁) Reseptörleri	6
2.3.2. Kappa (κ - OP ₂) Reseptörleri.....	6
2.3.3. Mü (μ - OP ₃) Reseptörleri	6
2.4. <i>R. RIDİBUNDA</i> HAKKINDA GENEL BİLGİ.....	7
2.4.1. Morfolojik Karakterler.....	7
2.4.2. Ekolojik Ve Biyolojik Özellikler.....	8
2.4.3. Coğrafi Dağılışı Ve Ülkemizde Bulunduğu Yerler.....	8
2.5. <i>C. SAPİDUS</i> HAKKINDA GENEL BİLGİ.....	11
2.5.1. Morfolojik Karakterler.....	13
2.5.2. Ekolojik Ve Biyolojik Özellikler.....	13
2.5.3. Coğrafi Dağılışı Ve Ülkemizde Bulunduğu Yerler.....	14
2.6. OMURGALILARDA PEPTİTLERLE YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	14

2.7. OMURGASIZLARDA PEPTİTLERLE YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	20
3. MATERYAL VE METOT.....	27
3.1. DENEY HAYVANLARI.....	28
3.1.1. Deney Hayvanlarının Yakalanması.....	28
3.1.2. Kurbağa Dokularının Alınması	28
3.1.2.1. Kurbağa dokularının histolojik takibi	29
3.1.3. Yengeç Dokularının Alınması.....	29
3.1.3.1. Yengeç dokularının histolojik takibi.....	29
3.2. DENEYLERİN YAPILIŞI.....	30
3.2.1. Dokulardan Kesit Alınması.....	30
3.2.2. Morfolojik Çalışma.....	31
3.2.3. Primer Antikor Derişiminin Belirlenmesi.....	31
3.2.4. Sekonder Antikor Derişiminin Belirlenmesi.....	31
3.2.5. İmmünohistokimyasal Uygulama.....	33
3.2.6. Negatif Kontrol.....	33
3.3. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRMELER.....	33
4. BULGULAR ve TARTIŞMASI.....	34
4.1. KURBAĞA VE YENGEÇ DOKULARINDAKİ LÖS-ENK İLE FMRF-AMİD'İN LOKALİZASYONLARI.....	34
4.1.1. <i>R. ridibunda</i> Beyin Dokusu Sagital Kesitte Lös-Enk ve FMRF-amid'in Lokalizasyonları.....	35
4.1.2. <i>R. ridibunda</i> Beyin Dokusu Enine Kesitte Lös-Enk ve FMRF-amid'in Lokalizasyonları.....	40
4.1.3. <i>R. ridibunda</i> Omurilik Boyuna Kesitte Lös-Enk ve FMRF-amid'in Lokalizasyonları.....	45
4.1.4. <i>R. ridibunda</i> Omurilik Enine Kesitte Lös-Enk ve FMRF-amid'in Lokalizasyonları.....	50
4.1.5. <i>R. ridibunda</i> Siyatik Sinirinde Lös-Enk ve FMRF-amid'in Lokalizasyonları.....	56

4.1.6. <i>C. sapidus</i> Beyin Dokusunda Lös-Enk ve FMRF-amid'in Lokalizasyonları.....	63
4.1.7. <i>C. sapidus</i> Göz Sapı Dokusunda Lös-Enk ve FMRF-amid'in Lokalizasyonları.....	68
4.1.8. <i>C. sapidus</i> Torakal Gangliyon Dokusunda Lös-Enk ve FMRF-amid'in Lokalizasyonları.....	74
4.1.9. <i>C. sapidus</i> Barsak Dokusunda Lös-Enk ve FMRF-amid'in Lokalizasyonları.....	79
4.1.10. <i>R. ridibunda</i> ve <i>C. sapidus</i> Beyin Dokusunda Lös-Enk ile FMRF-amid'in Lokalizasyonları.....	86
4.1.11. <i>R. ridibunda</i> Omurilik ve <i>C. sapidus</i> Torakal Gangliyon Dokusunda Lös-Enk ile FMRF-amid'in Lokalizasyonları.....	89
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	93
KAYNAKLAR.....	95
ÖZGEÇMİŞ.....	106

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE	Sayfa
Çizelge 2.1. Omurgalılarda enkefalin ve FMRF-amid ile yapılan çalışmalar.....	25
Çizelge 2.2. Omurgasızlarda enkefalin ve FMRF-amid ile yapılan çalışmalar.....	26
Çizelge 4.1. <i>R. ridibunda</i> beyin dokusu boyuna kesitinde % immünopozitif değerleri.....	36
Çizelge 4.2. <i>R. ridibunda</i> arka beyin dokusu enine kesitinde % immünopozitif değerleri.....	40
Çizelge 4.3. <i>R. ridibunda</i> omuriliği boyuna kesitinde % immünopozitif değerleri.....	46
Çizelge 4.4. <i>R. ridibunda</i> omuriliği torakal bölge enine kesitinde % immünopozitif değerleri.....	51
Çizelge 4.5. <i>R. ridibunda</i> siyatik sinirinde % immünopozitif değerleri.....	56
Çizelge 4.6. <i>C. sapidus</i> beyin dokusunda % immünopozitif değerleri.....	64
Çizelge 4.7. <i>C. sapidus</i> göz sapı boyuna kesitinde % immünopozitif değerleri.....	69
Çizelge 4.8. <i>C. sapidus</i> torakal gangliyonunda % immünopozitif değerleri.....	74
Çizelge 4.9. <i>C. sapidus</i> barsak dokusunda % immünopozitif değerleri.....	79
Çizelge 4.10. <i>R. ridibunda</i> ile <i>C. sapidus</i> beyin dokularında % immünopozitif değerleri.....	86
Çizelge 4.11. <i>R. ridibunda</i> omurilik dokusu ile <i>C. sapidus</i> torakal gangliyon dokusunda % immünopozitif değerleri.....	90

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL	Sayfa
Şekil 2.1. <i>R. ridibunda</i> 'nın genel görünüşü.....	8
Şekil 2.2. <i>Rana</i> cinsi kurbağaların sinir sistemi.....	9
Şekil 2.3. <i>R. ridibunda</i> 'nın merkezi sinir sistemi.....	10
Şekil 2.4. <i>C. sapidus</i> 'un genel görünüşü.....	11
Şekil 2.5. <i>C. sapidus</i> 'un sinir sistemi.....	12
Şekil 4.1. Lös-enk ve FMRF-amid'in <i>R. ridibunda</i> beyin dokusu sagittal kesitindeki lokalizasyonları.....	38
Şekil 4.2. Lös-enk ve FMRF-amid'in <i>R. ridibunda</i> beyin dokusu sagittal kesitindeki şematik lokalizasyonları	38
Şekil 4.3. Lös-enk'in <i>R. ridibunda</i> beyin dokusu sagittal kesitindeki immünopozitifliği	39
Şekil 4.4. Lös-enk ve FMRF-amid'in <i>R. ridibunda</i> arka beyin dokusu enine kesitindeki lokalizasyonları.....	41
Şekil 4.5. Lös-enk ve FMRF-amid'in <i>R. ridibunda</i> arka beyin dokusu enine kesitindeki şematik lokalizasyonları	42
Şekil 4.6. FMRF-amid'in <i>R. ridibunda</i> arka beyin dokusu enine kesitindeki immünopozitifliği.....	43
Şekil 4.7. <i>R. ridibunda</i> arka beyin dokusu enine kesitinde negatif kontrol.....	44
Şekil 4.8. Lös-enk ve FMRF-amid'in <i>R. ridibunda</i> omuriliği boyuna kesitindeki lokalizasyonları.....	47
Şekil 4.9. Lös-enk ve FMRF-amid'in <i>R. ridibunda</i> omuriliği boyuna kesitindeki şematik lokalizasyonları	47
Şekil 4.10. Lös-enk'in <i>R. ridibunda</i> omuriliği boyuna kesitindeki immünopozitifliği	49
Şekil 4.11. Lös-enk ve FMRF-amid'in <i>R. ridibunda</i> omuriliği torakal bölge enine kesitindeki lokalizasyonları.....	52

Şekil 4.12. Lös-enk ve FMRF-amid'in <i>R. ridibunda</i> omuriliği torakal bölge enine kesitindeki şematik lokalizasyonları	53
Şekil 4.13. FMRF-amid'in <i>R. ridibunda</i> omuriliği torakal bölge enine kesitindeki immünopozitifliği	54
Şekil 4.14. <i>R. ridibunda</i> omuriliği torakal bölge enine kesitinde negatif kontrol....	55
Şekil 4.15. Lös-enk ve FMRF-amid'in <i>R. ridibunda</i> siyatik sinir dokusundaki lokalizasyonları.....	58
Şekil 4.16. Lös-enk ve FMRF-amid'in <i>R. ridibunda</i> siyatik sinir dokusu boyuna kesitindeki şematik lokalizasyonları	59
Şekil 4.17. Lös-enk ve FMRF-amid'in <i>R. ridibunda</i> siyatik sinir dokusu enine kesitindeki şematik lokalizasyonları	59
Şekil 4.18. Lös-enk'in <i>R. ridibunda</i> siyatik sinir dokusu boyuna kesitindeki immünopozitifliği	60
Şekil 4.19. FMRF-amid'in <i>R. ridibunda</i> siyatik sinir dokusu enine kesitindeki immünopozitifliği.....	61
Şekil 4.20. <i>R. ridibunda</i> siyatik sinir dokusu enine kesitinde negatif kontrol.....	62
Şekil 4.21. Lös-enk ve FMRF-amid'in <i>C. sapidus</i> beyin dokusu boyuna kesitindeki lokalizasyonları.....	65
Şekil 4.22. Lös-enk ve FMRF-amid'in <i>C. sapidus</i> beyin dokusundaki şematik lokalizasyonları	65
Şekil 4.23. Lös-enk'in <i>C. sapidus</i> beyin dokusu boyuna kesitindeki immünopozitifliği	66
Şekil 4.24. <i>C. sapidus</i> beyin dokusu boyuna kesitinde negatif kontrol	67
Şekil 4.25. Lös-enk ve FMRF-amid'in <i>C. sapidus</i> göz sapı dokusu boyuna kesitindeki lokalizasyonları.....	70
Şekil 4.26. Lös-enk ve FMRF-amid'in <i>C. sapidus</i> göz sapı dokusu boyuna kesitindeki şematik lokalizasyonları	71
Şekil 4.27. FMRF-amid'in <i>C. sapidus</i> göz sapı dokusu boyuna kesitindeki immünopozitifliği	72
Şekil 4.28. <i>C. sapidus</i> göz sapı boyuna kesitinde negatif kontrol.....	73

Şekil 4.29. Lös-enk ve FMRF-amid'in <i>C. sapidus</i> torakal gangliyon dokusu radyal kesitindeki lokalizasyonları	75
Şekil 4.30. Lös-enk ve FMRF-amid'in <i>C. sapidus</i> torakal gangliyon dokusu radyal kesitindeki şematik lokalizasyonları	76
Şekil 4.31. Lös-enk'in <i>C. sapidus</i> torakal gangliyon dokusu radyal kesitindeki immünopozitifliği	77
Şekil 4.32. <i>C. sapidus</i> torakal gangliyon radyal kesitinde negatif kontrol.....	78
Şekil 4.33. Lös-enk ve FMRF-amid'in <i>C. sapidus</i> bağırsak dokusundaki lokalizasyonları.....	81
Şekil 4.34. Lös-enk ve FMRF-amid'in <i>C. sapidus</i> bağırsak doku boyuna kesitindeki şematik lokalizasyonları	82
Şekil 4.35. Lös-enk ve FMRF-amid'in <i>C. sapidus</i> bağırsak doku enine kesitindeki şematik lokalizasyonları	82
Şekil 4.36. FMRF-amid'in <i>C. sapidus</i> bağırsak dokusu boyuna kesitindeki immünopozitifliği	83
Şekil 4.37. Lös-enk'in <i>C. sapidus</i> bağırsak dokusu enine kesitindeki immünopozitifliği	84
Şekil 4.38. <i>C. sapidus</i> bağırsak dokusu boyuna kesitinde negatif kontrol	85
Şekil 4.39. Lös-Enk ile FMRF-amid immünoreaktivitesinin <i>R. ridibunda</i> ve <i>C. sapidus</i> beyin dokularındaki karşılaştırılması	88
Şekil 4.40. Lös-enk ile FMRF-amid immünoreaktivitesinin <i>R. ridibunda</i> Omuriliği ve <i>C. sapidus</i> torakal gangliyon dokularındaki karşılaştırılması	91

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

Lös-enk	: Lösine enkefalin
Leu-enk	: Leucine enkephalin
FMRF-amid	: Phe-Met-Arg-Phe-NH ₂
Met-enk	: Methionine enkephalin
POMC	: Pro-opiomelanokortin
HPLC	: High performance liquid chromatography
RIA	: Radioimmünoassay
DADTI	: D-Ala ² -deltorfin
DADLE	: [D-Ala ² ,D-Leu ⁵]enkefalin
MEAP	: Met-enk-arg-phe
MIH	: Molt inhibiting hormon
DAB	: Diaminobenzidin
BSA	: Sığır Serum Albumini
PBS	: Fosfat tamponu
NGS	: Normal keçi serumu
LG	: Lamina ganglionaris
ME	: Medulla externa
MI	: Medulla interna
MT	: Medulla terminalis
ON	: Optik sinir
δ	: Delta opioid reseptörü (OP ₁)
κ	: Kappa opioid reseptörü (OP ₂)
μ	: Mü opioid reseptörü (OP ₃)
σ	: Sigma opioid reseptörü
ε	: Epsilon opioid reseptörü

1.GİRİŞ

Hayvansal organizmaların, merkezi ve periferik sinir sisteminde yer alan ve peptit yapısındaki nöromodülatör maddeler tarafından düzenlenen içsel (endojen) ağrı dindirici bir sistem bulunur [1, 2, 3, 4].

Opioidler olarak isimlendirilen bu peptitler, sinir sistemi başta olmak üzere vücudun birçok bölgesinde farklı düzeylerde lokalize olmuştur. Opioid peptitler, beyin ve omurilikte sentezlendikten sonra motor sinirler ile vücudun birçok bölgesine ulaştırılır. Çoğunlukla nöromodülatör bazen de hormon olarak görev yapan opioid peptitler, hedef doku üzerinde bulunan spesifik reseptörlere bağlanarak etki gösterirler. Opioid peptitler, sinir hücrelerinin perikaryonlarında buldukları gibi motor nöronların aksoplazmasında ve ependimal hücrelerin plazmasında da bulunur [2, 3, 4].

Opioid peptitler, tıp alanında uyuşturucu (narkotik), yatıştırıcı (sedatif), ağrı dindirici (analjezik) ve tedavi edici (terapötik) olarak kullanılmaktadır. Metionin-enkefalin (met-enk) ve lösün-enkefalin (lös-enk) adı verilen 2 pentapeptit, 1975 yılında ilk defa kobay beyininden izole edilen opioid peptitlerdir. Sinir-aksiyon potansiyeli üzerine agonist etki yapan opioid peptitlerin bu depresif etkisi, nalokson, naltrekson ve naltrindol gibi antagonist maddelerle ortadan kaldırılır [1, 2, 3, 4].

Kardiyoaktif bir peptit olan FMRF-amid (Phe-Met-Arg-Phe-NH₂), ilk defa salyangozdan izole edilmiştir. Omurgalı ve omurgasız birçok canlının sinir sisteminden izole edilen FMRF-amid kalp ritmi üzerine hızlandırıcı bir etkiye sahiptir. Bu peptitlerin özellikle sinir dokularında karakterizasyonu için son zamanlarda yoğun çalışmalar yapılmaktadır [1, 2].

Bu çalışmanın amacı, immünohistokimya yöntemi kullanılarak opioid peptitlerden lös-enk ve kardiyoaktif bir peptit olan FMRF-amid'in sinir sistemi ve bağırsak dokularındaki lokalizasyonlarının belirlenmesidir. Bu amaca uygun olarak,

daha önce bu peptitlerle çalışılmadığı tespit edilen omurgalı hayvanlardan *R. ridibunda* (ova kurbağası) ve omurgasız hayvanlardan *C. sapidus* (mavi yengeç) dokuları kullanılmıştır.

Bu çalışmada, lös-enk ve FMRF-amid'in, Mersin Müftü (Efrenk) deresinden yakalanan *R. ridibunda*'nın beyin, omurilik ve siyatik sinir dokuları ile Mersin Gökusu deltasından yakalanan *C. sapidus*'un beyin, göz sapı, torakal gangliyon ve bağırsak dokularındaki lokalizasyonları araştırılmıştır. Bu peptitlerin immünopozitifliği peptitler, eşeyler, dokular, kesitler ve her iki canlı grubunun benzer dokuları arasında karşılaştırılmıştır.

R. ridibunda'nın beyin, omurilik ve siyatik sinir dokularından enine ve boyuna kesit alınarak immünohistokimyasal işaretleme yapılmıştır. Beyin dokusunun, boyuna kesitinde ön beyin (prosencefalon), orta beyin (mesencefalon) ve arka beyin (rhombencefalon), enine kesitinde ise arka beyin çalışılmıştır. Omuriliğin, boyuna kesitinde boyun (servikal), göğüs (torakal), bel (lumbar) ve kuyruk sokumu (sakral) bölgeleri çalışılırken, enine kesitinde ise, göğüs bölgesindeki ön boynuz (ventral horn), arka boynuz (dorsal horn) ve merkezi kanal (central canal) bölümleri antikor ile işaretlenmiştir.

C. sapidus'un beyin dokusundan boyuna, torakal gangliyon dokusundan ise radyal kesit alınarak immünohistokimyasal boyama yapılmıştır. Göz sapı dokusu boyuna kesitinde lamina ganglionaris (LG), medulla externa (ME), medulla interna (MI), medulla terminalis (MT) ve optik sinir (ON) kısımları antikor ile işaretlenmiştir. Ayrıca, bağırsak dokusundan enine ve boyuna kesit alınarak boyama yapılmıştır.

Opioid peptit olan lös-enk klinik tedavide sıklıkla kullanılmaktadır. Kardiyoaktif bir peptit olan FMRF-amid'in ise, önemli fizyolojik rolleri vardır. Bunların yanı sıra, opioid peptitlerin ve FMRF-amid'in hayvansal dokulardan izole edilmesi, amino asit dizilişinin belirlenebilmesi ve karakterizasyonu için öncelikle lokalizasyonlarının

belirlenmesi gerekmektedir. Bu çalışmada, spesifik antikorlar ve ışık mikroskobu kullanılarak, lös-enk ile FMRF-amid'in *R. ridibunda* ve *C. sapidus* dokularındaki yayılışı tespit edilmiştir. Bu sayede, hayvanların dokularından peptitlerin izole edilebilmeleri mümkün olabilecektir. Ayrıca, yapılan literatür araştırmasına göre *R. ridibunda* ve *C. sapidus* dokularında, lös-enk ve FMRF-amid lokalizasyonlarının araştırılmadığı gözlenmiştir. Bu iki türe ait dokulardaki, Lös-enk ve FMRF-amid düzeylerinin evrimsel açıdan da değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada, ilk defa bu peptitler, omurgalı olan *R. ridibunda* ve omurgasız olan *C. sapidus* dokularında karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. ENDOJEN OPIOİD PEPTİDLERİN GRUPLANDIRILMASI

2.1.1. Enkefalinerjik Sistem (Pro-Enkefalin A Sistemi)

Bu sistemde nöromodülatör olarak met-enk ve lös-enk bulunmaktadır. Her iki peptit merkezi sinir sisteminde yaygın olarak bulunmakla beraber, met-enk daha yaygın ve fazladır. Bunlar, pentapeptit yapısındadır ve enkefalinaz enzimleri ile yıkılırlar [2, 3, 4, 5].

2.1.2. Endorfinerjik Sistem (Pro-opiomelanokortin Sistemi - POMC)

Endorfinerjik sistemde nöromodülatör olarak bilinen β -endorfin, enkefalinler kadar yaygın bulunmamaktadır. Hipotalamus, orta beyin ve hipofizde en fazla bulunur ve hipofizden adrenokortikotropik hormon (ACTH) ile birlikte salgılanır. Burada, ACTH ile β -endorfinin öncü maddeleri ortaktır ve büyük ACTH (proprionokortin) adını alır. Proprionokortin, molekül ağırlığı 31 000 D olan uzun bir polipeptittir. β -lipotropin (β -LPH) ile ACTH bu polipeptit yapısı içindedir ve bu öncü maddeden çıkan β -LPH'nin parçalanması sonucu β -endorfin oluşur. [2, 3, 4, 5].

2.1.3. Dinorfin Sistemi (Pro-Enkefalin B Sistemi)

Dinorfin sistemi, diğer iki opioid sistemine göre çok daha sonraları bulunmuştur. Bu sistem lös-enk'i içermekle birlikte yapısı henüz tam olarak bilinmemektedir. Merkezi sinir sistemindeki yayılışı enkefalinlerden farklıdır ve en fazla hipotalamus ile hipofizde bulunmaktadır [2, 3, 4, 5].

Enkefalin ile endorfinler merkezi sinir sisteminin bazı bölgelerinde kendilerine özgü nöronal sistemler halinde bulunabilir ve bunlar "enkefalinerjik nöron" adını alırlar.

Bunlardan bazıları nöronların uzun aksonal uçları ile akso-aksonik sinaps yapan ara nöron özelliği taşırlar. Bunlara omurilik dorsal boynuzundaki kısa enkefalinerjik nöronlar örnek olarak verilebilir. Opioidler, nadiren transmitter ya da birçok yerde ko-transmitter çoğunlukla da nöromodülatör olarak etkilidir. Bu durumda opioidler membran stabilizatörü gibi işlev görürler. Opioid peptitler etkiledikleri nöronlar üzerine yavaş gelişen fakat uzun süreli inhibisyon yaparlar ve bunlardan endorfin ile dinorfin gibilerinin nörohormon gibi görevleri de vardır. Opioid peptit sistemi ile kateşolaminerjik nöronal sistem arasında anatomik dağılış bakımından paralellik vardır [1, 2, 3, 4, 5].

2.2. OPIOİD PEPTİDLERİN SİNİR SİSTEMİNDE DAĞILIŞI

Omurilik dorsal boynuzunda enkefalin ve opioid reseptörler yoğun olarak bulunmaktadır. Enkefalinler burada presinaptik inhibisyon yapan nöronlardaki sinapslarda yer alırlar. Enkefalin reseptörleri ise, periferden gelen küçük çaplı afferent liflerin, spinal sonlanmalarında bulunurlar ve ağrılı durumların bastırılmasında rol oynamaktadır. Bu bölgede afferent sinir uçlarına yakın olarak presinaptik ve postsinaptik sonlanmalar yapan inisi noradrenalin (NA) ve 5-Hidroksitriptamin (5-HT) nöronları da yer almaktadır. 9. ve 10. kafa çiftlerinin (Nervus glossopharyngeus ve Nervus vagus) duysal çekirdeklerinde opioid reseptörleri vardır. Kodein ve benzerlerinin öksürük refleksini kesmelerinde, solunum depresyonu ve emesis (kusma) olaylarında bu bölgedeki endojen opioid peptitlerin ve reseptörlerinin rolü vardır. Orta beyinde, gri cevher ile çevresindeki median rafe çekirdeklerinde enkefalinden zengin nöronlar bulunmaktadır. Bu nöronların bir kısmı kısa aksonlu olup bazıları 5-HT nöronları ile sinaps yapar. Bir kısmı da spinal inisi yollar içinde omurilik dorsal boynuzuna ulaşırlar. Talamusta enkefalinerjik sinapslar yoğundur. Hipotalamus ve hipofizde dinorfin ile endorfinler, enkefalinlere oranla daha yoğun bulunur. Enkefalinerjik nöronlar daha çok hipotalamus ve arka hipofiz bağlantısı içinde yer alır. Ayrıca, dinorfin beyin sapı ve omurilikte yüksek oranlarda bulunur. β -endorfin, en zengin olarak hipotalamus, hipofiz ve orta beyinde bulunur. Ön hipofizden ACTH salgılanmasına β -endorfin salgılanması

da eşlik eder. Bu nedenle β -endorfinin bir nörohormon görevi de aldığı kabul edilir. Mesodiensefalik görme yollarında enkefalinerjik reseptörler boldur. Merkezi sinir sistemi dışında surrenal medulla sempatik gangliyonlarında ve bağırsak miyanterik pleksusunda enkefalinerjik ara nöron bulunmuştur. Sinir sisteminde kateşolaminlerin kendileri ve fizyolojileri önce tanınmış, çok daha sonraları bunların etkili oldukları postsinaptik reseptörleri bulunmuştur. Endojen opioid peptitlerde ise tersine bir gelişme olmuştur. Opioidlerin önce reseptörleri tanınmış daha sonraları bu reseptörlere bağlanan endojen mediyatör maddeler bulunmaya başlanmıştır [1, 2, 4, 5].

2.3. MERKEZİ SİNİR SİSTEMİNDEKİ OPIOİD RESEPTÖRLERİ

2.3.1. Delta (δ - OP₁) Reseptörleri

Bu reseptörler, SKF 10,047 adlı bir madde ile aktive edilirler. İnsanda δ reseptörlerinin uyarılması, öfori ve hallusinyasyon yapar. Ayrıca, deneysel olarak σ (sigma) ve ϵ (epsilon) reseptörleri de saptanmıştır. σ 'nın spesifik agonisti enkefalinler, ϵ 'un spesifik agonisti ise β -endorfindir [2, 3, 4, 6].

2.3.2. Kappa (κ - OP₂) Reseptörleri

Bu reseptörler, ketasiklazosin ve türevleri ile selektif uyarılabilen reseptörlerdir. Nalorfin ve pentazosin de κ reseptörü üzerine agonist etkili ilaçlardır. Bunlar insanda öfori ve hallusinyasyon meydana getirirler [2, 3, 4, 6]

2.3.3. Mü (μ - OP₃) Reseptörleri

Bu reseptörler, küçük doz morfin ile uyarılabilen reseptörlerdir. Bunlar ilacın yaptığı supraspinal anesteziden sorumludur. Solunum depresyonu, öfori ve fiziksel

bağımlılık oluşmasına katkıda bulunurlar. Morfiseptin adı verilen ve μ reseptörleri üzerine etkili olduğu anlaşılan yeni bir peptidin, ağrı ile ilgisi araştırılmaktadır [2, 3, 4, 6]

2.4. R. RIDIBUNDA HAKKINDA GENEL BİLGİ

R. ridibunda, suya fazla bağlı olup su içinde, su kenarında veya su yüzeyinde bulunan cisimler üzerinde görülür. Bu türün deney hayvanı olarak kullanılmasının yanı sıra, but kısımları yenmekte ve ihraç ürünü olarak satılmaktadır. Bazı su kurbağalarında karakteristik olan temporal şerit *R. ridibunda* bireylerinde görülmez [7, 8, 9].

2.4.1. Morfolojik Karakterler

R. ridibunda'da kulak zarı her zaman bariz olup, dorso-lateral kıvrımlar iyi gelişmiştir. Vomer dişleri enine veya biraz eğik iki sıra halinde ve iç burun delikleri arasında bulunur ya da bu deliklerin arka hizasını biraz geçerler. Arka bacaklar fazla uzun değildir ve tibio-tarsal eklem burun deliğine ulaşmaz. Arka ayaklar tam perdeli olup, deri genellikle pürtüklüdür. Erkekler, dış ses kesesine sahip olmaları, ön bacaklarının kuvvetli olması ve birinci parmaklarının kaide tarafında şişkinlik bulunması ile dişilerden ayrılır. Üreme zamanında bu şişkinliğin yüzey kısmı girintili görünür. Renk ve desen çok değişik olup, sırt tarafın zemin rengi yeşilimsi gri, açık veya koyu kahverengi ya da bu renklere yakın tonda olabilir (Şekil 2.1). Karın taraf, çoğunlukla kirlili veya sarımsıdır ve genellikle küçük lekeler bulunur. Türkiye'de yaşayan kuyruksuz kurbağalar içinde, en büyük boya ulaşan bu türdür. Ergin dişilerin boyu, genellikle 10 cm, nadir olarak 15 cm boya kadar ulaşabilir. Erkekler ise, dişilere göre biraz daha küçüktür [7, 8, 9]. Sinir sistemleri iyi gelişmiştir (Şekil 2.2, 2.3). Larval dönemde sinirleri gelişmemiştir. Metamorfoz sırasında sinir sistemi farklılaşarak, ergin dönemde merkezi ve periferik sinir sistemleri tam olarak gelişmiş duruma gelir [10].

2.4.2. Ekolojik Ve Biyolojik Özellikler

R. ridibunda bol bitkili havuz, göl ve ağır akan sularda yaşar. Sudan fazla ayrılmayan ve daha çok alçak ovalardaki sularda görülen bu tür, bazen akıntılı sularda da bulunur. Memleketimizde çiftleşme, en çok mayıs ve haziran aylarında gerçekleştiği gibi, İzmir civarındaki gözlemlere dayanarak mart başında veya şubat sonlarında üreme durumunda bulunan örneklerle rastlamak mümkündür. Çiftleşme halinde bulunan fertlerde erkek, ön bacakları ile dişiye koltuk altlarından tutar, ön ayakları dişinin göğüs bölgesinde iken birleşir. Bir dişi, yaklaşık 5 000 - 10 000 kadar yumurta bırakabilir. Bunlar, birkaç kitle halinde sucul bitkiler arasına veya açık suya bırakılır. Jelatinimsi kapsül kısmı ile beraber yumurta çapı yaklaşık 7 - 8 mm olup esas yumurta (ovum) 1,5 - 2 mm kadardır. Bu türün besinlerini böcekler teşkil eder [7, 8, 9].



Şekil 2.1. *R. ridibunda*'nın genel görünüşü.

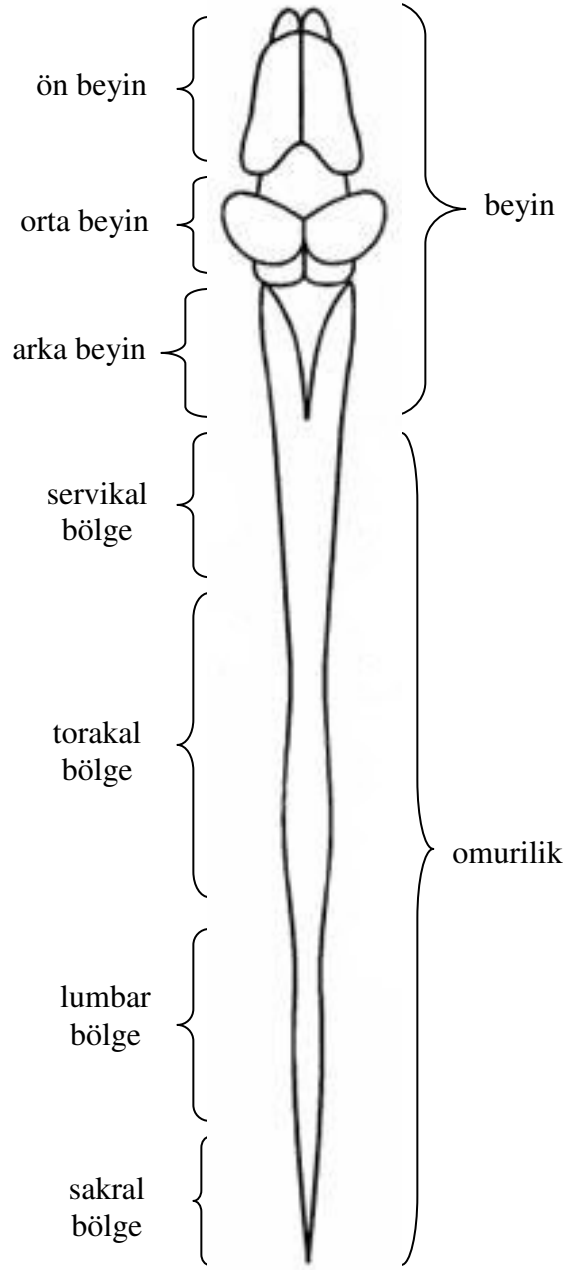
2.4.3. Coğrafi Dağılım Ve Ülkemizde Bulunduğu Yerler

Bu tür, coğrafi olarak Kuzey Afrika, Orta ve Güney Avrupa ile Batı Asya'da, cins olarak ise, Avrupa ve Amerika'da, hatta tek bir tür ile Avustralya'da yayılmıştır.

Uygun biyotop olduğu takdirde, ÷lkemizin her yerinde bulunur. *R. ridibunda* deniz seviyesinden itibaren vertikal olarak, 2500 m'ye kadar geniş bir yayılma alanına sahiptir. Bu türün, iki alt türünden biri olan *R. ridibunda ridibunda* uygun biyotop bulduğu zaman göller bölgesi hariç Türkiye'nin her yerinde, ikinci alt türü olan *R. ridibunda caralitana* ise Beyşehir, Suğla ve Eğridir Gölleri'nde yayılmıştır [7, 8, 9].



Şekil 2.2. *Rana* cinsi kurbağaların sinir sistemi.



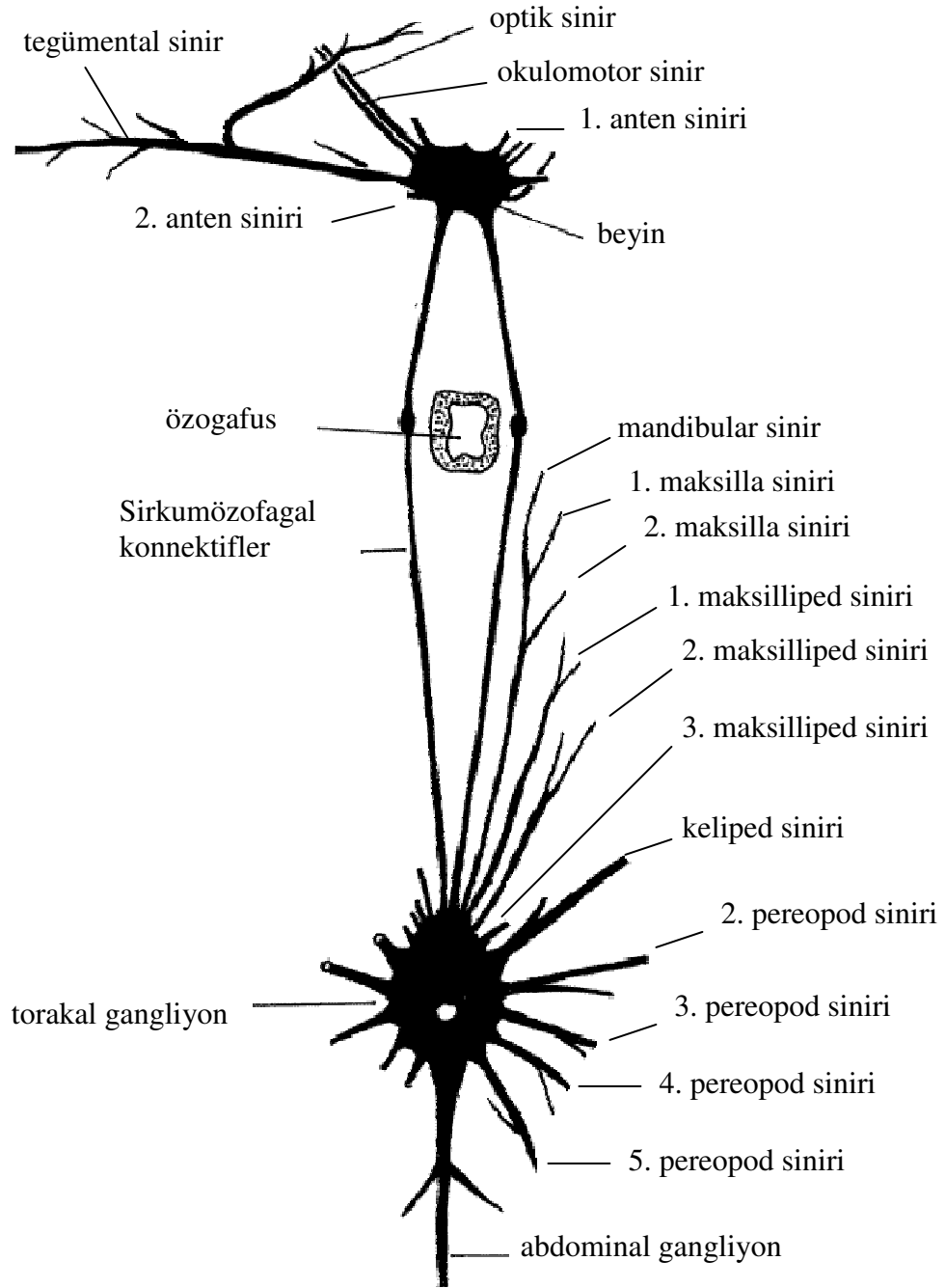
Şekil 2.3. *R. ridibunda*'nın merkezi sinir sistemi.

2.5. *C. SAPIDUS* HAKKINDA GENEL BİLGİ

İlk kez Rathbun tarafından 1896 yılında tanımlanan *C. sapidus*, mavi yengeç olarak da bilinir. Mavi yengeç Decapoda takımının üyesidir. Bunlarda ilk üç çift göğüs üyesi, maksillepede dönüşerek ağız parçalarını oluşturmuştur. Geri kalan diğer beş çift göğüs üyesi, bacak ödevi gördüğünden, bunlar on bacaklı anlamında Decapoda takımında sınıflandırılırlar. İlk bacak çifti, kuvvetlice gelişmiş ve büyük bir kıskaç taşır. Bu üyeye, keliped (kıskaç = makas) denir. 2, 3 ve 4. üye çifti yürüme bacaklarıdır ve bu üyelerin son segmenti, mızrak ucu şeklindedir. Son bacak çifti, yüzme bacağı şeklini alarak kürek biçiminde görünür. Karapaksın eni boyundan fazladır (Şekil 2.4). Erkek bireylerde karapaks boyu en fazla 9 cm, eni 20,9 cm; dişi bireylerde ise karapaks boyu en fazla 7,5 cm, eni 20,4 cm olabilmektedir. Genellikle karapaks eni 10 ile 16 cm arasında değişmektedir. Bunlarda antero-lateral dişler 9 tanedir. Sinir sistemleri iyi gelişmiştir (Şekil 2.5). Omurgalıların aksine bunlarda, merkezi sinir sistemi bütün vücuda yayılmıştır [11]. İki tane frontal dişe ve ters çevrilmiş “Y” şeklinde erkek abdomenine sahip olmaları ile *Portunus pelagicus*'tan ayrılır [12, 13, 14].



Şekil 2.4. *C. sapidus*'un genel görünüşü.



Şekil 2.5. *C. sapidus*'un sinir sistemi.

2.5.1. Morfolojik Karakterler

Başta, bir çift saplı bileşik göz ve iki çift anten vardır. Mandibulalar üst dudak ile alt dudağın arasındadır. Birinci maksiller 2 enditlidir. Enditler, üzerlerindeki dikenler sayesinde, tıpkı mandibulalar gibi besinleri ufalamaya yararlar. İkinci maksillerin iki çift enditi, bir palpleri (endopodit) ve kenarları kılıklı büyük bir solunum plakaları (eksopodit) vardır. Mavi yengeçler ayrı eşeylidirler. Abdomen kuvvetlice körelmiş ve sefalotoraksın altına kıvrılarak, toraks sternitlerinin (karın tarafındaki plakalar) üzerinde oluşmuş bir oyuğa yatar. Bunlarda dikkati çekecek derecede eşeyssel dimorfizm görülür. Erkeklerde 3, 4 ve 5. pleopot çiftleri bulunmazken dişilerde, sadece 1. çifti kaybolmuştur. Erkeklerin üye yapıları daha kuvvetlidir. Erkekler iz bulma kıllarının çokluğu, abdomenlerinin ince yapılı olması (abdomen daha dar ve daha konveks) ve abdomene ait ilk iki üye çiftinin, kopulasyon organlarına dönüşmesiyle dişilerden ayrılırlar. Erkeklerin kelipedleri, mavi olup uç kısımları kırmızıdır. Dişilerin kelipedleri ise, kırmızı olup uç kısımları koyu kırmızıdır. Alt gövde yüzeyleri krem rengi veya beyazdır. Dişilerin abdomeni erken dönemde üçgen biçimindedir. Olgun bir dişide ise neredeyse yarım daire şeklini alır [12, 13, 14].

2.5.2. Ekolojik Ve Biyolojik Özellikler

C. sapidus, ılıman ve tropik denizlerin tuzlu sularında yaşarlar. Tatlı su ile yüksek tuzluluktaki sularda sadece dişiler göçmen halde bulunabilirler. Gelişim evrelerine göre belirli tuzluluk oranı, sıcaklık derecesi, besin kaynağı, su kalitesi ve yaşam alanına gereksinim duyarlar. Mavi yengeçler, haliçlerde en yaygın bulunan omurgasız türlerinden bir tanesidir. Yaz aylarında ergin yengeçlere daha sık rastlanır. Kış aylarında ise, yengeçler aşağı haliçlerde gel-git değişimi alanlarında toplanırlar. Genç mavi yengeçler, kış ayları sırasında orta tuzluluktaki haliç sularında en bol olarak bulunurlar. Ergin mavi yengeçler tatlı su, haliç ve sığ okyanusların dip kısımlarında dağılırlar. Ergin mavi yengeçler, her ne kadar bir haliç sisteminde daha yaygın olarak bulunsada, tuzluluğa ve eşeye bağlı olarak mevsimsel dağılırlar. Genellikle yüksek

tuzluluktaki bölgelerde dişiler, düşük tuzluluktaki bölgelerde ise, erkekler daha yaygındır. Dişi mavi yengeçler, cinsel olgunluğa eriştiklerinde yaşamları boyunca sadece bir kere döllenirler. Dişi mavi yengeçler dışkıları ile erkek mavi yengeçleri harekete geçiren feromon salgırlar. Birleşme olana kadar erkek yengeçler, dişiler için yarışrlar ve onları taşıyıp korurlar. Eşleşme sırasında dişi yengeç, erkek yengecin spermlerini depolar ve daha sonra verimli bir döllenme için kullanır. Kabuğu sertleştiğinde dişi tuzlu sulara göç eder. Yumurtlamadan önce çamurda delik açar. Dişiler, döllendikten 2 ile 9 ay sonra ilk yumurtalarını bırakrlar. Dişi yengeçler, döllenmiş yumurtalarını larva çıkana kadar karına bağlı kalan sünger içine bırakrlar. Döllenmiş dişi, yaklaşık olarak 2 milyon yumurta üretir [12, 13, 14].

2.5.3. Coğrafi Dağılışı Ve Ülkemizde Bulunduğu Yerler

Bu tür, Amerika Birleşik Devletleri'nin Chesapeake Koyu ve Florida Sahilleri, Kanada, Atlas Okyanusu, Akdeniz, Danimarka, Fransa, Meksika Körfezi ile Arjantin arasında kalan sahiller, Kuzey Afrika, Güney Batı Asya, Japonya, İsrail ve Mısır'ın Nil Nehri Deltası da dahil olmak üzere geniş bir alana yayılmıştır. Türkiye'de ise, Kuzey Ege'deki acı sulu lagünlerde, Enez dolaylarındaki göllerde, Ege sahillerinde özellikle Köyceğiz ve Güllük Lagünleri'nde, Akdeniz'de ise, Fethiye'de ve Mersin'de Taşucu'nun sığ sularında, Silifke'nin Göksu Deltası'nda, Adana Akyatan'da ve Karadeniz'deki dalyanlarda bol miktarda bulunmaktadır [12, 13, 14].

2.6. OMURGALILARDA PEPTİTLERLE YAPILAN ÇALIŞMALAR

Munoz ve ark. [15], immünohistokimyasal yöntemler kullanarak *Rana perezi* beyin enine ve sagittal kesit ile omurilik enine kesitte adrenomedullin (AM) varlığını tespit etmişlerdir. Bu araştırmacılar, beyin enine ve sagittal kesitinde büyük beyin, ara beyin, orta beyin, arka beyin, beyin sapı ve küçük beyinde, özellikle purkinje hücrelerinde AM varlığını göstermişlerdir.

Sabbieti ve ark. [16], *R. esculenta* hipofizinde β -endorfinin varlığını bulmuşlardır. Guglielmotti ve ark. [77], ergin ve gelişme dönemlerindeki *R. esculenta* beyini enine kesitlerinde calretinin varlığını tespit etmişlerdir. Bu araştırmacılar ara beyinin epitalamus bölgesinde calretinin bakımından zengin nöronlar olduğunu bulmuşlardır. Başka bir araştırmacı grup tarafından, *R. esculenta* beyin dokusu enine ve sagittal kesitlerinde calretinin varlığı bulunmuştur [18]. Aynı araştırmacılar tarafından, ön beyinin büyük beyin ve ara beyin bölgelerinde, orta beyin ile arka beyinde calretinin lokalize edilmiştir. Diğer bir araştırma grubu tarafından, *R. esculenta*'nın beyin ve hipofizinde FMRF-amid lokalizasyonu yapılmıştır [19]. Bu araştırmacılar, larval dönem ile ergin erkek ve dişi *R. esculenta* ön beyini, orta beyini ve arka beyini olmak üzere beyinin bütün bölgelerinde FMRF-amid lokalizasyonunu bulmuşlardır. Kozicz ve Lazar [20], *R. esculenta* orta beyininin optik ventrikül ve optik ventrikülün ependimal hücrelerinde met-enk lokalizasyonunu yapmışlardır. Diğer bir araştırma grubu, *R. esculenta* siyatik sinirinde enkefalinlerin varlığını göstermiştir [21].

Hu ve ark. [22], *Xenopus laevis* erkek beyin ve omurilik enine kesitlerinde hipofiz adenil siklaz aktive edici polipeptit (PACAP) ile onun reseptörünün (PAC_1) mRNA'sını lokalize etmişlerdir. Bu araştırmacılar, omuriliğin bazı bölgelerinde PACAP mRNA'sı buldukları halde PAC_1 mRNA'sına rastlamamışlardır. Diğer bir araştırma grubu tarafından, *X. Laevis* ön beyininde FMRF-amid lokalize edilmiştir [23].

Hernandez ve ark. [24], immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak *R. pipiens* çene bölgesindeki trigeminal ganliyon ve trigeminal gangliyon köklerinde P maddesi ve taikinini lokalize etmişlerdir. Stevens ve Rothe [25], *R. pipiens* omuriliğinde enkefalinlerjik sisteminin varlığını bulmuşlardır. Diğer bir araştırma grubu tarafından, *R. pipiens* omuriliğinde met-enk, β -endorfin ve dinorfinin varlığı tespit edilmiştir [26]. Frank ve Sudha [27], *R. pipiens* ve erkek İngiliz kısa saçlı kobay siyatik siniri ile kobay ve Yeni Zelanda beyaz tavşanı vagus sinirinde enkefalinlerin varlığını göstermişlerdir.

Tooyama ve ark. [28], nükleer magnetik rezonans tekniği ile *Rana catesbeiana* derisinde deltorfin ve dermorfin varlığını bulmuşlardır. Aynı araştırmacılar tarafından, immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak deride deltorfin ve dermorfin lokalize edilmiştir. Diğer bir çalışma grubu tarafından, immünohistokimyasal yöntemlerle *R. catesbeiana* omurilik enine kesitlerinde P maddesi lokalize edilmiştir [29]. Bu araştırmacılar, omuriliğin lumbar bölümünün arka boynuz, ön boynuz ve lateral funikulus kısımlarında P maddesi bakımından zengin perikaryonlar bulmuşlardır. Kanetoh ve ark. [30], *R. catesbeiana* beyininden yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) yöntemi ile FMRF-amid izole etmişlerdir. Başka bir araştırma grubu tarafından, *R. catesbeiana* ince bağırsak dokusunda somatostatin varlığı kanıtlanmıştır [31]. Bu araştırmacılar, miyanterik pleksus, dairesel kas tabakaları, submukozal tabaka ve mukoza sinir fiberlerinde somatostatini lokalize etmişlerdir. Hirai ve Katayama [32], *R. catesbeiana* sempatik gangliyon hücrelerindeki met-enk varlığını bulmuşlardır.

Iwasaki ve ark. [33], hematoksilen-eozin, azan, PAS ve aldehit fuksin gibi boyalar kullanarak, *Rana porosa* dil epitelyumunda bazı peptitlerin varlığını gözlemişlerdir. Bu araştırmacılar tarafından, ışık ve elektron mikroskobu kullanılarak dil epitelyumunda physalaemin, elodoisin, nörokinin ve P maddesinin bulunduğu tespit edilmiştir.

Mollereau ve ark. [34], *R. ridibunda* beyininden digitonin adı verilen bir peptit izole etmişlerdir. Chartrel ve ark. [35], memeli gonadotropin salgılatıcı hormon (mGnRH) ve kuş gonadotropin salgılatıcı hormon(cGnRH-II)'un varlığı *R. ridibunda* omuriliği enine kesitlerinde kanıtlanmışlardır. Aynı araştırmacılar tarafından, omuriliğin servikal ve torakal bölgelerinin rostrokaudal, gri cevher ve merkezi kanal kısımlarında mGnRH, servikal, torasik, lumbar ve sakral bölgelerinin ön boynuz, arka boynuz ve merkezi kanal kısımlarında ise, cGnRH-II lokalizasyonları bulunmuştur. Başka bir çalışma grubu tarafından, *R. ridibunda* hipofizi üzerine pentazosinin etkileri çalışılmıştır [36]. Bu araştırmacılar, 5.10^{-5} M pentazosinin σ reseptörleri üzerine agonist etki yaparak hipofizdeki melanotrofik hücrelerden dışarıya K^+ akışını azalttığı ve dolayısı ile aksiyon

potansiyelinin uzamasına yol açtığını gözlemlemişlerdir. Çamlıca ve ark. [37] ile Aşkin ve ark. [38], *R. ridibunda* siyatik sinirinde enkefalinergic sistemin varlığını bulmuşlardır.

Wittle ve ark. [39], *Bufo americanus* ve *Rana clamitans* beyini enine ve boyuna kesitlerinde kromogranin A (CgA) lokalizasyonlarını tespit etmişlerdir. Bu araştırmacılar tarafından, her iki türün larvalarının ön beyininde, CgA varlığı gösterilmiştir.

Tonge ve ark. [40], *Rana temporaria* siyatik siniri enine ve boyuna kesitlerinde protein kinaz varlığını tespit etmişlerdir. Bu araştırmacılar tarafından, zedelenmiş siyatik sinirin üzerine dorsal kök gangliyonu implante edilmesiyle onarıldığı gözlemlenmiştir. Valverde ve ark. [41], *R. temporaria* bağırsak dokusu enine ve boyuna kesitlerinde somatostatin, glukagon, vazoaktif intestinal peptit (VIP), gastrin, bombesin, P maddesi ve nörotensin gibi peptitlerin varlığını bulmuşlardır. Bu araştırmacılar tarafından, bağırsakların kas tabakası sinir fiberlerinde ise, VIP ve met-enk varlığı kanıtlanmıştır. Diğer bir çalışma grubu tarafından, *R. temporaria* omuriliğinde met-enk ve oubain varlığı gösterilmiştir [42]. Hajek ve ark. [43], *R. temporaria* omuriliğinde enkefalinergic sistemin varlığını bulmuşlardır.

Ku ve ark. [44], *Rana rugosa* sindirim sistemindeki salgı hücrelerinden salgılanan bazı nöropeptitlerin varlığını göstermişlerdir. Bu araştırmacılar tarafından, özofagusta somatostatin, bombesin ve glukagon, pilorda somatostatin, bombesin ve glukagon, antrumda somatostatin, BCG, gastrin, kolesistokinin (CCK), insan pankreatik polipeptiti (HPP), bombesin ve glukagon, duodenumda somatostatin, CCK ve glukagon, ileumda somatostatin, CCK, glukagon ve HPP, rektumda ise somatostatin lokalizasyonları belirlenmiştir.

Hughes ve ark. [45], kobay beyininden met-enk ve lös-enk adını verdikleri 2 pentapeptiti izole etmişlerdir. Bu araştırmacılar, kobay beyininden hazırladıkları karışımda buldukları 2 peptitin amino asit dizilimini kütle spektrofotometresi kullanarak

bulmuşlardır. H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH dizilimindeki peptitin met-enk, H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH dizilimindeki peptitin lös-enk, olduğunu belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar tarafından izole edilen bu peptitlerin (8.10^{-9} M met-enk ve $1,7.10^{-8}$ M lös-enk), elektriksel olarak uyarılmış fare sperma kanalı ve kobay ileumu sinirleri üzerindeki opiat reseptörlerine bağlanarak, inhibisyon meydana getirdiği ve bu etkilerin 9.10^{-7} M nalokson ile ortadan kaldırıldığı gözlemlenmiştir.

Lazar [46], kurbağa, balık ve sürüngen sinir sistemlerinde lös-enk ve FMRF-amid lokalizasyonlarını gösteren derleme çalışması yapmıştır. Bu araştırmacının belirttiğine göre, kurbağalarda Pinelli ve ark. (1999) *R. esculenta*, *Pipa pipa*, *Triturus carciflex*, *Triturus vulgaris* ve *Ceratophrys ornata* beyini enine kesitlerinde büyük beyin, ara beyin ve orta beyinde FMRF-amid bakımından zengin nöronlar bulmuşlardır. Aynı araştırmacının belirttiğine göre, Kuljis ve Katren (1982) *R. pipiens*, Merchantaler ve ark. (1989) *R. esculenta* ve *Litoria moorei* beyini enine kesitlerinde büyük beyin ve orta beyinde lös-enk'i lokalize etmişlerdir. Ayrıca, bu araştırmacının belirttiğine göre balıklarda Vecino ve ark. (1992) *Oncorhynchus mykiss* (renkli alabalık) beyininde lös-enk, Fujii ve Kobayashi (1992) *Crassius auratus*, Pestarino ve Vallario (1996) *Champsos exos* beyininde FMRF-amid, sürüngenlerde Medina ve Smeets (1992) *Gekko gecko* ve *Gallotia galloti* beyininde lös-enk, Vallario ve ark. (1994) *Pedarcis sicula* beyininde, D'Aniello ve ark. (1999) ise *Caiman crocodilus* sinir fiberlerinde FMRF-amid bakımından zengin nöronlar bulmuşlardır.

D'Este ve ark. [47], erkek fare beyini enine kesitlerinde D-Ala²-deltorfin (DADTI) ve tiroksin hidroksilaz (TH) varlığını bulmuşlardır. Bu araştırmacılar tarafından, ön ve orta beyinde DADTI ve TH bakımından zengin nöronlar bulunduğu gözlemlenmiştir.

Elfvig ve ark. [48], erkek kobay karın boşluğu mezenterinde dinorfin bakımından zengin nöronlar gözlemlenmişlerdir. Bu araştırmacılar tarafından, ışık mikroskobu ile mezenterin nöropil ve etrafındaki hücre gövdelerinde, mezenterik üst kutup ve karın

boşluğuna bakan taraftaki bölgelerde dinorfin lokalizasyonu yapılmıştır. Aynı araştırmacılar tarafından, elektron mikroskobu ile mezenterin geniş sinir uçlarında, satellit hücrelerinin etrafında ve gangliyonların hücre gövdelerinde, dinorfinin lokalize olduğu bulunmuştur. Diğer bir çalışma grubu, Sprague/Dawley erkek rat beyininde, met-enk varlığını göstermiştir [49]. Kevelaitis ve ark. [50], erkek Wistar rat kalbinde enkefalinlerin bulunduğunu gözlemişlerdir. Diğer bir çalışma grubu tarafından, Sprague/Dawley erkek rat omuriliği servikal bölgesinde met-enk ve delta opioid reseptörü (DOR) lokalize edilmiştir [51]. Bu araştırmacılar, ışık ve elektron mikroskobu kullandıkları çalışmalarında, omuriliğin arka boynuzunda %66 oranında met-enk ve %23 oranında DOR bulunduğunu gözlemişlerdir. Olive ve ark. [52], Sprague/Dawley erkek rat beyini sagittal kesitlerinde μ ve δ opioid reseptörlerini lokalize etmişlerdir. Bu araştırmacılar tarafından, beyinde bulunan sinir fiberleri ve perikaryonlarında bu reseptörlerin varlığı kanıtlanmıştır. Aynı araştırmacılar tarafından, bu reseptörlerin lokalize edilmesinin onların agonisti olan enkefalin ve synaptofizinin de bu bölgede lokalize olduğunun bir kanıtı olduğu gösterilmiştir. Başka bir çalışma grubu, Sprague/Dawley erkek rat omuriliği enine kesitlerinde μ opioid reseptörü ve onun agonisti olan lös-enk varlığını kanıtlamıştır [53]. Bu araştırmacılar tarafından, omuriliğin servikal bölgesinin dorsal boynuz alanında μ opioid reseptörünün yoğun olarak lokalize olduğu gözlemlenmiştir. Aynı araştırmacılar tarafından, elektron mikroskobu kullanılarak küçük miyelinsiz aksonlarda %48, akson terminallerinde %15, dendritlerde %36 oranında μ reseptörü, dendritlerde ise %21 oranında lös-enk bulunmuştur. Arvidsson ve ark. [54], Sprague/Dawley erkek rat beyin sapı ve omurilik kesitlerinde DOR ve onun agonisti olan enkefalinlerin lokalizasyonlarını bulmuşlardır. Bu araştırmacılar tarafından, beyin sapının yanı sıra, omuriliğin lumbar, torakal ve sakral bölgelerinin gri cevher, dorsal boynuz, merkezi kanal, ventral boynuz, otonomik alan ve beyaz cevher alanlarında DOR ve enkefalinlerin lokalizasyonu bulunmuştur. Diğer bir çalışma grubu tarafından, Sprague/Dawley ratların beyin, omurilik ve hipofiz bezinde FMRF-amid varlığı gösterilmiştir [55]. Bu araştırmacılar, omurilikte 368 fmol/mg, hipofizde 1008 fmol/mg, hipotalamusta 202 fmol/mg ve beyin sapında 136 fmol/mg protein oranında FMRF-amid bulunduğunu gözlemişlerdir. Ferrarese ve ark. [56],

Sprague/Dawley ratlarının omuriliğinde FMRF-amid varlığını kanıtlamışlardır. Bu araştışıcılar tarafından, omuriliğın lumbo-sakral bölgesinde ve özellikle dorsal boynuzda FMRF-amid bakımından zengin sinir hücreleri bulunmuştur. Aynı araştışıcılar tarafından, omuriliğın, orta torakal alandan kesildiği zaman lumbar bölgedeki FMRF-amid miktarının %20 ile 50 arasında azalmasına rağmen, lumbo-sakral bölgeden kesildiği zaman lumbar alandaki FMRF-amid miktarının %50 oranında azaldığı bulunmuştur. Bu araştışıcılara göre, FMRF-amid'in bir kısmı daha aşağıda bulunan siyatik sinirden ve sinir gangliyonlarından kaynaklanmaktadır. Başka bir çalışma grubu, ratların beyin, omurilik ve hipofizinde FMRF-amid'in lokalizasyonunu tespit etmişlerdir [57]. Bu araştışmacılar tarafından, beyinin yanı sıra, beyin sapı, omuriliğın dorsal ve ventral boynuz bölgeleri ile hipofizin nöral lob bölgelerinde FMRF-amid'in lokalize olduğu gözlemlenmiştir. Cherubini ve ark. [58], kobay ileumu miyanterik pleksusu sinirlerinde enkefalinlerin varlığını göstermişlerdir. Yoshimura ve North [59], ratların omuriliğında met-enk ve DADLE bulunduğunu göstermişlerdir.

Millam ve ark. [60], evcil besi hindisi beyin dokusu sagital kesitlerinde lös-enk ve met-enk lokalizasyonlarını yapmışlardır. Bu araştışmacılar tarafından, orta beyinde lös-enk ve met-enk bakımından zengin nöronlar bulunduğu gözlemlenmiştir.

Takasaki ve ark. [61], Yeni Zelanda beyaz tavşanı kalp kasında β -endorfin, lös-enk, met-enk ve met-enk-arg-phe (MEAP) varlığını göstermişlerdir.

Katayama ve Nishi [62], erkek ve dişi kedi parasempatik gangliyonlarında lös-enk ve met-enk varlığını bulmuşlardır.

2.7. OMURGASIZLARDA PEPTİTLERLE YAPILAN ALIşMALAR

Lee ve Watson [63], *C. sapidus* göz sapında molt inhibiting hormon (MIH) varlığını kanıtlamışlardır. Diğer bir çalışma grubu, *C. sapidus* göz sapı gangliyonlarında MIH mRNA'sının varlığını kanıtlamıştır [64]. Bu araştışıcılar tarafından, yengeçlerde

MIH'in ecdysteroid sentezini negatif yönde etkilediği sonucuna varılmıştır. Watson ve ark. [65], immünohistokimyasal yöntemlerle *C. sapidus* göz sapında MIH varlığını kanıtlamışlardır. Diğer bir araştırmacı tarafından, RIA ve bioassay yöntemleri kullanılarak, *C. sapidus* perikardial organ ve torakal gangliyon ekstraktlarından FMRF-amid benzeri bir peptit izole edilmiş ve amino asit dizisi belirlenmiştir [66].

Jaros ve ark. [67], immünohistokimyasal yöntemlerle *Carcinus maenas* (sahil yengeci) göz sapının LG, ME, MI, MT, sinüs bezi, MT-Xorgan kompleksi, LG ile ME'yi bağlayan 1. kiyazma ve ME ile MI'yı bağlayan 2. kiyazma bölgelerinde enkefalinlerden zengin sinir fiberleri bulmuşlardır. Bu araştırmacılar tarafından, HPLC ve RIA yöntemleri kullanılarak sinüs bezi ekstraktlarında lös-enk, met-enk ve met-enk-arg-phe varlığı kanıtlanmıştır. Diğer bir araştırma grubu, HPLC, RIA ve biyoassay yöntemleri ile *C. maenas* torakal gangliyon ekstraktlarından 3 pmol lös-enk ve 1 pmol met-enk izole etmiştir [68]. Bu araştırmacılar tarafından, hazırlanan ekstraktlarda göz sapının MT bölgesinde 9.4 fmol, LG ve MI bölgesinde 1.6 fmol, ME bölgesinde 5.4 fmol, sinüs bezi bölgesinde 4.5 fmol, serebral gangliyonda 50 fmol ve torakal gangliyonda 4000 fmol enkefalin bulunmuştur. Diğer bir araştırmacı tarafından, *Cherax destructor* (kerevit), *C. maenas*, *H. americanus*, *Eriocheir sinensis* (Çin yengeci) ve *M. rosenbergi* sinir sisteminde FMRF-amid varlığı gösterilmiştir [69]. Bu araştırmacı, *C. destructor* beyini antennular nöropili, tegumentar sinir, ventral sinir kökleri, abdominal gangliyon, suboesophageal gangliyon ve torakal gangliyon sinirlerinde, *C. maenas* beyini antennular nöropili, tegumentar sinir, abdominal gangliyon, abdominal sinir kökleri, suboesophageal gangliyon ve torakal gangliyon sinirlerinde, *Homarus americanus* (istakoz) beyini antennular nöropili, tegumentar sinir, suboesophageal gangliyon, ventral sinir kökleri, okümülator sinir ve torakal gangliyon sinirlerinde, *E. sinensis* ve *M. rosenbergi* torakal gangliyon sinirlerinde FMRF-amid lokalizasyonunu bulmuştur.

Kobierski ve ark. [70], *H. americanus* sinir sistemindeki FMRF-amid lokalizasyonunu yapmışlardır. Bu araştırmacılar tarafından, optik sinirle bağlantılı

olarak beyinin optik nöropil bölgesinde 5 – 15 µm çapında 60 – 75, circumesophageal gangliyon(CEG)'da 5 – 50 µm çapında 8 – 12, subesophageal gangliyon(SEG)'da 10 – 80 µm çapında 80 – 90, torakal gangliyonda 5 – 50 µm çapında 75 – 80, abdominal gangliyonda 100 – 150 µm çapında 80 – 90 arasında FMRF-amid bakımından immünopozitif sinir bulunmuştur. Aynı araştırmacılar tarafından RIA yöntemi kullanılarak, FMRF-amid immünoreaktivitesinin göz sapında 0.64 pmol/mg, beyinde 2.15 pmol/mg, torakal bölgede 2.03 pmol/mg, abdominal bölgede 1.42 pmol/mg ve kalpte 1.09 pmol/mg protein olarak bulunmuştur. Trimmer ve ark. [71], *H. americanus* sinir sisteminde FMRF-amid ve met-enk-arg-phe varlığını kanıtlamışlardır. Bu araştırmacılar tarafından, perikardial organ ekstraktlarından met-enk-arg-phe ve FMRF-amid izole edilerek, daha sonra bunların amino asit dizilimleri bulunmuştur.

Sithigorngul ve ark. [72], *Macrobrachium rosenbergii* (karides) göz sapı ekstraktlarında FMRF-amid varlığını kanıtlamışlardır. Bu araştırmacılar tarafından, mikrosekans analizi ile göz sapı ekstraktlarında bulunan FMRF-amid'in amino asit dizilimi belirlenmiştir.

Jacobs ve Van Herp [73], *Palaemon serratus* (büyük karides) göz sapında FMRF-amid varlığını kanıtlamışlardır. Bu araştırmacılar tarafından, göz sapının LG, MT-Xorgan kompleksi ve circumorbital bez bölgelerinde FMRF-amid bakımından zengin nöronlar bulunmuştur.

Skiebe ve Schneider [74], *Cancer borealis* (yengeç) somatogastrik sinir sisteminin komisural gangliyon ve somatogastrik gangliyon bölgelerinde allostatini lokalize etmişlerdir.

Fingerman ve ark. [75], *Uca pugilator* göz sapında lös-enk, met-enk, FMRF-amid ve P maddesi varlığını kanıtlamışlardır. Bu araştırmacılar tarafından, göz sapının MT, LG, kiyazmatik alanlar, sinüs bezi, retinular hücrelerin çoğu ve optik pedinkül gibi bölgelerinde lös-enk, MT, LG, sinüs bezi ve retinular hücrelerin çoğu, kiyazmatik

alanlar, optik pedinkül ve MT-Xorgan kompleksi gibi bölgelerinde met-enk, optik gangliyonun her 3 kiyazmatik bağlantı bölgeleri başta olmak üzere ME, MI, MT-Xorgan kompleksi ve optik pedinkül bölgelerinde FMRF-amid, LG, ME, MI, retinular hücreler, sinüs bezi ve optik pedinkül bölgelerinde P maddesi lokalize edilmiştir. Diğer bir çalışma grubu, *U. Pugilator* optik sinirinde met-enk ve β -endorfin varlığını göstermiştir [76]. Kulkarni ve Fingerman [77], *U. Pugilator* göz sapında met-enk ve FMRF-amid varlığını bulmuşlardır.

Mangerich ve Keller [78], *Orconectes limosus* (kerevit) sinir sisteminde FMRF-amid lokalizasyonunu bulmuşlardır. Bu araştırmacılar tarafından, serebral gangliyonun anterior olfaktör, anterior, dorsal, lateral ve posterior somata bölgelerinde, optik gangliyonlarda, circumoesophageal konnektiflerinde ve komissular gangliyonlarda FMRF-amid lokalizasyonu bulunmuştur. Diğer bir çalışma grubu tarafından, *Procambarus clarkii* (kerevit) kalbi ve abdominal kaslarında FMRF-amid benzeri olan NF₁ ve NF₂ adı verilen 2 peptidin varlığı bulunmuştur [79]. Mercier ve ark. [80], *P. clarkii* merkezi ve periferik sinir sisteminde FMRF-amid lokalizasyonlarını bulmuşlardır. Bu araştırmacılar tarafından, merkezi sinir sisteminin akson ve hücre gövdeleri, torakal gangliyon, perikardial organ, ince bağırsak ve son bağırsak sinirlerinde FMRF-amid lokalize edilmiştir. Aynı araştırmacılar tarafından, perikardial organ, kalp, ince bağırsak, son bağırsak, ekstensör sinirler, ekstensör kaslar, beyin, circumoesophageal gangliyon, suboesophageal gangliyon, torakal gangliyon ve abdominal gangliyonlardan FMRF-amid izole edilmiştir.

Beorlegui ve ark. [81], *O. Mykiss*, pilorik çekum ve bağırsak dokusunda somatostatin-25, bombesin, C-bombesin, P maddesi, salmon PP, NPY, PYY, PP, glukagon, GLP1, met-enk ve CCK varlığını kanıtlamışlardır. Bu araştırmacılar tarafından, glukagon ve GLP1'in aynı hücrede bulunduğu gözlemlenmiştir.

Stefano ve Martin [82], *Mytilus edulis* (midye) pedal gangliyonunda enkefalin ve FMRF-amid lokalizasyonlarını bulmuşlardır. Diğer bir araştırma grubu tarafından, *M.*

edulis ve *Leucophaea maderae* (Madeira hamam böceği) hemositlerinde enkefalinlerin varlığı gösterilmiştir [83]. Leung ve Stefano [84], *M. edulis* pedal gangliyonundan met-enk, lös-enk ve met-enk-arg-phe'nin izolasyonunu yapmışlardır. Diğer bir araştırmacı grup, *M. edulis* pedal gangliyonunda β -endorfin ve enkefalinlerin varlığını bulmuştur [85].

Martin ve ark. [86], *Octopus vulgaris* (ahtapot) vena cava nöropilinde β -endorfin ve enkefalinlerin lokalizasyonunu tespit etmişlerdir.

Remy ve Dubois [87], dişi *Locusta migratoria* (çekirge) beyin dokusunun met-enk lokalizasyonunu bulmuşlardır. Diğer bir araştırma grubu tarafından *L. migratoria* beyin ve kalp dokularında met-enk lokalizasyonu gösterilmiştir [88].

Walther ve Schiebe [89], dişi *Schistocerca gregaria* (çekirge) nörohemal organında FMRF-amid varlığını bulmuşlardır.

Stefano ve ark. [90], *L. maderae* orta bağırsağında enkefalinlerin varlığını göstermişlerdir.

Duve ve ark. [91], *Diptera punctata* (hamam böceği) beyin ve kalp dokularında enkefalinlerin lokalizasyonlarını bulmuşlardır.

Çizelge 2.1. Omurgalılarda enkefalin ve FMRF-amid ile yapılan çalışmalar

Yazarlar ve yayın tarihi	Hayvan grubu	Doku	Peptit
Hughes ve ark., 1975	Kobay	Beyin	Lös-enk, met-enk
Katayama ve Nishi, 1984	Kedi	Parasempatik gangliyon	Lös-enk, met-enk
Hajek ve ark., 1985	<i>R. temporaria</i>	Omurilik	Enkefalin
Cherubini ve ark., 1985	Kobay	Bağırsak	Enkefalin
Ferrarese ve ark., 1986	Rat	Omurilik, siyatik sinir	FMRF-amid
Frank ve Sudha, 1987	Kobay	Siyatik sinir, vagus siniri	Enkefalin
Stevens ve ark., 1987	<i>R. pipiens</i>	Omurilik	Met-enk
Hirai ve Katayama, 1988	<i>R. catesbeiana</i>	Sempatik gangliyon	Met-enk
Majane ve ark., 1989	Rat	Beyin, omurilik	FMRF-amid
Varverde ve ark., 1993	<i>R. temporaria</i>	Bağırsak	Met-enk
Cheng ve ark., 1995	Rat	Omurilik	Met-enk
Cheng ve ark., 1996	Rat	Omurilik	Lös-enk
D'Aniello ve ark., 1996	<i>R. esculenta</i>	Beyin, hipofiz	FMRF-amid
Stevens ve Rothe, 1997	<i>R. pipiens</i>	Omurilik	Enkefalin
Olive ve ark., 1997	Rat	Beyin	Enkefalin
Takasaki ve ark., 1999	Tavşan	Kalp	Lös-enk, met-enk
Kevelaitis ve ark., 1999	Rat	Kalp	Enkefalin
Kozicz ve Lazar, 2001	<i>R. esculenta</i>	Beyin	Met-enk
Millam ve ark., 2002	Hindi	Beyin	Lös-enk, met-enk
Kanetoh ve ark., 2003	<i>R. catesbeiana</i>	Beyin	FMRF-amid
Çamlıca ve ark., 2004	<i>R. ridibunda</i>	Siyatik sinir	Enkefalin
Pinelli ve ark., 2004	<i>X. laevis</i>	Beyin	FMRF-amid
Aşkin ve ark., 2007	<i>R. ridibunda</i>	Siyatik sinir	Enkefalin

Çizelge 2.2. Omurgasızlarda enkefalin ve FMRF-amid ile yapılan çalışmalar

Yazarlar ve yayın tarihi	Hayvan grubu	Doku	Peptit
Martin ve ark., 1979	<i>O. vulgaris</i>	Vena cava	Enkefalin
Remy ve Dubois, 1981	<i>L. migratoria</i>	Beyin	Met-enk
Stefano ve ark., 1982	<i>L. maderae</i>	Bağırsak	Enkefalin
Stefano ve Martin, 1983	<i>M. edulis</i>	Pedal gangliyon	Enkefalin FMRF-amid
Leung ve Stefano, 1983	<i>M. edulis</i>	Pedal gangliyon	Lös-enk, met-enk
Jacobs ve Van Herp, 1984	<i>P. serratus</i>	Göz sapı	FMRF-amid
Romeuf ve Remy, 1984	<i>L. migratoria</i>	Beyin, kalp	Met-enk
Jaros ve ark., 1985	<i>C. maenas</i>	Göz sapı	Enkefalin
Fingerman ve ark., 1985	<i>U. pugilator</i>	Göz sapı	Lös-enk, met-enk FMRF-amid
Kobierski ve ark., 1987	<i>H. americanus</i>	Beyin Torakal gangliyon	FMRF-amid
Trimmer ve ark., 1987	<i>H. americanus</i>	Perikardial organ	Enkefalin FMRF-amid
Walther ve Schiebe, 1987	<i>S. gregaria</i>	Nörohemal organ	FMRF-amid
Mangerich ve Keller, 1988	<i>O. limosus</i>	Serebral gangliyon Optik gangliyon	FMRF-amid
Lüschen ve ark., 1991	<i>C. maenas</i>	Torakal gangliyon	Lös-enk, met-enk
Mercier ve ark., 1991	<i>P. clarkii</i>	Beyin Torakal gangliyon Perikardial organ Bağırsak	FMRF-amid
Krajniak, 1991	<i>C. sapidus</i>	Torakal gangliyon Perikardial organ	FMRF-amid
Duve ve ark., 1991	<i>D. punctata</i>	Beyin, kalp	Enkefalin
Skerret ve ark., 1995	<i>P. clarkii</i>	Kalp Abdominal kaslar	FMRF-amid
Schmidt, 1997	<i>C. maenas</i> <i>C. destructor</i> <i>H. americanus</i> <i>E. sinensis</i> <i>M. rosenbergi</i>	Beyin Torakal gangliyon	FMRF-amid
Sithigorngul ve ark., 1998	<i>M. rosenbergi</i>	Göz sapı	FMRF-amid

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada, lös-enk ve FMRF-amid'in, Mersin Müftü Deresi'nden yakalanan *R. ridibunda*'nın beyin, omurilik ile siyatik sinir dokularında ve Mersin Göksu Deltası'ndan yakalanan *C. sapidus*'un beyin, göz sapı, torakal gangliyon ile bağırsak dokularında lokalizasyonları araştırılmıştır. Bu peptitlerin immünopozitifliği, birbiri ile karşılaştırıldığı gibi, eşeyler arasında, dokular arasında, kesitler arasında ve iki türün benzer dokuları arasında da karşılaştırılmıştır.

Dokular, Olympus marka fotoğraf makinesi ataçmanlı mikroskopta incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir. Bu fotoğraflar, dijital ortamda bilgisayara aktarılmış ve immünopozitif hücreler ile immünonegatif hücreler işaretlenmiştir. Her dokuya ait hücreler, Mikrosoft Paint programı kullanarak tekrar sayısı kadar (n=3) sayılmış ve işaretli hücrelerin, % ortalamaları hesaplanmıştır. Daha sonra her dokuya ait immünopozitif hücrelerin, % aritmetik ortalamaları tespit edilmiştir [70].

R. ridibunda'nın beyin, omurilik ve siyatik sinir dokularından enine ve boyuna kesit alınarak, immünohistokimyasal işaretleme yapılmıştır. Beyin dokusunun, boyuna kesitinde ön beyin, orta beyin ve arka beyindeki immünopozitif hücreler sayılarak bu bölgeler, lös-enk ve FMRF-amid'in immünopozitifliği bakımından kendi aralarında da karşılaştırılmıştır. Beyin doku enine kesitinde, arka beyindeki immünopozitif hücreler sayılmıştır. Omurilik dokusunun, boyuna kesitinde servikal, torakal, lumbar ve sakral bölgelerindeki immünopozitif hücreler sayıldı ve bu bölgeler kendi aralarında da karşılaştırıldı. Omurilik enine kesitinde, torakal bölgedeki ön boynuz, arka boynuz ve merkezi kanal alanlarında bulunan immünopozitif hücreler sayılarak, bu alanlar kendi aralarında da karşılaştırılmıştır.

C. sapidus'un beyin dokusundan boyuna, torakal gangliyon dokusundan ise, radyal kesit alınarak, immünohistokimyasal boyama yapılmış ve immünopozitif hücreler sayılmıştır. Göz sapı dokusu boyuna kesitinde LG, ME, MI, MT ve ON bölgelerindeki

immünopozitif hücreler sayılarak bu bölgeler, lös-enk ve FMRF-amid'in immünopozitifliği bakımından, kendi aralarında da karşılaştırılmışlardır. Bağırsak dokusundan, enine ve boyuna kesit alınarak, işaretleme yapılmış ve immünopozitif hücreler sayılmıştır.

3.1. DENEY HAYVANLARI

3.1.1. Deney Hayvanlarının Yakalanması

Deneylerde, omurgalı hayvanlardan *R. ridibunda* ve omurgasız hayvanlardan *C. sapidus* kullanılmıştır. Ağırlığı 40 ± 5 gr olan *R. ridibunda*, Mersin Müftü Deresinin denize döküldüğü yerden 800 m mesafede, Cumhuriyet mahallesi mevki'nden atrap kullanılarak yakalanmıştır. Ağırlığı 65 ± 5 gr olan *C. sapidus* ise, Mersin Göksu Deltası Akgöl mevki'nden kafes kullanılarak yakalanmıştır. 12'şer adet olarak yakalanan deney hayvanları, havalandırılmalı bidonlar içerisinde taşınmış ve laboratuvar koşullarına uyum sağlamaları için 5 gün boyunca akvaryumda bekletilmiştir.

3.1.2. Kurbağa Dokularının Alınması

Kurbağalara anestezi madde olarak ketamin uygulanmıştır. Ketamin (0.1mg/gr) insülin enjektörü kullanılarak, biceps femoris içine enjekte edilmiştir. Kurbağaların, uyutulmalarından sonra, karınları açılarak aortaya açılan truncus arteriosus içine, heparinlenmiş enjektörle 10 ml %0.64'lük NaCl çözeltisi enjekte edildi ve damarları yıkandı. Bu işlemi takiben, yine truncus arteriosus içine PBS (Phosphate Buffer Saline) içinde hazırlanmış 25 ml %4'lük paraformaldehit enjekte edildi ve dokuların tespiti sağlandı. Bu işlemden hemen sonra beyin, omurilik ve siyatik sinirler alındı. Beyin 8 mm, omurilik 22 mm, siyatik sinirler ise 53 mm boyutlarındadır.

3.1.2.1. Kurbağa dokularının histolojik takibi

Diseksiyon işleminden sonra dokular, %4'lük paraformaldehit içine koyuldu. Dokular, %4'lük paraformaldehit içinde 4 saat tutularak postfiksasyon yapıldı. Tespit solüsyonunu uzaklaştırmak için dokular, 3 saat boyunca çeşme suyunda yıkandı. Daha sonra dokular, 1 gün %70'lik etil alkolde bekletildi. Bu işlemden sonra dokular, giderek artan etil alkol serilerinden geçirilerek dehidrasyon işlemi yapıldı. Bunun için %80, %90 ve %96'lık etil alkol serileri kullanıldı. Şeffaflandırıcı ajan olarak ksilol kullanıldı. Daha sonra dokular, 65⁰C etüvde ksilol-parafin (1:1 ; V/V) karışımında 1 saat tutuldu. Dokular ara parafinde çalkalandıktan sonra, yine 65⁰C etüvde sıvı parafin içinde 3 saat bekletilerek, parafine alıştırma işlemi yapıldı. Daha sonra dokular, parafin içinde bloklandı ve etiketlendi.

3.1.3. Yengeç Dokularının Alınması

Dokular alınmadan önce yengeçlere, hipotermal anestezi uygulanmıştır. Bunun için yengeçler, içinde buz bulunan akvaryuma aktarılmıştır. Vücut ısıları düşürülmüş ve hareketleri yavaşlatılmış olan yengeçlerden, stereomikroskop altında göz sapı, beyin, torakal gangliyon ve bağırsak dokuları alındı. Beyin 2 mm, göz sapı 3 mm, torakal gangliyon 5 mm, bağırsak doku ise 24 mm boyutlarındadır.

3.1.3.1. Yengeç dokularının histolojik takibi

Diseksiyon ile alınan yengeç dokuları, Bouin's Fiksatifine'ne koyuldu. Taze olarak hazırlanan Bouin's Fiksatifinde, 6 saat boyunca fiksasyon yapıldı. Tespit işleminden sonra dokular, %50'lik alkolde Bouin's fiksatifinden kaynaklanan sarı renk giderilinceye kadar yıkandı ve 24 saat %70'lik alkolde bekletildi. Daha sonra dokular, giderek artan etil alkol serilerinden geçirilerek dehidrasyon işlemi yapıldı. Bunun için %80, %90 ve %96'lık etil alkol serileri kullanıldı. Şeffaflandırıcı ajan olarak ksilol kullanıldı. Bu işlemden sonra dokular, 65⁰C etüvde ksilol-parafin (1:1; V/V) karışımında 1 saat

tutuldu. Dokular, ara parafinde çalkalandıktan sonra yine 65⁰C etüvde sıvı parafin içinde 3 saat bekletilerek, parafine alıştırma işlemi yapıldı. Daha sonra dokular sıvı parafin içinde bloklandı ve etiketlendi.

Bouin's Fiksatif

Pikrik asit : 75 ml

Formaldehit (%40'lık) : 25 ml

Glasiyal asetik asit : 5 ml

3.2. DENEYLERİN YAPILIŞI

Dokuların deney hayvanlarından alınması, tespiti ve parafin blok haline getirilmesi, Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü araştırma laboratuvarında yapılmıştır. Deneylerin, dokulardan kesit alınması ve immünohistokimyasal boyama bölümü ise, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı araştırma laboratuvarında yürütülmüştür.

3.2.1. Dokulardan Kesit Alınması

Parafin bloklar halindeki kurbağa beyin, omurilik ve siyatik sinir dokularından enine ve boyuna olmak üzere Leica marka mikrotomla 4 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Parafin bloklar haline getirilen yengeç göz sapı ve beyin dokularından boyuna, torakal gangliyondan radyal, bağırsak dokusundan ise enine ve boyuna 4 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Bu kesitlerin işlemler sırasında kaybolmamaları için, üzeri adhezif madde sürülmüş polilizin lamalar kullanılmıştır. Dişi ve erkek bireylerin dokularından alınan kesitler ayrı ayrı çalışılmıştır. İmmünohistokimyasal çalışma uygulanırken, her antikor ile yapılan boyamada her doku ve her cinsiyet için 3'er defa tekrar yapılmıştır (n=3).

3.2.2. Morfolojik Çalışma

İmmünohistokimyasal çalışmalara başlamadan önce, kesitlerin morfolojik incelemesi yapılmıştır. Bunun için mikrotomla 4 µm kalınlığında alınan kesitler lamlara yerleştirilmiştir ve hematoksilen-eosin ile boyanmışlardır (hematoksilen %6'lık, eozin %5'lik). Daha sonra bu kesitler incelenerek, immünohistokimya için morfolojik bakımdan uygun olan dokular belirlenmiştir.

3.2.3. Primer Antikor Derişiminin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan antikorlar, rabbit anti lös-enk (USBIO, E3220-10) ve rabbit anti FMRF-amid (USBIO, F5600) olarak belirlenmiştir. Ön çalışmada bu antikorlar, 1/500 ve 1/1000 olarak dilüe edilerek, dokulara ayrı ayrı uygulanmıştır. Yapılan inceleme sonucunda, 1/500 seyreltilmiş rabbit anti lös-enk'in dokuları iyi boyadığı, fakat 1/1000 seyreltilmiş rabbit anti lös-enk'in, sinir dokularında zayıf işaretlemeye neden olduğu gözlemlenmiştir. Rabbit anti FMRF-amid ile yapılan çalışmada ise, 1/1000 seyreltilmiş rabbit anti FMRF-amid'in dokuları iyi boyadığı görülürken 1/500 seyreltilmiş rabbit anti FMRF-amid'in kuvvetli zemin boyanmasına neden olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle çalışmada 1/500 seyreltilmiş rabbit anti lös-enk'in ve 1/1000 seyreltilmiş rabbit anti FMRF-amid'in kullanılmasına karar verilmiştir.

3.2.4. Sekonder Antikor Derişiminin Belirlenmesi

Çalışmada primer antikora bağlanması için, biyotin ile conjuge edilmiş anti rabbit-IgG (Sigma-B 8895) kullanılmıştır. Ön çalışmada, sekonder antikor 1/1250 olarak dilüe edilerek kullanılmıştır. Fakat yapılan inceleme sonucunda, dokularda gözlenen kuvvetli zemin boyanmasının sekonder antikorun konsantr olarak kullanılmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle sekonder antikorun dilüsyonu 1/1600 olarak belirlenmiştir. Bütün antikor dilüsyonları %0,5 BSA (Bovine Serum Albumin) içeren PBS ile hazırlanmıştır.

Doku kesitlerine aşağıdaki immünohistokimya işlemi uygulanmıştır.

- Kesitler ksilolde deparafinize edilir. Havada kurutulur.
- Kesitlere %96, %90, %80'lik alkollerde 3'er dakika rehidrasyon uygulanır.
- Kesitler distile su ile yıkanır.
- Kesitler 0,0109 M sitrat tamponu (pH=6.0) içerisinde mikrodalga fırında kaynayıncaya kadar bekletilir ve daha sonra 30 dakika soğuması beklenir.
- Distile suda 5 dakika bekletilir.
- %3'lük H₂O₂ ile 10 dakika inkübe edilir.
- PBS'de (NaCl: 8,79 gr; KH₂PO₄: 0,274 gr; Na₂HPO₄: 1,135 gr; 1000 ml saf su; 0,01 M; pH=7.4) 3x5 dakika yıkanır. Dokuların etrafı pap-pen ile çizilir.
- Kesitler %2'lik normal keçi serumu (NGS), ile 1 saat inkübe edilir.
- Primer antikor damlatılır. Oda sıcaklığında 1 saat ya da buzdolabında (2-8⁰C) 1 gece bekletilir.
- PBS'de 3x5 dakika yıkanır.
- Sekonder antikor damlatılır. Oda ısısında 1 saat bekletilir.
- PBS'de 3x5 dakika yıkanır.
- Kesitlere streptavidin peroksidaz damlatılır (%0.2'lik proclin). İnkübasyon için 20 dakika beklenir.
- PBS'de 3x5 dakika yıkanır.
- Kromojen damlatılır. Kromojen olarak DAB (0,9mg DAB/1 ml sübstrat) kullanılmıştır.
- Distile su ile 3-5 dakika yıkanır.
- Hematoksilen ile 5 saniye zıt boyama yapılır.
- eşme suyunda yıkanır.
- Kesitler %80, %90, %96'lık alkollerden geçirilerek dehidrasyon yapılır. Havada kurutulur.
- Kesitler ksilol içine alınır.
- Kesitler entellan ile kapatılır.

3.2.5. İmmünohistokimyasal Uygulama

Yapılan bütün işaretlemelemlerde, indirekt immünohistokimya yöntemi uygulanmıştır. Kromojen olarak DAB (diaminobenzidin) kullanıldığı için, kesitlerde immünopozitif boyanan hücreler kahverengi, negatif boyanan hücreler hematoksilenden dolayı soluk mavi, mor renkli görülmüştür. Kesitlerde, sadece DAB ve hematoksilen ile boyanan hücreler sayılmıştır, boyanmayan hücreler dikkate alınmamıştır.

3.2.6. Negatif Kontrol

Kurbağa ve yengeç dokularına, ayrı ayrı negatif kontrol uygulanmıştır. Negatif kontrol uygulanan dokulara, primer antikor yerine BSA'lı PBS (%0,5) damlatılmıştır ve inkübasyona bırakılmıştır. Diğer bütün işlemler, immünohistokimya prosedürüne uygun olarak yapılmıştır. Primer ve sekonder antikor, streptavidin peroksidaz, NGS ve DAB kesit başına 40 µl uygulanmıştır.

3.3. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRMELER

Verilerin normal dağılıma uygunluk göstermesi amacıyla, % immünopozitiflik oranlarına karekök transformasyonu uygulanmıştır. Verilerin analizi, Statistica v.6.0.1 ve SPSS v.11.5.1 paket programları kullanılarak yapılmıştır. Eşey, kesit ve peptit faktörleri arasındaki farklılığı incelemek amacıyla, Faktöriyel Varyans Analizi testi yapılmıştır. Birbirine bağımlı dokular ile eşey, kesit ve peptit faktörleri arasındaki farklılığın incelenmesi amacıyla ise, Tekrarlanan Ölçümlü Varyans Analizi testi uygulanmıştır. Varyans analizi sonucunda anlamlı bulunan farklılıklara ilişkin alt grupların belirlenmesinde ise, Tukey HSD post hoc testinden yararlanılmıştır. Verilere ilişkin tanımlayıcı istatistikler, ortalama \pm standart sapma cinsinden tablo halinde verilmiştir. İstatistiksel analizlerde, $P < 0.05$ ise sonuç, anlamlı kabul edilmiş olup $P < 0.01$ ve $P < 0.001$ düzeyindeki ayrımlar da değerlendirilmiştir (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$).

4. BULGULAR ve TARTIŞMASI

4.1. KURBAĞA VE YENGEÇ DOKULARINDAKİ LÖS-ENK İLE FMRF-AMİD'İN LOKALİZASYONLARI

R. ridibunda'nın beyin, omurilik ve siyatik sinir dokularından enine ve boyuna kesit alınarak immünohistokimyasal işaretleme yapılmıştır. Beyin dokusunun, boyuna kesitinde ön beyin, orta beyin ve arka beyin, enine kesitinde arka beyin çalışılmıştır. Omurilik dokusunun, boyuna kesitinde boyun, göğüs, bel ve kuyruk sokumu alanlarındaki, enine kesitinde göğüs alanındaki ön boynuz, arka boynuz ve merkezi kanal bölümleri anti lös-enk ve anti FMRF-amid ile işaretlenmiştir.

C. sapidus'un beyin dokusundan boyuna, torakal gangliyon dokusundan ise radyal kesit alınarak immünohistokimyasal boyama yapılmıştır. Göz sapı dokusu boyuna kesitinde LG, ME, MI, MT ve ON kısımlarına anti lös-enk ve anti FMRF-amid antikoları ile boyama yapılmıştır. Bağırsak dokusundan enine ve boyuna kesit alınarak antikolar ile işaretleme yapılmıştır.

Kurbağa ve yengecin bütün doku kesitlerinden 3 tekrar yapılmış ve bu kesitlerdeki immünopozitif ve immünonegatif boyanan hücreler sayılarak ortalamaları hesaplanmıştır. Buna göre, immünohistokimyasal işaretleme sonucunda lös-enk *R. ridibunda* erkek siyatik sinirinde %97 ile en yüksek düzeyde immünopozitiflik gösterirken, %77 ile *C. sapidus* erkek bağırsak dokusunda en düşük immünopozitif reaktivite göstermiştir. FMRF-amid ise *R. ridibunda* dışı beyin ve omurilik, erkek ve dışı siyatik sinirde %96 ile en yüksek immünopozitif reaktivite gösterirken, *C. sapidus* erkek bağırsak dokusunda %91 ile en düşük düzeyde immünopozitiflik göstermiştir.

Lös-enk ve FMRF-amid kurbağa beyin ve omurilik dokusunda büyük motor sinirlerin hücre gövdelerinde yoğun olarak biriktiği, nükleusların ise işaretlenmediği gözlemlenmiştir. Kurbağa beyin dokusundaki sinir hücreleri, ventriküllerin etrafını

döşeyen ependimal hücreler ve glial hücrelerin immünopozitif olarak boyandıkları görülmüştür. Kurbağa omuriliği ventral boynuzunda bulunan büyük motor nöronların perikaryonları, akson ve dentritleri, dorsal boynuzdaki afferent nöron aksonları, merkezi kanalı döşeyen ependimal hücreler, gri cevher ve beyaz cevherdeki glial hücrelerin immünopozitif olarak işaretlendikleri gözlenmiştir. Kurbağa siyatik sinirinde ise sinir fiberlerinin aksoplazmalarının tamamına yakını boyanırken, fibroblast ve Schwann hücrelerinin çok az bir kısmı boyanmıştır.

Lös-enk ve FMRF-amid yengeçlerin beyin ve torakal gangliyon dokusunda sinir hücre gövdelerinde ve nöropilde iyi boyandığı gözlemlenmiştir. Yengeçlerin göz sapı dokusu elemanları olan LG, ME, MI, MT ve ON kısımlarında yer alan nöronlar, retinal pigment alanlarında, 1. kiyazma, 2. kiyazma ve 3. kiyazmatik alanda immünopozitif işaretleme görülmüştür. Yengeçlerin bağırsak dokusunda ise epitelyumu oluşturan hücrelerin lumeninde immünopozitif işaretleme görülürken, epitelyumu saran bağ doku ve kas tabakasında zayıf bir immünopozitif işaretleme görülmüştür. Bağırsak dokunun hem lös-enk hem de FMRF-amid bakımından, çalışılan diğer dokulara göre daha zayıf işaretlendiği bulunmuştur. Şematik doku çizimlerdeki simgeler, peptitlerin dokularda bulunma oranı göz önüne alınarak kullanılmıştır.

4.1.1. *R. ridibunda* Beyin Dokusu Sagital Kesitte Lös-Enk ve FMRF-amid'in Lokalizasyonları

Beyin dokusu, sagital kesitte ön beyin, orta beyin ve arka beyin olmak üzere 3 bölümde incelenmiştir. Bütün beyin bölgeleri, hem lös-enk hem de FMRF-amid bakımından yüksek oranda immünopozitiflik göstermiştir. Çalışılan 3 tekrarın ortalaması alındığı zaman, erkek kurbağa beyin dokusunun sagital kesitinde boyanan hücrelerden, 11755 lös-enk bakımından pozitif, 710 immünonegatif, dişilerde 9582 pozitif, 563 negatif hücre bulunmuştur. FMRF-amid bakımından ise, erkeklerde 3 tekrarın ortalaması alındığında, boyanan hücrelerden 8848 pozitif, 371 negatif, dişilerde 13142 pozitif, 570 negatif hücre tespit edilmiştir. Buna göre, lös-enk ön beyin ve orta

beyinde hem erkek, hem de dişi kurbağalarda %94 oranında immünopozitiflik göstermektedir. Arka beyinde ise yine erkek ve dişi kurbağalarda %93 oranında immünopozitiflik meydana getirmiştir. FMRF-amid ise, ön beyin ve arka beyinde erkek ve dişi kurbağalarda %95 oranında immünopozitiflik göstermiştir. Orta beyinde ise, erkek kurbağalarda bu oran %96 iken, dişilerde %95 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. *R. ridibunda* beyin dokusu boyuna kesitinde % immünopozitif değerleri

Peptit		Lös-enk		FMRF-amid	
		$\bar{X} \pm S_x$	•	$\bar{X} \pm S_x$	•
Erkek (n=3)	Ön beyin	94,29 ± 0,0075	Aax	95,88 ± 0,0026	Aax
	Orta beyin	94,83 ± 0,0027	Aax	96,10 ± 0,0024	Aax
	Arka beyin	93,76 ± 0,0225	Aax	95,97 ± 0,0012	Aax
Dişi (n=3)	Ön beyin	94,85 ± 0,0087	Aax	95,49 ± 0,0055	Aax
	Orta beyin	94,72 ± 0,0101	Aax	95,92 ± 0,0037	Aax
	Arka beyin	93,92 ± 0,0111	Aax	95,98 ± 0,0014	Aax
Kurbağa (n=18)	Beyin	95,25 ± 0,0184	Aax	96,55 ± 0,0108	Aay

$\bar{X} \pm S_x$ = Aritmetik ortalama ± standart sapma.

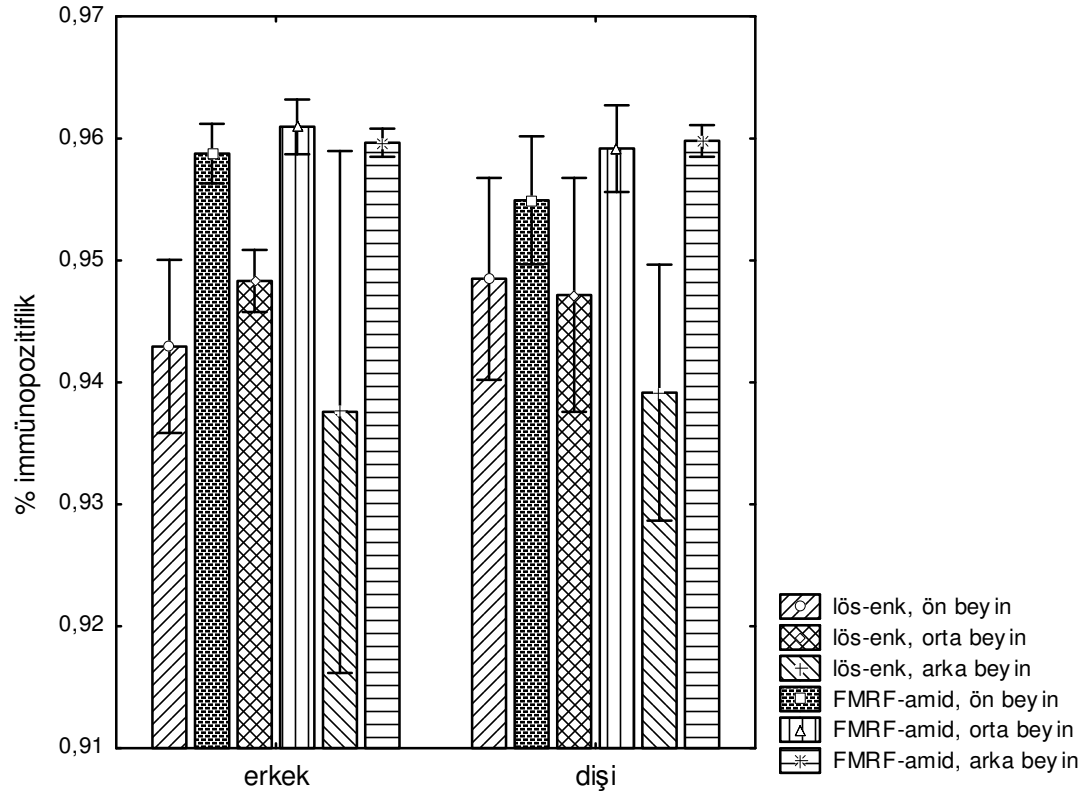
• = Tukey HSD Post Hoc Test; A eşeyler, a dokular; x ve y peptitler arası ayrımı belirtmek için kullanılmıştır.

Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P < 0.01$ düzeyinde ayırım vardır.

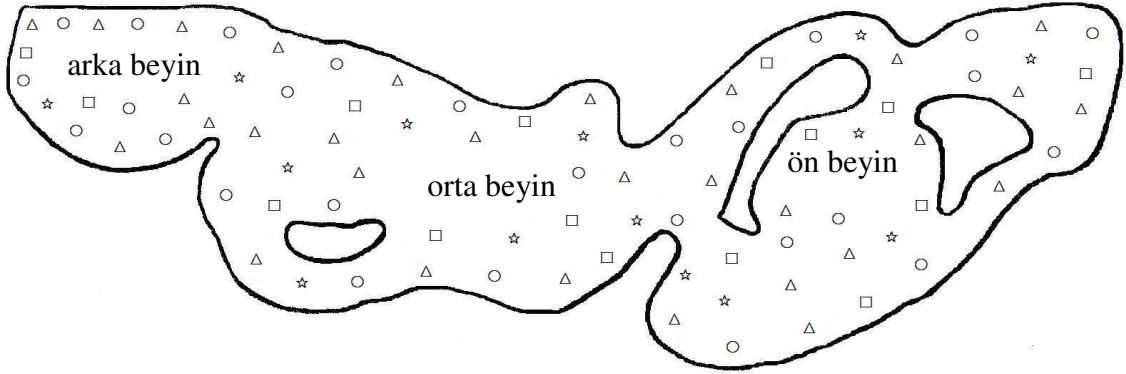
Kurbağa beyin dokusunun, 3 beyin bölgesinden alınan değerlerin tekrarlanan ölçümlü varyans analizi sonucuna göre doku-eşey-peptit etkileşimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,783$). İkili etkileşimler incelendiği zaman, doku-peptit ($p=0,283$), doku-eşey ($p=0,924$) ve eşey-peptit ($p=0,574$) etkileşimleri de anlamlı bulunmamıştır. Aynı zamanda ön beyin, orta beyin ve arka beyin arasında lös-enk ve FMRF-amid'in immünopozitifliği bakımından fark bulunmamıştır ($p=0,378$). Benzer

şekilde, eşeyler arasında da immünopozitiflik oranları farkı anlamlı değildir ($p=0,977$). Bununla beraber, eşey ve doku farkı gözetmeden sadece peptite dayalı yapılan analize göre, FMRF-amid'in immünopozitiflik oranı lös-enk'e göre istatistiksel açıdan önemli biçimde fazla bulunmuştur ($p=0,002^{**}$). Bu sonuçlara göre, kurbağanın beyin dokusunda immünopozitifliğin eşeye bağlı olarak değişmediği, ön beyin, orta beyin ve arka beyin arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür. Lös-enk ve FMRF-amid'in beyin dokusunda, yüksek düzeyde immünopozitiflik göstermesi bu peptitlerin beyin dokusu sinir hücrelerinde ve endodimal hücrelerde sentezlendiğine ve paketlenmesine işaret etmektedir (Şekil 4.1, 4.2, 4.3). Doku ve eşey farkı gözetmeden, sadece peptite dayalı yapılan analize ise, FMRF-amid'in beyin dokusunda lös-enk'e göre önemli biçimde daha immünopozitif olması, FMRF-amid'in beyin dokusunda daha fazla sentezlendiğini göstermektedir [19, 20, 23, 46,].

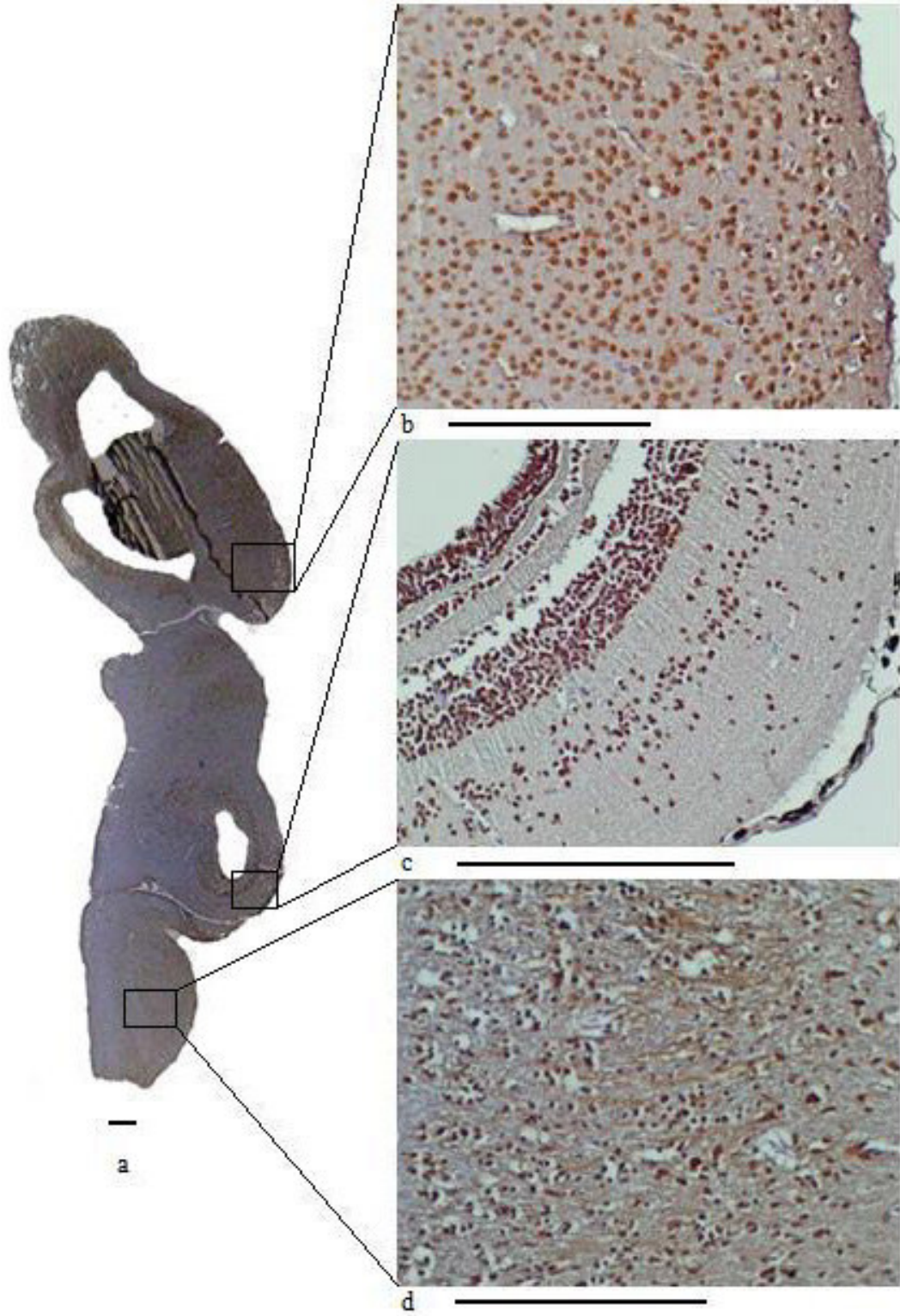
Kozicz ve Lazar [20], *R. esculenta* orta beyininin, optik ventrikül ve optik ventrikülün endodimal hücrelerinde met-enk lokalizasyonunu yapmışlardır. Diğer bir araştırma grubu tarafından, *X. laevis* ön beyininde FMRF-amid lokalize edilmiştir [23]. Ayrıca, Lazar [46], kurbağa, balık ve sürüngen sinir sistemlerinde lös-enk ve FMRF-amid lokalizasyonlarını gösteren derleme çalışması yapmıştır. Bu araştırmacının belirttiğine göre, kurbağalarda Pinelli ve ark. (1999), *R. esculenta*, *Pipa pipa*, *T. carciflex*, *T. vulgaris* ve *C. ornata* beyini enine kesitlerinde büyük beyin, ara beyin ve orta beyinde, FMRF-amid bakımından zengin nöronlar bulmuşlardır. Aynı araştırmacının belirttiğine göre, Kuljis ve Katren (1982) *R. pipiens*, Merchenthaler ve ark. (1989) *R. esculenta* ve *L. moorei* beyini enine kesitlerinde, büyük beyin ve orta beyinde lös-enk'i lokalize etmişlerdir.



Şekil 4.1. Lös-enk ve FMRF-amid'in *R. ridibunda* beyin dokusu sagital kesitindeki lokalizasyonları.



Şekil 4.2. Lös-enk ve FMRF-amid'in *R. ridibunda* beyin dokusu sagital kesitindeki şematik lokalizasyonları; □: Lös-enk erkek, ☆: Lös-enk dişi, Δ: FMRF-amid erkek, ○: FMRF-amid dişi.



Şekil 4.3. Lös-enk'in *R. ridibunda* beyin dokusu sagital kesitindeki immünopozitifliği. a) Genel görünüm, b) Ön beyin, c) Orta beyin, d) Arka beyin (Skala 200 μ m).

4.1.2. *R. ridibunda* Beyin Dokusu Enine Kesitte Lös-Enk ve FMRF-amid'in Lokalizasyonları

Beyin dokusu enine kesitte arka beyin bölümü incelenmiştir. Kurbağa erkek arka beyin enine kesitinde, boyanan hücrelerden 3344 lös-enk bakımından pozitif, 299 negatif, dişilerde 4546 pozitif, 294 negatif hücre tespit edilmiştir. FMRF-amid bakımından ise, erkeklerde 3201 pozitif, 158 negatif, dişilerde 5059 pozitif 214 negatif hücre bulunmuştur. Bu verilere göre, lös-enk erkek bireylerde %91 immünopozitif aktivite gösterirken, dişi bireylerde % 93 oranında aktivite göstermiştir. FMRFamid ise her iki eşeyde %95 oranında aktivite meydana getirmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. *R. ridibunda* arka beyin dokusu enine kesitinde % immünopozitif değerleri

Eşey (n=3)	Peptit	Lös-enk	FMRF-amid
		$\bar{X} \pm S_x$ •	$\bar{X} \pm S_x$ •
Erkek		91,80 ± 0,0204 Ax	95,28 ± 0,0024 Ay
Dişi		95,80 ± 0,0063 Bx	93,86 ± 0,0060 Ax

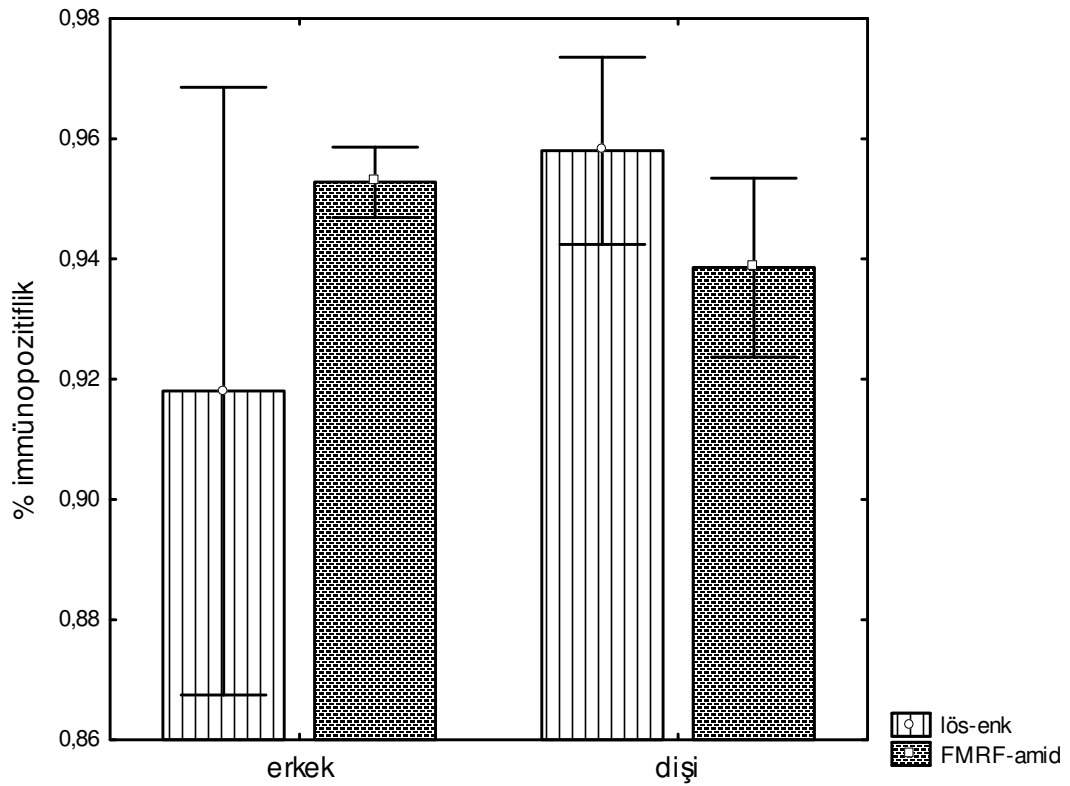
$\bar{X} \pm S_x$ = Aritmetik ortalama ± standart sapma.

• = Tukey HSD Post Hoc Test; A ve B eşeyler; x ve y peptitler arası ayrımı belirtmek için kullanılmıştır.

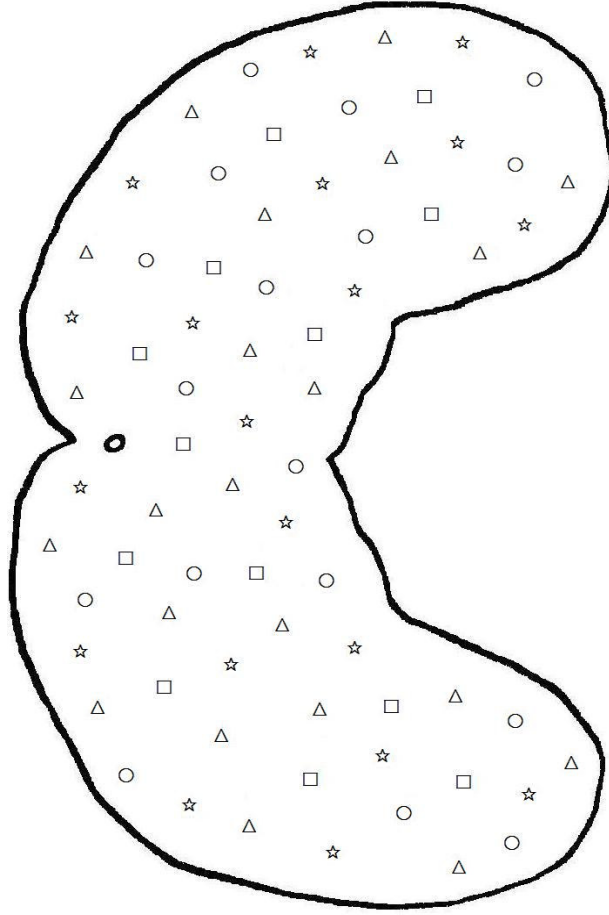
Farklı harflerle gösterilen verilerde peptitler arasında $P < 0.05$, eşeyler arasında ise, $p < 0.01$ düzeyinde ayırım vardır.

Kurbağa arka beyin dokusu, eşey-peptit etkileşimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,003^{**}$). Eşey-peptit etkileşimine ait post-hoc test sonucuna göre, erkek kurbağa arka beyin dokusunda, FMRF-amid'in immünoreaktivitesi lös-enk'den anlamlı biçimde fazla bulunmuştur ($p=0,021^*$). Bununla beraber, dişi kurbağaların arka beyin dokusunda, lös-enk ile FMRF-amid arasında anlamlı fark görülmemiştir ($p=0,226$). Dişi kurbağaların, arka beyin dokusunda lös-enk'in immünopozitiflik oranı, anlamlı biçimde erkeklerden fazla bulunmuştur ($p=0,01^{**}$). Bununla beraber, kurbağa

arka beyin dokusunda, eşeyler arasında FMRF-amid bakımından, anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,454$). Lös-enk ve FMRF-amid'in kurbağa arka beyininde lokalizasyonlarının bulunması, bu peptitlerin arka beyinde fizyolojik rolünün olduğunu göstermektedir (Şekil 4.4, 4.5, 4.6). Negatif kontrolde ise, spesifik bir işaretlemeye rastlanmamıştır (Şekil 4.7). Erkek kurbağa arka beyininde, FMRF-amid'in lös-enk'e göre istatistiksel olarak önemli bir şekilde immünoaktivite göstermesi, FMRF-amid nöronlarının arka beyinde, daha fazla bulunduğuna işaret etmektedir [23, 55]. Lös-enk'in eşeyler arasında karşılaştırılması ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bununla beraber, lös-enk'in dişi kurbağa arka beyin dokusunda erkeklerden daha fazla bulunmasının, eşeysel farklılıklardan kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

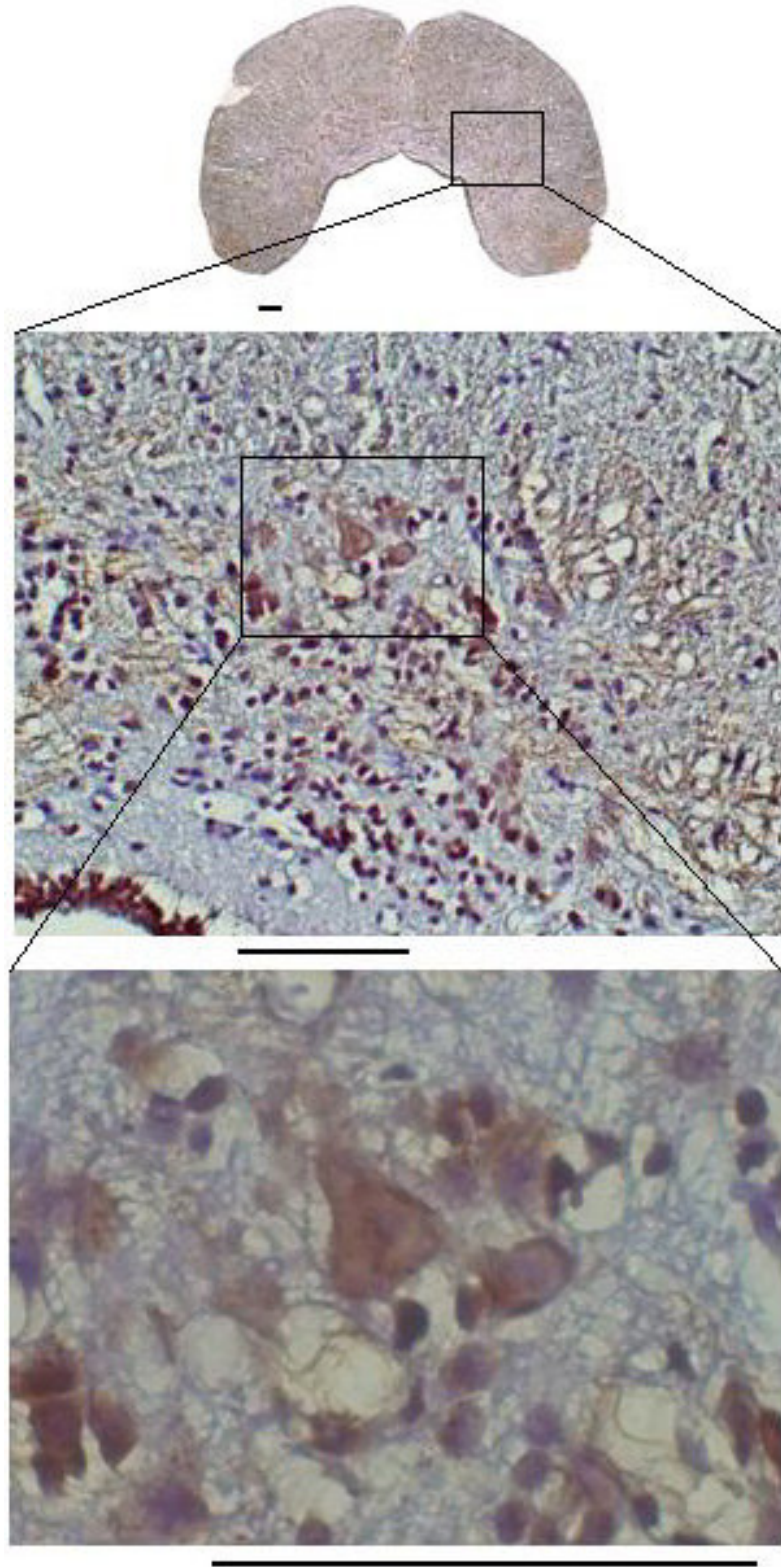


Şekil 4.4. Lös-enk ve FMRF-amid'in *R. ridibunda* arka beyin dokusu enine kesitindeki lokalizasyonları.

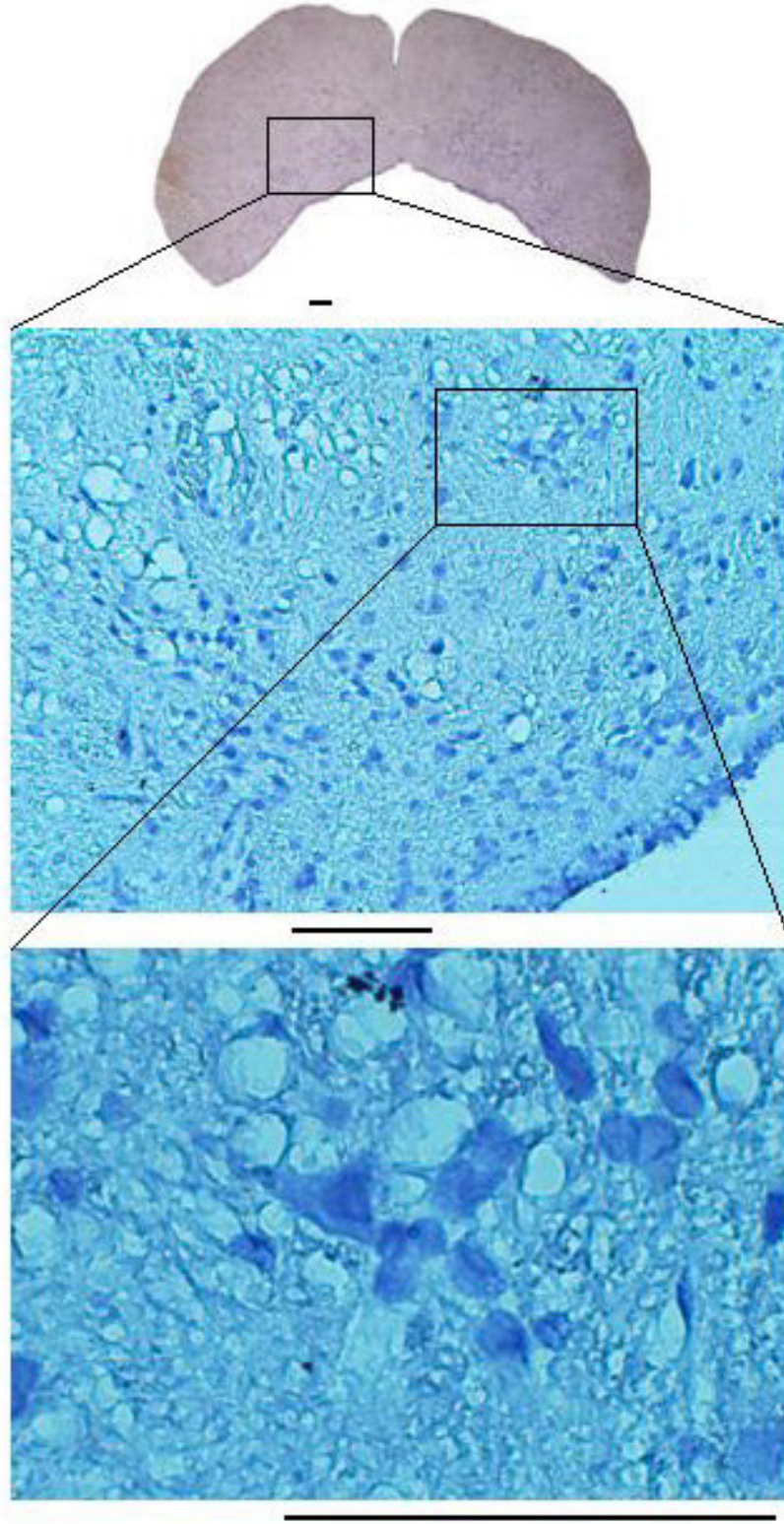


Şekil 4.5. Löss-enk ve FMRF-amid'in *R. ridibunda* arka beyin dokusu enine kesitindeki şematik lokalizasyonları; □: Löss-enk erkek, ☆: Löss-enk dişi, Δ: FMRF-amid erkek, ○: FMRF-amid dişi.

Kozicz ve Lazar [20], *R. esculenta* orta beyininin, optik ventrikül ve optik ventrikülün endodimal hücrelerinde met-enk lokalizasyonunu yapmışlardır. Diğer bir araştırma grubu tarafından, *R. esculenta*'nın beyin ve hipofizinde FMRF-amid lokalizasyonu yapılmıştır [19]. Bu araştırmacılar, larval dönem ile ergin erkek ve dişi *R. esculenta* ön beyini, orta beyini ve arka beyini olmak üzere beyinin bütün bölgelerinde FMRF-amid lokalizasyonunu bulmuşlardır.



Şekil 4.6. FMRF-amid'in *R. ridibunda* arka beyin dokusu enine kesitindeki immünopozitifliği (Skala 100 μ m).



Şekil 4.7. *R. ridibunda* arka beyin dokusu enine kesitinde negatif kontrol (Skala 100 μm).

4.1.3. *R. ridibunda* Omurilik Boyuna Kesitte Lös-Enk ve FMRF-amid'in Lokalizasyonları

Omurilik dokusu boyuna kesitte, proksimalden distale doğru boyun, göğüs, bel ve kuyruk sokumu bölümü olmak üzere 4 bölge araştırılmıştır. Kurbağa erkek omurilik dokusu boyuna kesitinde, boyanan hücrelerden 9548 lös-enk bakımından pozitif, 706 negatif, dişilerde 10079 pozitif, 967 negatif hücre tespit edilmiştir. FMRF-amid bakımından ise, erkeklerde boyanan hücrelerden 12136 pozitif, 710 negatif, dişilerde 12898 pozitif, 707 negatif hücre bulunmuştur. Buna sonuçlara göre, lös-enk erkeklerde boyun bölgesinde %93, göğüs, bel ve kuyruk sokumu bölgelerinde %92 immüno pozitiflik göstermiştir. Dişilerde ise boyun bölgesinde %92, göğüs bölgesinde %91, bel bölgesinde %90 ve kuyruk sokumu bölgesinde %88 immüno pozitiflik meydana getirmiştir. FMRF-amid erkeklerde 4 omurilik bölgesinde de %94 immüno pozitiflik gösterirken dişilerde ise bu oran, boyun ve kuyruk sokumu bölgelerinde %95, göğüs ve bel bölgelerinde ise, %94 olmuştur (Çizelge 4.3). Kurbağa omurilik dokusu boyuna kesitinde 4 bölgeden alınan ölçümlerin tekrarlanan analiz sonucuna göre, doku-eşey-peptit etkileşimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,339$). İkili etkileşimler incelendiğinde, doku-peptit ($p=0,100$), doku-eşey ($p=0,907$) ve eşey-peptit ($p=0,115$) etkileşimleri de anlamlı bulunmamıştır. Omuriliğin boyun, göğüs, bel ve kuyruk sokumu bölgeleri arasında, lös-enk ve FMRF-amid'in immüno pozitifliği bakımından bir fark bulunmamıştır ($p=0,057$). Benzer şekilde, eşeyler arasında da immüno pozitiflik oranları anlamlı değildir ($p=0,317$). Bununla beraber, eşey ve doku farkı gözetmeden, sadece peptit dikkate alınarak yapılan analiz sonucuna göre, FMRF-amid'in immüno reaktivitesi lös-enk'den anlamlı biçimde fazla bulunmuştur ($p=0,003^{**}$). Bu sonuçlara göre kurbağanın omurilik dokusunda lös-enk ve FMRF-amid'in immüno reaktivitesinin eşeye bağlı olarak değişmediği boyun, göğüs, bel ve kuyruk sokumu bölgeleri arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür. Lös-enk ve FMRF-amid'in, omurilik dokusunda yüksek düzeyde immüno pozitiflik göstermesi, bu peptitlerin omuriliğin sinir hücrelerinde ve bazı nöroglia hücrelerinde fizyolojik rolünün olduğunu göstermektedir (Şekil 4.8, 4.9, 4.10).

Doku ve eşey farkı gözetmeden, sadece peptite dayalı yapılan omurilik dokusu analizinde ise, FMRF-amid'in lös-enk'e göre önemli biçimde daha immünopozitif olması, FMRF-amid'in fizyolojik rolünün daha fazla olduğuna işaret etmektedir [26, 42, 56, 57].

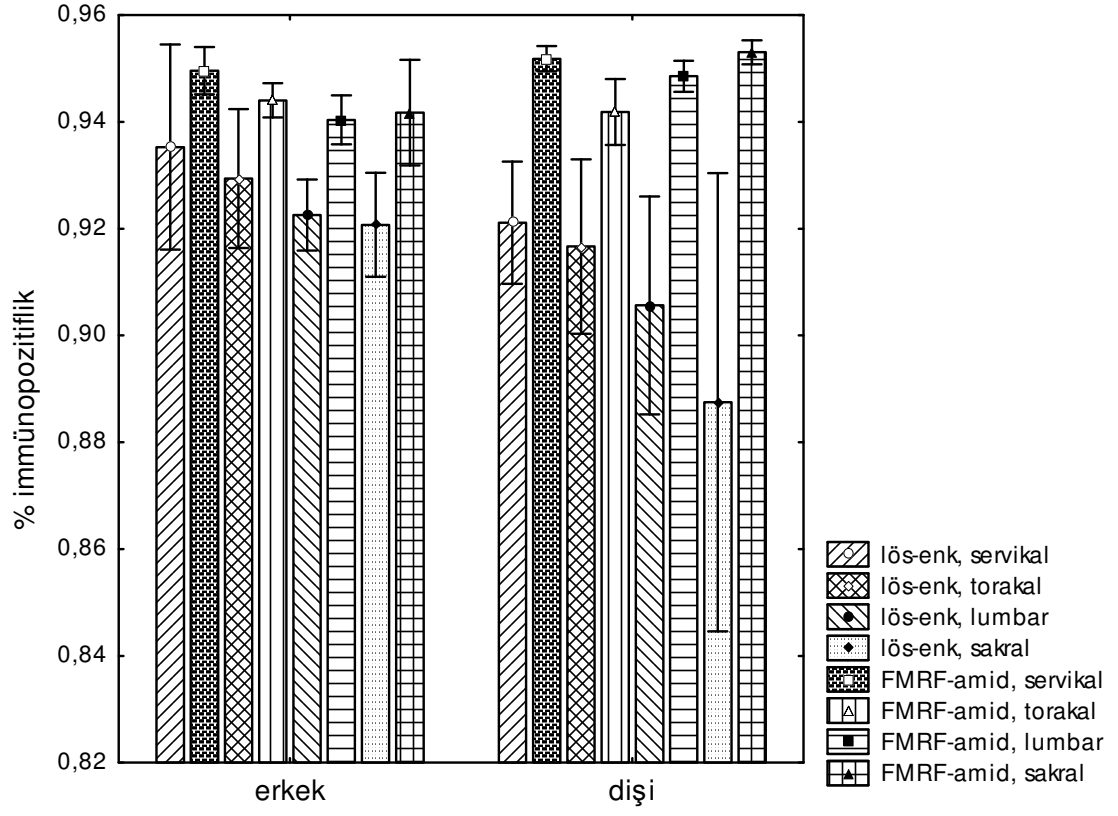
Çizelge 4.3. *R. ridibunda* omuriliği boyunca kesitinde % immünopozitif değerleri

Peptit		Lös-enk		FMRF-amid	
		$\bar{X} \pm S_x$	•	$\bar{X} \pm S_x$	•
Erkek (n=3)	Servikal	93,53 ± 0.0203	Aax	94,96 ± 0.0047	Aax
	Torakal	92,94 ± 0.0137	Aax	94,40 ± 0.0034	Aax
	Lumbar	92,25 ± 0.0070	Aax	94,04 ± 0.0048	Aax
	Sakral	92,07 ± 0.0103	Aax	94,17 ± 0.0104	Aax
Dişi (n=3)	Servikal	92,11 ± 0.0120	Aax	95,18 ± 0.0025	Aax
	Torakal	91,67 ± 0.0172	Aax	94,18 ± 0.0065	Aax
	Lumbar	90,56 ± 0.0215	Aax	94,85 ± 0.0031	Aax
	Sakral	88,75 ± 0.0452	Aax	95,30 ± 0.0024	Aax
Kurbağa (n=24)	Omurilik	91,74 ± 0.0229	Aax	94,64 ± 0.0065	Aay

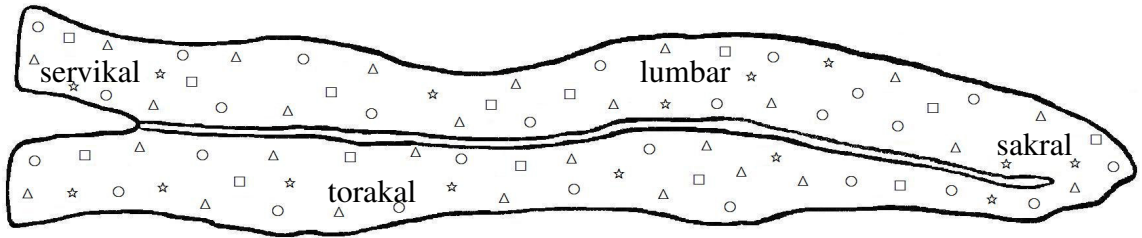
$\bar{X} \pm S_x$ = Aritmetik ortalama ± standart sapma.

• = Tukey HSD Post Hoc Test; A eşyler, a dokular, x ve y peptitler arası ayrımı belirtmek için kullanılmıştır.

Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0.01 düzeyinde ayırım vardır.

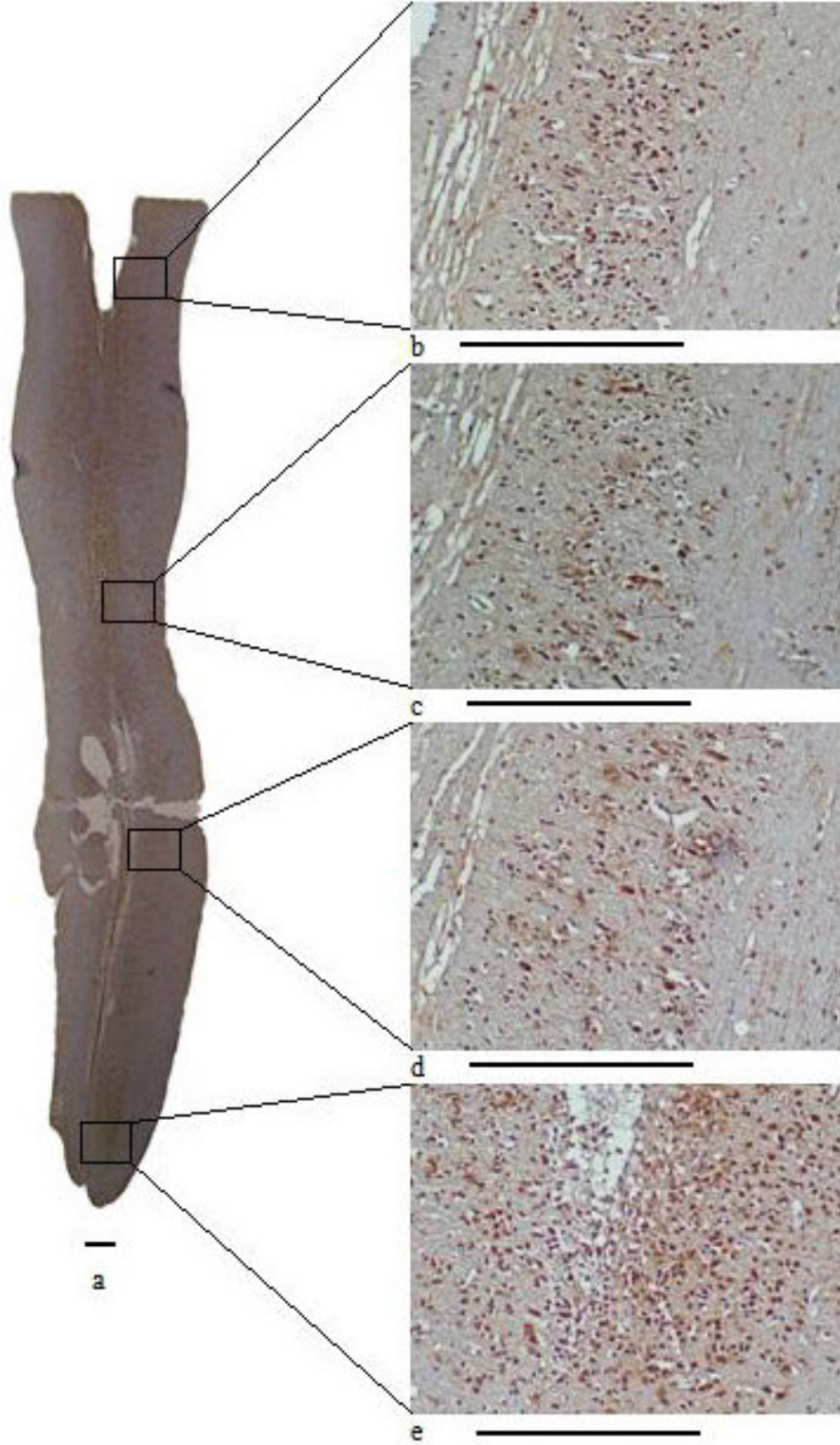


Şekil 4.8. L6s-enk ve FMRF-amid'in *R. ridibunda* omuriliği boyunca kesitindeki lokalizasyonları.



Şekil 4.9. L6s-enk ve FMRF-amid'in *R. ridibunda* omuriliği boyunca kesitindeki şematik lokalizasyonları; □: L6s-enk erkek, ☆: L6s-enk dişi, Δ: FMRF-amid erkek, ○: FMRF-amid dişi.

Hajek ve ark. [43], *R. temporaria* omuriliğinde enkefalinergic sistemin varlığını bulmuşlardır. Diğer bir çalışma grubu tarafından, Sprague/Dawley erkek rat omuriliği servikal bölgesinde met-enk ve delta opioid reseptörü (DOR) lokalize edilmiştir [51]. Bu araştırmacılar, ışık ve elektron mikroskobu kullandıkları çalışmalarında, omuriliğin arka boynuzunda %66 oranında met-enk ve %23 oranında DOR bulunduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca Ferrarese ve ark. [56], Sprague/Dawley ratlarının omuriliğinde FMRF-amid varlığını göstermişlerdir. Bu araştırmacılar tarafından, omuriliğin, lumbo-sakral bölgesinde ve özellikle dorsal boynuzda, FMRF-amid bakımından zengin sinir hücreleri bulunmuştur. Aynı araştırmacılar tarafından, omuriliğin, orta torakal alandan kesildiği zaman, lumbar bölgedeki FMRF-amid miktarının %20 ile 50 arasında azalmasına rağmen, lumbo-sakral bölgeden kesildiği zaman, lumbar alandaki FMRF-amid miktarının %50 oranında azaldığı bulunmuştur. Bu araştırmacılar göre, FMRF-amid'in bir kısmı, daha aşağıda bulunan siyatik sinirden ve sinir gangliyonlarından kaynaklanmaktadır. Başka bir araştırma grubu tarafından, ratların beyin, omurilik ve hipofizinde FMRF-amid lokalize edilmiştir [57]. Bu araştırmacılar, beyinin yanı sıra, beyin sapı, omuriliğin dorsal ve ventral boynuz bölgeleri ile, hipofizin nöral lob bölgelerinde, FMRF-amid'in lokalize olduğunu gözlemlemişlerdir.



Şekil 4.10. Lös-enk'in *R. ridibunda* omuriliği boyuna kesitindeki immünopozitifliği. a) Genel görünüm, b) Servikal, c) Torakal, d) Lumbar, e) Sakral (Skala 300 µm).

4.1.4. *R. ridibunda* Omurilik Enine Kesitte Lös-Enk ve FMRF-amid'in Lokalizasyonları

Omurilik enine kesiti göğüs bölgesinden alınmıştır. Enine kesitte ön boynuz, arka boynuz ve merkezi kanal çalışılmıştır. Kurbağa erkek omurilik dokusu, enine kesitinde boyanan hücrelerden, 2600 lös-enk bakımından pozitif, 294 negatif, dişilerde 2678 pozitif, 263 negatif hücre tespit edilmiştir. FMRF-amid bakımından ise, erkeklerde boyanan hücrelerden 3364 pozitif, 160 negatif, dişilerde 4482 pozitif 188 negatif hücre bulunmuştur. Buna göre, lös-enk erkeklerde ön boynuz ve merkezi kanalda %89, arka boynuzda %90 aktivite gösterirken dişilerde ön boynuzda %90, arka boynuzda %88, merkezi kanalda ise %92 aktivite göstermiştir. FMRF-amid ise, erkeklerde her 3 bölgede de %95, dişilerde ön ve arka boynuzda %96, merkezi kanalda %95 immünopozitiflik göstermiştir (Çizelge 4.4). Kurbağa omurilik dokusu, enine kesitte ön boynuz, arka boynuz ve merkezi kanal bölgelerinden alınan ölçümlerin, tekrarlanan ölçümlü varyans analizi sonucuna göre, doku-eşey-peptit etkileşimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,145$). İkili etkileşimler incelendiği zaman ise, doku-peptit ($p=0,228$), doku-eşey ($p=0,401$) ve eşey-peptit ($p=0,897$) etkileşimleri de anlamlı bulunmamıştır. Omuriliğin ön boynuz, arka boynuz ve merkezi kanal bölgeleri arasında, lös-enk ve FMRF-amid'in immünopozitifliği bakımından fark bulunmamıştır ($p=0,672$). Benzer şekilde, eşeyler arasında da immünopozitiflik oranları anlamlı değildir ($p=0,616$). Bununla beraber, eşey ve doku farkı gözetmeden, sadece peptite dayalı yapılan analize göre, FMRF-amid'in immünopozitiflik oranı, anlamlı biçimde lös-enk'den fazla bulunmuştur ($p=0,003^{**}$). Bu sonuçlara göre, kurbağanın omurilik dokusu göğüs bölgesinde immünopozitifliğin, eşeye bağlı olarak değişmediği ön boynuz, arka boynuz ve merkezi kanal bölgeleri arasındaki farklılıkların da, istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edilmiştir. Lös-enk ve FMRF-amid'in, omurilik göğüs bölgesinde yüksek miktarda immünopozitiflik göstermesi, bu peptitlerin omurilikte nöromodulatör role sahip olduğunu ortaya koymaktadır (Şekil 4.11, 4.12, 4.13). Negatif kontrolde ise, herhangi bir spesifik işaretleme meydana gelmemiştir (Şekil 4.14). Doku ve eşey farkı gözetmeden, sadece peptite dayalı yapılan analizde ise,

omurilik göğüs bölgesinde FMRF-amid'in, lös-enk'e göre önemli biçimde daha immüno pozitif olması, FMRF-amid'in daha fazla nöronal aktiviteye sahip olduğuna işaret etmektedir [25, 26, 55, 56, 57].

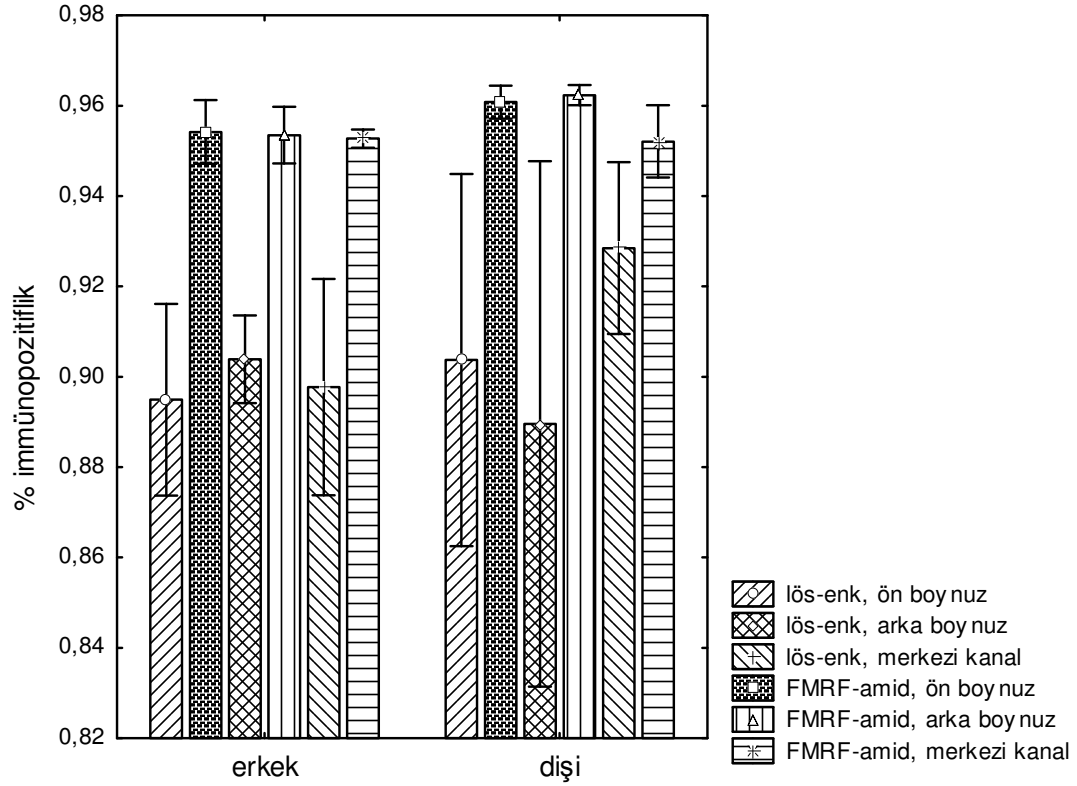
Çizelge 4.4. *R. ridibunda* omuriliği torakal bölge enine kesitinde % immüno pozitif değerleri

Peptit		Lös-enk		FMRF-amid	
		$\bar{X} \pm S_x$	•	$\bar{X} \pm S_x$	•
Erkek (n=3)	Ön boynuz	89,49 ± 0.0223	Aax	95,42 ± 0.0075	Aax
	Arka boynuz	90,38 ± 0.0102	Aax	95,35 ± 0.0066	Aax
	Merkezi kanal	89,77 ± 0.0252	Aax	95,27 ± 0.0021	Aax
Dişi (n=3)	Ön boynuz	90,37 ± 0.0434	Aax	96,08 ± 0.0038	Aax
	Arka boynuz	88,96 ± 0.0612	Aax	96,23 ± 0.0024	Aax
	Merkezi kanal	92,85 ± 0.0200	Aax	95,21 ± 0.0085	Aax
Kurbağa (n=18)	Omurilik	90,30 ± 0.0319	Aax	95,59 ± 0.0064	Aay

$\bar{X} \pm S_x$ = Aritmetik ortalama ± standart sapma.

• = Tukey HSD Post Hoc Test; A eşeyler, a dokular, x ve y peptitler arası ayrımı belirtmek için kullanılmıştır.

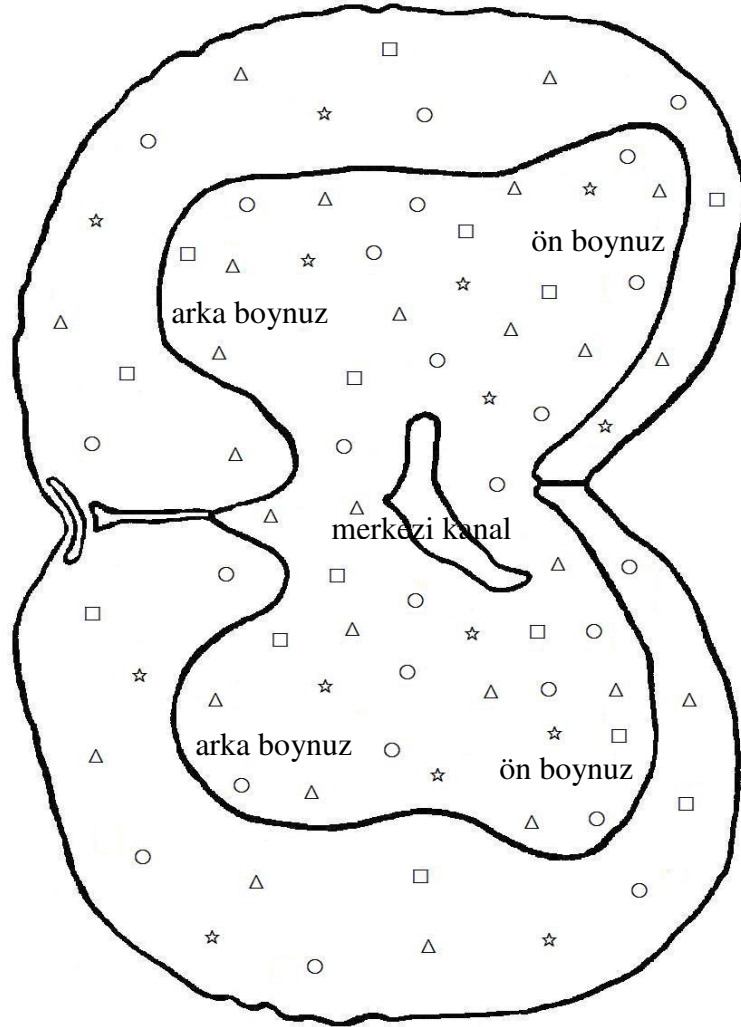
Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P < 0.01$ düzeyinde ayrım vardır.



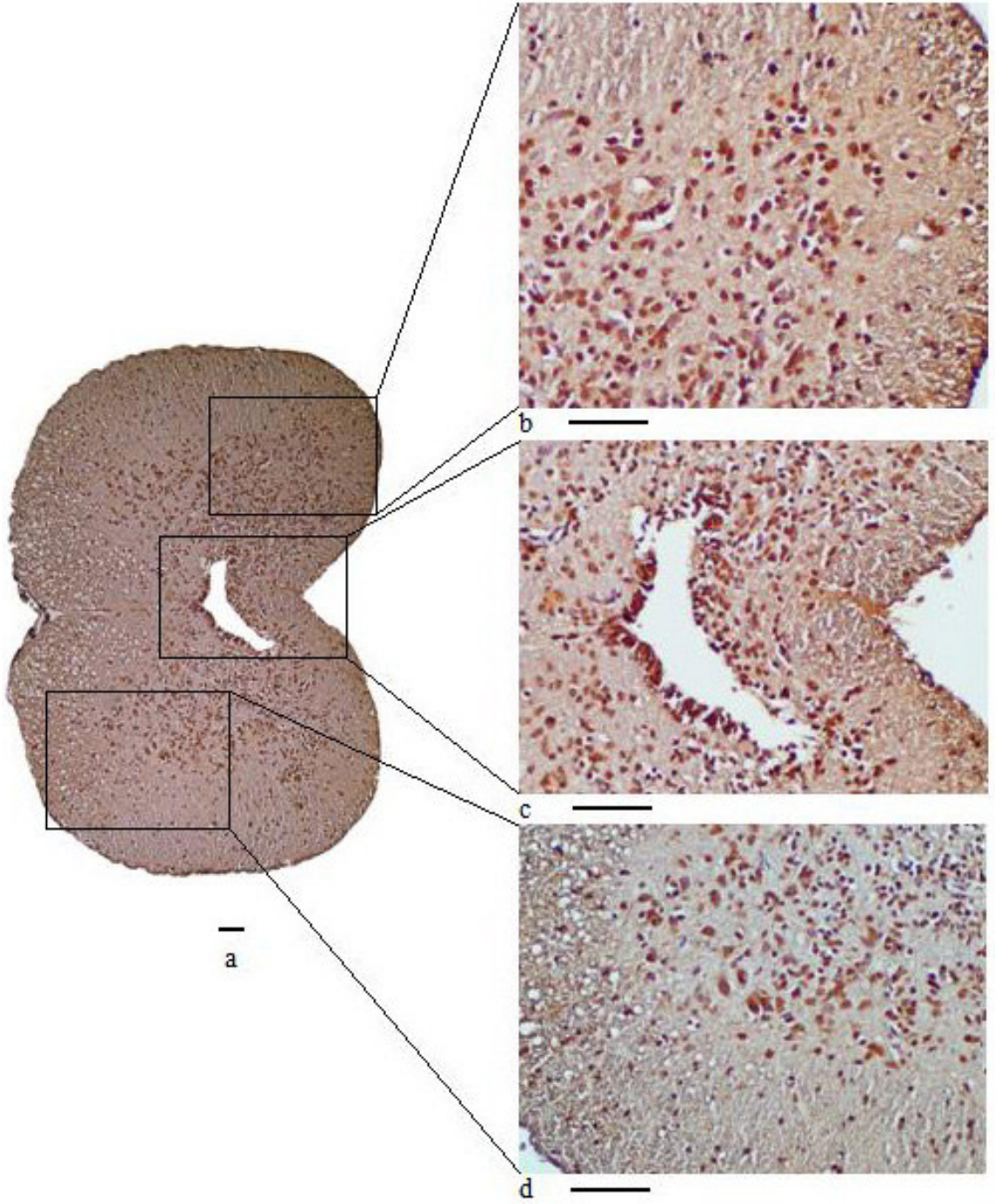
Şekil 4.11. L6s-ank ve FMRF-amid'in *R. ridibunda* omuriliği torakal bölge enine kesitindeki lokalizasyonları.

Stevens ve Rothe [25], *R. pipiens* omuriliğinde enkefalinlerin varlığını göstermişlerdir. Hajek ve ark. [43], *R. temporaria* omuriliğinde enkefalinlerjik sistemin varlığını bulmuşlardır. Ayrıca, Majane ve ark. [55], Sprague/Dawley ratların beyin, omurilik ve hipofiz bezinde FMRF-amid varlığını göstermişlerdir. Bu araştırmacılar tarafından, omurilikte 368 fmol/mg, hipofizde 1008 fmol/mg, hipotalamusta 202 fmol/mg ve beyin sapında 136 fmol/mg protein oranında FMRF-amid bulunduğu gözlemlenmiştir. Diğer bir çalışma grubu, Sprague/Dawley ratlarının omuriliğinde FMRF-amid varlığını göstermiştir [56]. Bu araştırmacılar tarafından, omuriliğin lumbo-sakral bölgesinde ve özellikle dorsal boynuzda FMRF-amid bakımından zengin sinir hücreleri bulunmuştur. Aynı araştırmacılar tarafından, omuriliğin, orta torakal alandan kesildiği zaman lumbar bölgedeki FMRF-amid miktarının %20 ile 50 arasında azalmasına rağmen, lumbo-sakral bölgeden kesildiği zaman lumbar alandaki FMRF-amid miktarının %50 oranında azaldığı bulunmuştur. Bu araştırmacılar göre, FMRF-

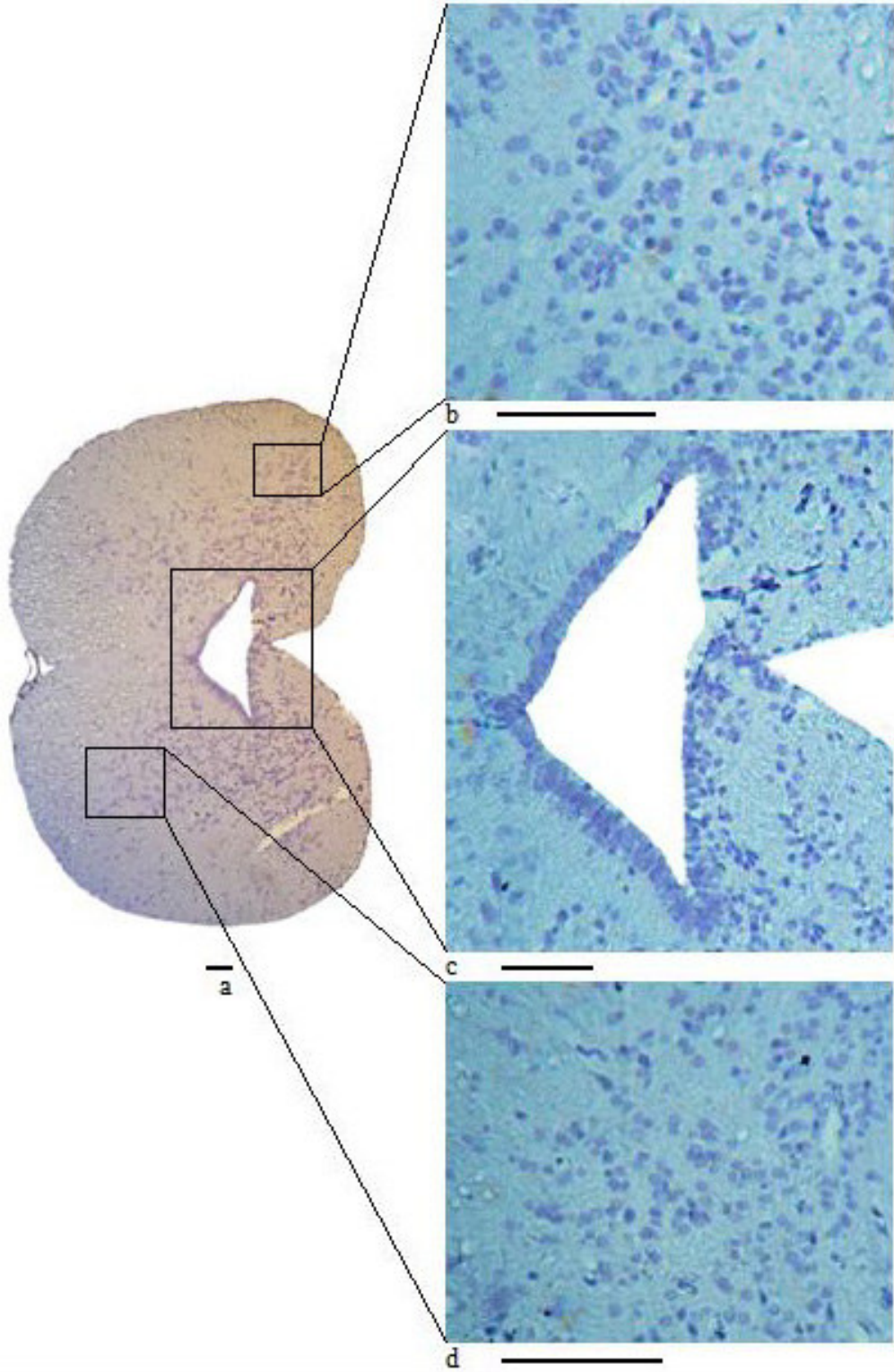
amid'in bir kısmı daha aşağıda bulunan siyatik sinirden ve sinir gangliyonlarından kaynaklanmaktadır. Bunun yanında, Williams ve ark. [57], ratların beyin, omurilik ve hipofizinde FMRF-amid lokalizasyonunu tespit etmişlerdir. Bu araştırmacılar tarafından, beyinin yanı sıra, beyin sapı, omuriliğin dorsal ve ventral boynuz bölgeleri ile hipofizinin nöral lob bölgelerinde, FMRF-amid'in lokalize olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.12. Lös-enk ve FMRF-amid'in *R. ridibunda* omuriliği torakal bölge enine kesitindeki şematik lokalizasyonları; □: Lös-enk erkek, ☆: Lös-enk dişi, Δ: FMRF-amid erkek, ○: FMRF-amid dişi.



Şekil 4.13. FMRF-amid'in *R. ridibunda* omuriliği torakal bölge enine kesitindeki immünopozitifliği. a) Genel görünüm, b) Ön boynuz, c) Merkezi kanal, d) Arka boynuz (Skala 60 µm).



Şekil 4.14. *R. ridibunda* omuriliği torakal bölge enine kesitinde negatif kontrol, a) Genel görünüm, b) Ön boynuz, c) Merkezi kanal, d) Arka boynuz (Skala 60 μm).

4.1.5. *R. ridibunda* Siyatik Sinirinde Lös-Enk ve FMRF-amid'in Lokalizasyonları

Siyatik sinirden enine ve boyuna kesit alınarak immünohistokimyasal işaretleme yapılmıştır. Kurbağa erkek siyatik sinir dokusunda boyanan aksonlardan, enine kesitte 961 lös-enk bakımından pozitif, 85 negatif, boyuna kesitte 339 pozitif, 10 negatif, dişilerde, enine kesitte 1327 pozitif 71 negatif, boyuna kesitte 449 pozitif, 38 negatif akson tespit edilmiştir. FMRF-amid bakımından ise, erkeklerde enine kesitte boyanan aksonlardan, 1499 pozitif, 51 negatif, boyuna kesitte 424 pozitif, 30 negatif, dişilerde, enine kesitte 1292 pozitif, 48 negatif, boyuna kesitte 411 pozitif, 27 negatif akson bulunmuştur. Bu verilere göre, lös-enk erkeklerde enine kesitte %92, boyuna kesitte %97, dişilerde enine kesitte %94, boyuna kesitte %92 immünopozitiflik göstermiştir. FMRF-amid ise, her iki eşeyde enine kesitte %96, boyuna kesitte %93 aktivite göstermiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. *R. ridibunda* siyatik sinirinde % immünopozitif değerleri

Eşey	Peptit Kesit	Lös-enk		FMRF-amid	
		$\bar{X} \pm S_x$	•	$\bar{X} \pm S_x$	•
Erkek (n=3)	Enine	92,13 ± 0.0231	Aax	96,44 ± 0.0113	Aay
	Boyuna	97,04 ± 0.0512	Abx	93,10 ± 0.0187	Aax
Dişi (n=3)	Enine	94,87 ± 0.0061	Aax	96,42 ± 0.0004	Aax
	Boyuna	92,19 ± 0.0151	Bax	93,83 ± 0.0073	Aax

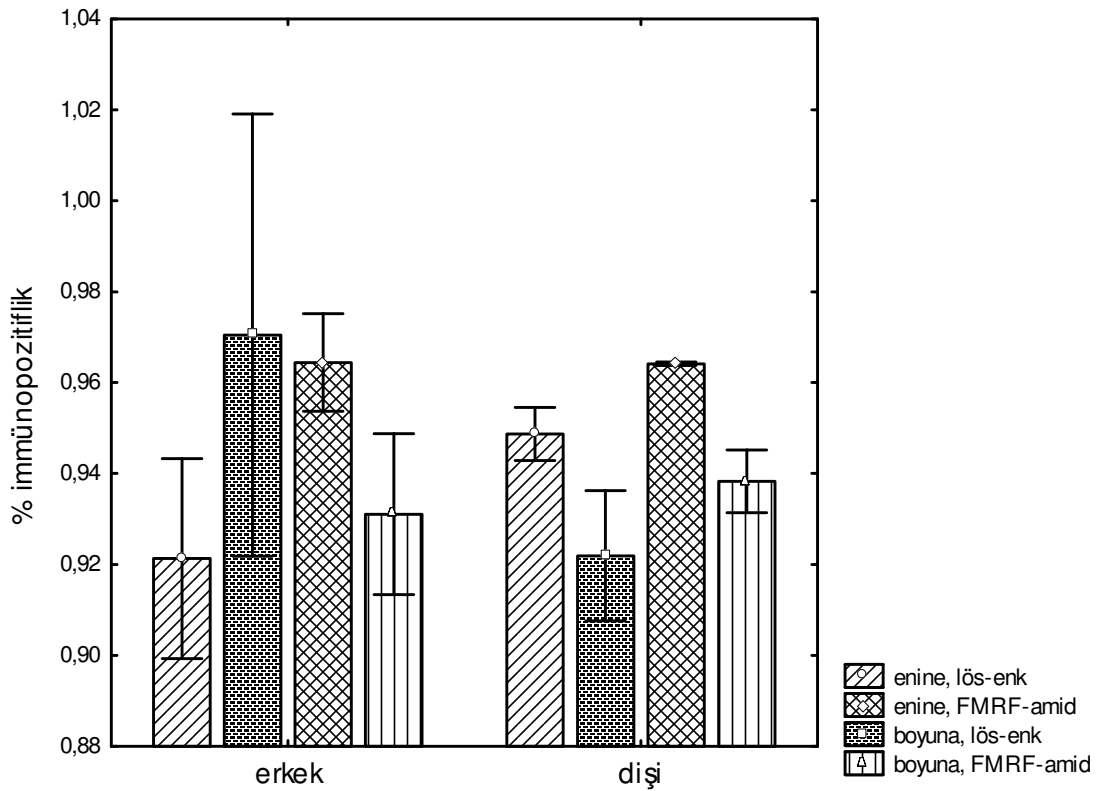
$\bar{X} \pm S_x$ = Aritmetik ortalama ± standart sapma.

• = Tukey HSD Post Hoc Test; A ve B eşeyler a ve b kesitler, x ve y peptitler arası ayrımı belirtmek için kullanılmıştır.

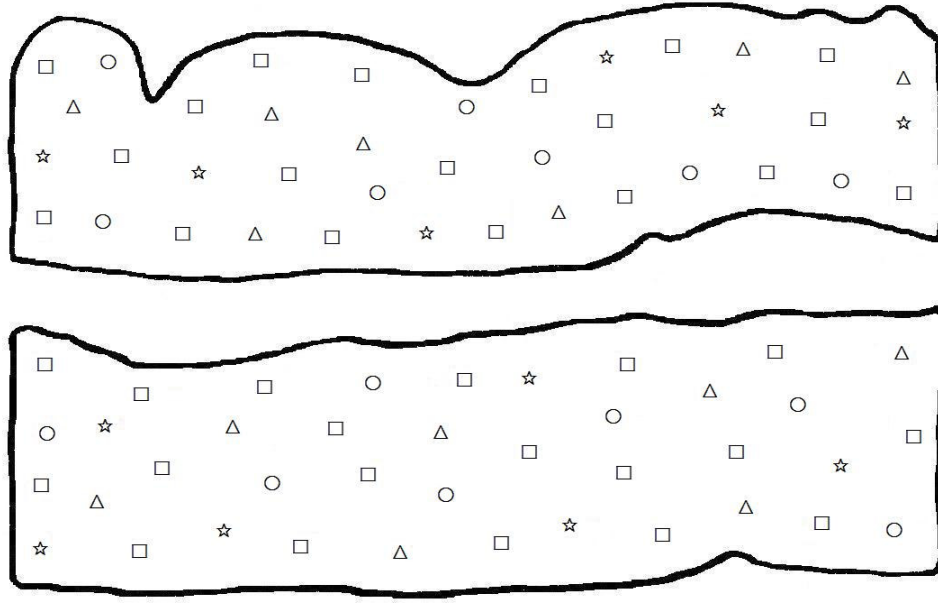
Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P < 0.05$ düzeyinde ayrım vardır.

Kurbağa siyatik sinir dokusunda, eşey-kesit-peptit etkileşimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,035^*$). İkili etkileşimler incelendiğinde ise, kesit-peptit etkileşimi ($p=0,040^*$) anlamlı bulunurken, eşey-peptit ($p=0,459$) ve eşey-kesit etkileşimi ($p=0,079$) anlamlı bulunmamıştır. Eşey-kesit-peptit etkileşimine ait post-hoc test sonucuna göre, erkek kurbağa siyatik siniri enine kesitte, FMRF-amid'in immünopozitiflik oranı, lös-enk'den anlamlı biçimde fazla bulunmuştur ($p=0,05^*$). Bununla beraber, erkek kurbağa siyatik siniri boyuna kesitte, lös-enk ile FMRF-amid arasında anlamlı bir fark yoktur ($p=0,073$). Dişi kurbağa siyatik siniri enine kesitte, lös-enk ile FMRF-amid arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,410$). Benzer şekilde, dişi kurbağa siyatik siniri boyuna kesitte, lös-enk ile FMRF-amid arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0,400$). Erkek kurbağaların siyatik siniri boyuna kesitindeki lös-enk'in immünopozitiflik oranı, enine kesitten anlamlı biçimde fazla bulunmuştur ($p=0,031^*$). Bununla beraber, erkek kurbağa siyatik siniri enine kesit ile boyuna kesit arasında FMRF-amid bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,115$). Dişi kurbağa siyatik siniri enine kesit ile boyuna kesit arasında, lös-enk bakımından anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p=0,189$). Benzer şekilde dişi kurbağa siyatik siniri enine kesit ile boyuna kesit arasında FMRF-amid bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,197$). Kurbağa siyatik siniri enine kesitte, eşeyler arasında lös-enk bakımından anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0,187$). Benzer şekilde kurbağa siyatik siniri enine kesitte eşeyler arasında FMRF-amid bakımından da anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,989$). Erkek kurbağaların siyatik siniri boyuna kesitinde, lös-enk'in immünopozitiflik oranı dişilerden anlamlı biçimde fazla bulunmuştur ($p=0,031^*$). Bununla beraber, kurbağa siyatik siniri boyuna kesitte, eşeyler arasında FMRF-amid bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,691$). Bu sonuçlara göre, lös-enk ve FMRF-amid'in kurbağa siyatik sinirinde immünoreaktivite göstermesi, bunların siyatik sinir aksoplazmalarında fizyolojik rollerinin bulunduğunu göstermektedir (Şekil 4.15). Erkek kurbağa siyatik sinir dokusu enine kesitinde FMRF-amid'in, lös-enk'e göre önemli biçimde daha immünopozitif olması, FMRF-amid'in erkek kurbağa siyatik sinirinde, daha fazla fizyolojik rolünün olduğunu düşündürmektedir [21, 37, 38, 56]. Kurbağa siyatik sinir dokusunda, eşeyler arasında lös-enk'in karşılaştırıldığı herhangi bir

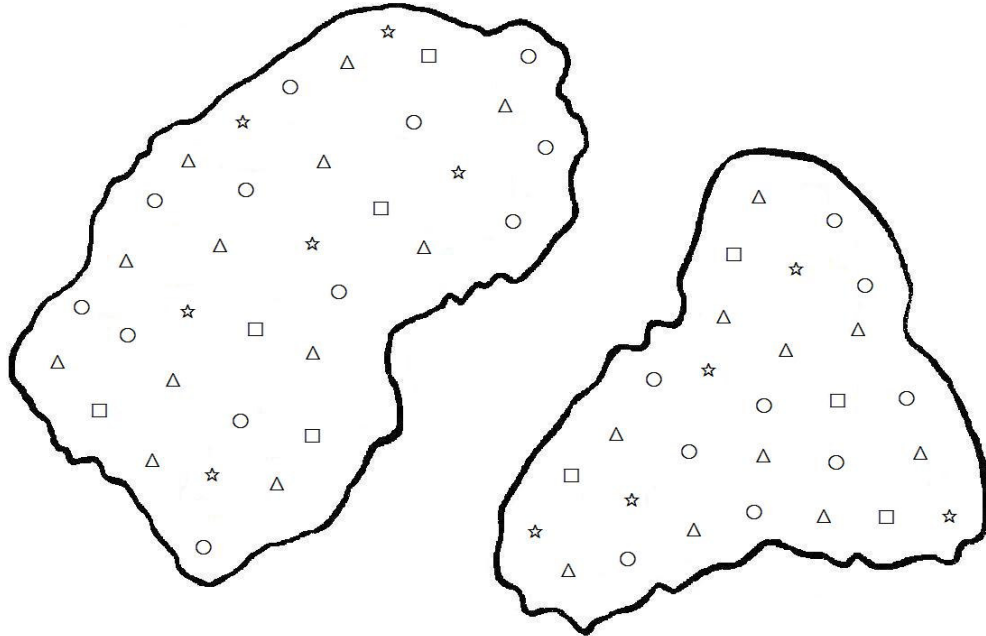
çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bununla beraber, lös-enk'in erkek kurbağa siyatik siniri boyuna kesitinde, dişilerden daha fazla immünoreaktivite göstermesi erkek kurbağa eşeyssel karakterlerinin, enkefalinler üzerinde etkili olduğuna işaret etmektedir (Şekil 4.16, 4.18). Ayrıca, siyatik sinirde, sinir fiberlerinin aksoplazmalarının tamamına yakını boyanırken, fibroblast ve Schwann hücrelerinin çok az bir kısmı boyanmıştır. Siyatik sinir dokusu çalışılırken enine kesitte, fibroblast ve Schwann hücreleri boyuna kesitten daha fazla sayılmıştır (Şekil 4.17, 4.19). Bu nedenle, lös-enk'in kurbağa siyatik siniri boyuna kesitinde, enine kesitten daha immünopozitif görülmesinin, boyuna kesit ile enine kesitteki hücre sayısı farkından kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir. Negatif kontrolde ise, herhangi bir spesifik işaretleme olmamıştır (Şekil 4.20).



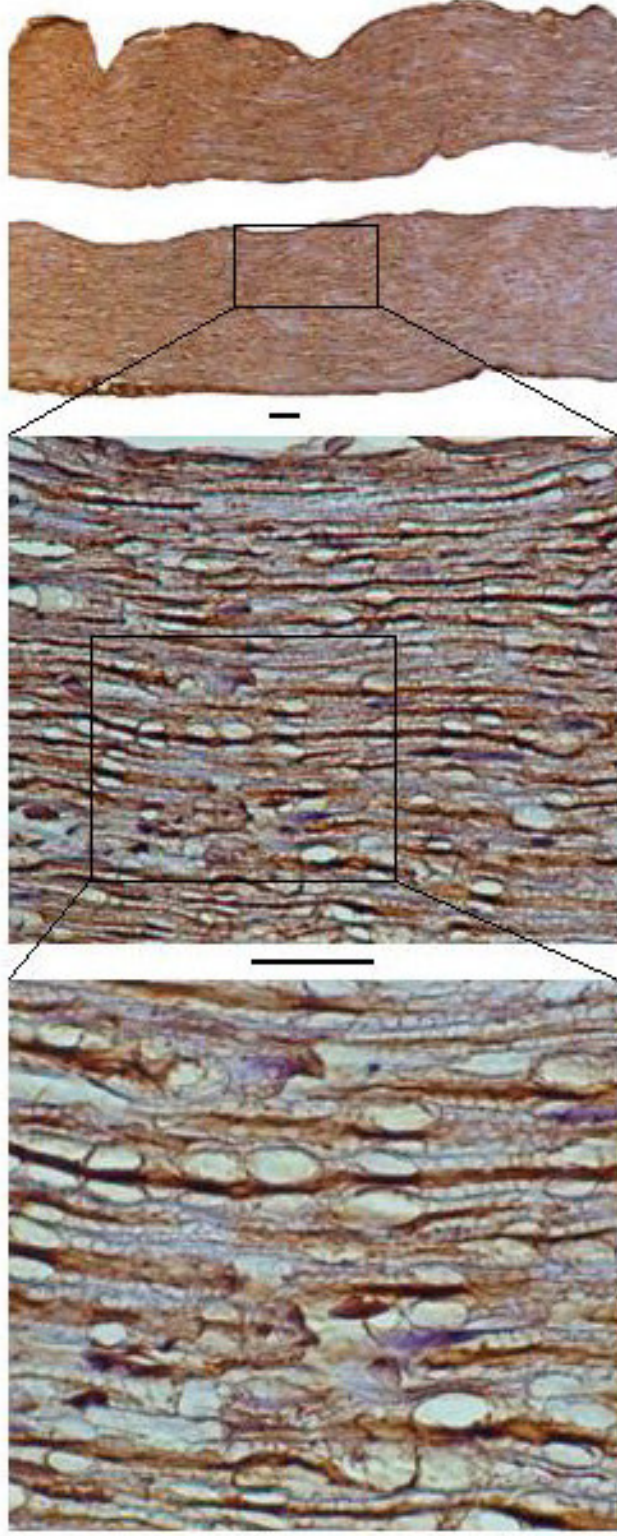
Şekil 4.15. Lös-enk ve FMRF-amid'in *R. ridibunda* siyatik sinir dokusundaki lokalizasyonları.



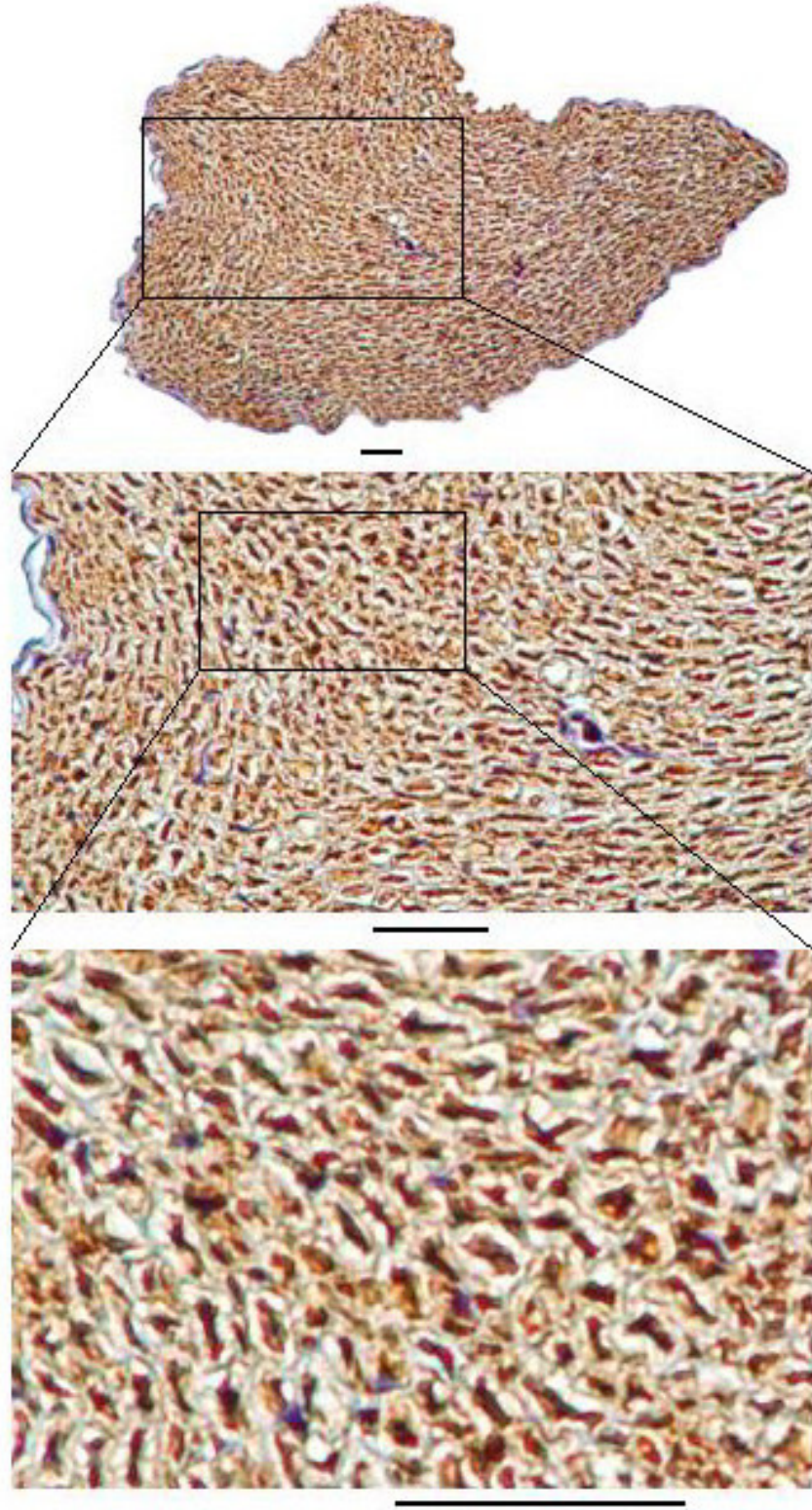
Şekil 4.16. L5-enk ve FMRF-amid'in *R. ridibunda* siyatik sinir dokusu boyuna kesitindeki şematik lokalizasyonları; □: L5-enk erkek, ☆: L5-enk dişi, Δ: FMRF-amid erkek, ○: FMRF-amid dişi.



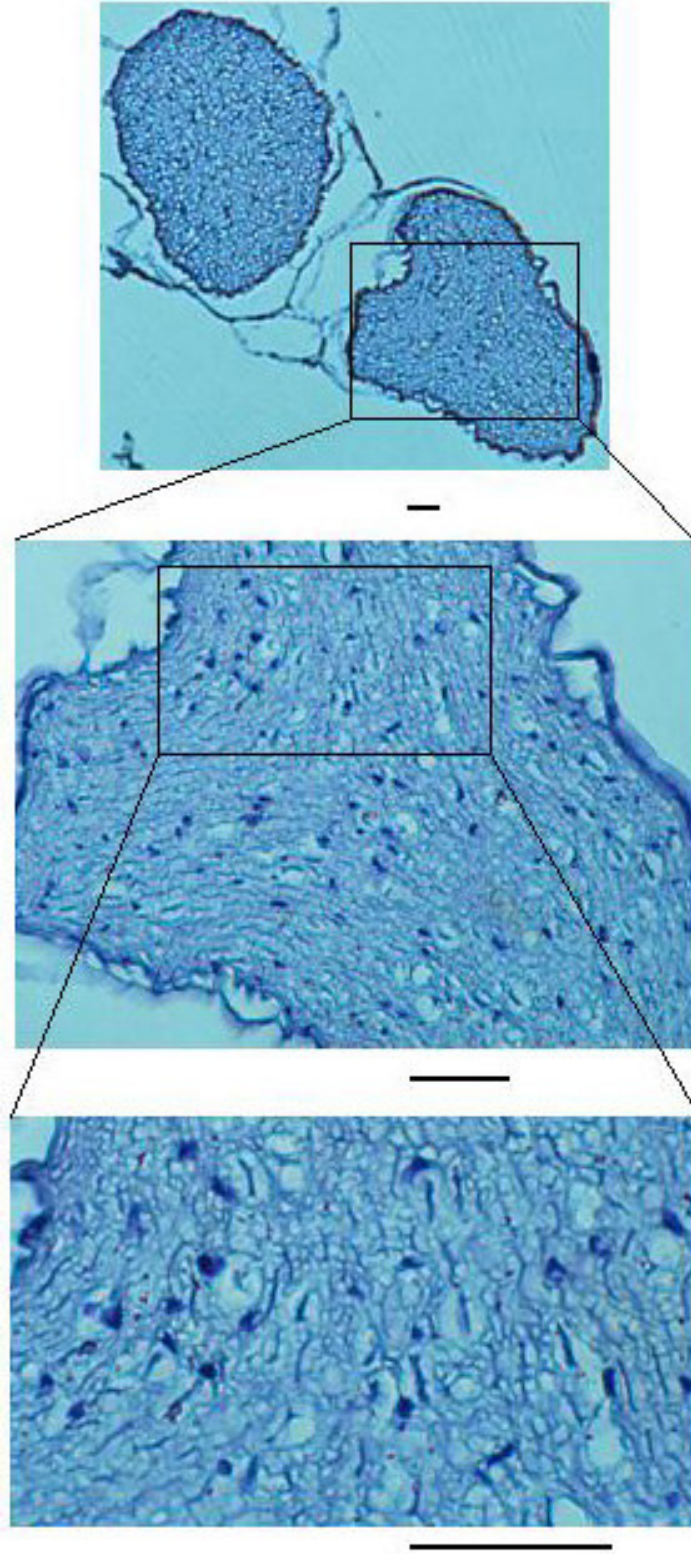
Şekil 4.17. L5-enk ve FMRF-amid'in *R. ridibunda* siyatik sinir dokusu enine kesitindeki şematik lokalizasyonları; □: L5-enk erkek, ☆: L5-enk dişi, Δ: FMRF-amid erkek, ○: FMRF-amid dişi.



Şekil 4.18. L6s-enk'in *R. ridibunda* siyatik sinir dokusu boyuna kesitindeki immünopozitifliği (Skala 70 µm).



Şekil 4.19. FMRF-amid'in *R. ridibunda* siyatik sinir dokusu enine kesitindeki immünopozitifliği (Skala 30 µm).



Şekil 4.20. *R. ridibunda* siyatik sinir dokusu enine kesitinde negatif kontrol (Skala 30 μ m).

Çamlıca ve ark. [37] ile Aşkin ve ark. [38], *R. ridibunda* siyatik sinirinde enkefalinlerjik sistemin varlığını göstermişlerdir. Diğer bir araştırma grubu tarafından, *R. esculenta* siyatik sinirinde enkefalinlerin bulunduğu kanıtlanmıştır [21]. Ayrıca, Ferrarese ve ark. [56], Sprague/Dawley ratlarının omuriliğinde, FMRF-amid varlığını göstermişlerdir. Bu araştırmacılar tarafından, omuriliğin lumbo-sakral bölgesinde ve özellikle dorsal boynuzda FMRF-amid bakımından zengin sinir hücreleri bulunmuştur. Aynı araştırmacılar tarafından, omuriliğin, orta torakal alandan kesildiği zaman lumbar bölgedeki FMRF-amid miktarının %20 ile 50 arasında azalmasına rağmen, lumbo-sakral bölgeden kesildiği zaman lumbar alandaki FMRF-amid miktarının %50 oranında azaldığı bulunmuştur. Bu araştırmacılar göre, FMRF-amid'in bir kısmı, daha aşağıda bulunan siyatik sinirden ve sinir gangliyonlarından kaynaklanmaktadır.

4.1.6. *C. sapidus* Beyin Dokusunda Lös-Enk ve FMRF-amid'in Lokalizasyonları

C. sapidus'un beyin dokusu boyuna kesitinde immünohistokimyasal işaretleme yapılmıştır. Erkeklerin beyin dokusunda boyanan hücrelerden, 373 lös-enk bakımından pozitif, 24 negatif, dişilerde 491 pozitif, 29 negatif hücre tespit edilmiştir. FMRF-amid bakımından ise, erkeklerde boyanan hücrelerden 633 pozitif, 44 negatif, dişilerde, 689 pozitif 58 negatif hücre bulunmuştur. Bu işaretleme sonucuna göre, lös-enk erkek ve dişi yengeçlerde %94, FMRF-amid ise erkeklerde %93, dişilerde %92 immünoreaktivite meydana getirmiştir (Çizelge 4.6). Yengeç beyin dokusunda, eşey-peptit etkileşimi anlamlı bulunmamıştır ($p=0,384$). Benzer şekilde, eşeyler arasında da anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p=0,384$). Bununla beraber, eşey farkı gözetilmeden, sadece peptit dikkate alınarak yapılan analiz sonucunda, lös-enk'in immünopozitiflik oranı FMRF-amid'e göre, istatistiksel açıdan anlamlı biçimde fazla bulunmuştur ($p=0,031^*$). Bu verilere göre, lös-enk ve FMRF-amid'in yengeç beyin dokusunda, yüksek düzeyde immünoreaktivite göstermesi, bu iki peptitin beyin dokusunda sentezlendiğini ve biyolojik aktivitelerinin olduğunu göstermektedir (Şekil 4.21, 4.22, 4.23). Negatif kontrolde ise, spesifik bir işaretlemeye rastlanmamıştır (Şekil 4.24). Lös-enk ve FMRF-

amid'in meydana getirdiği immünoaktivite, eşeye bağlı olarak değişmemektedir. Bununla beraber, eşey farkı gözlemlenmeden sadece peptit dikkate alınarak yapılan analizde, lös-enk'in FMRF-amid'e göre önemli biçimde immünoaktivite göstermesi, lös-enk'in beyin dokusunda daha fazla nöronal aktivite gösterdiğini ortaya koymaktadır [68, 69, 78].

Çizelge 4.6. *C. sapidus* beyin dokusunda % immünoaktif değerleri

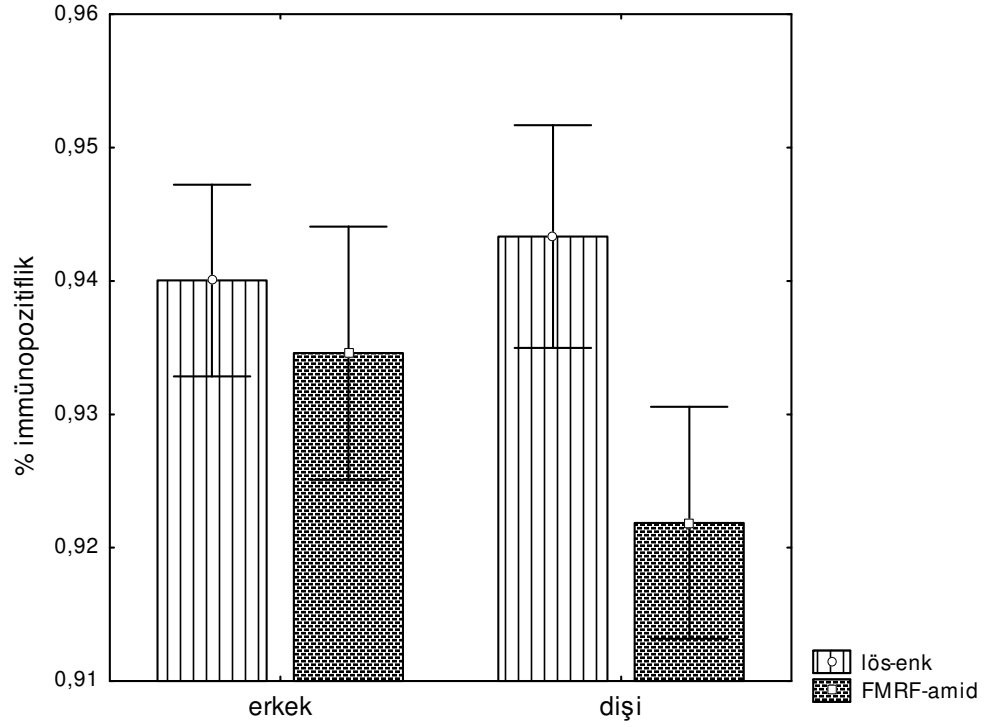
Peptit	Lös-enk		FMRF-amid	
	$\bar{X} \pm S_x$	•	$\bar{X} \pm S_x$	•
Erkek (n=3)	94,00 ± 0.0076	Ax	93,46 ± 0.0100	Ax
Dişi (n=3)	94,33 ± 0.0088	Ax	92,19 ± 0.0092	Ax
Yengeç (n=6)	94,17 ± 0.0076	Ax	92,82 ± 0.0111	Ay

$\bar{X} \pm S_x$ = Aritmetik ortalama ± standart sapma.

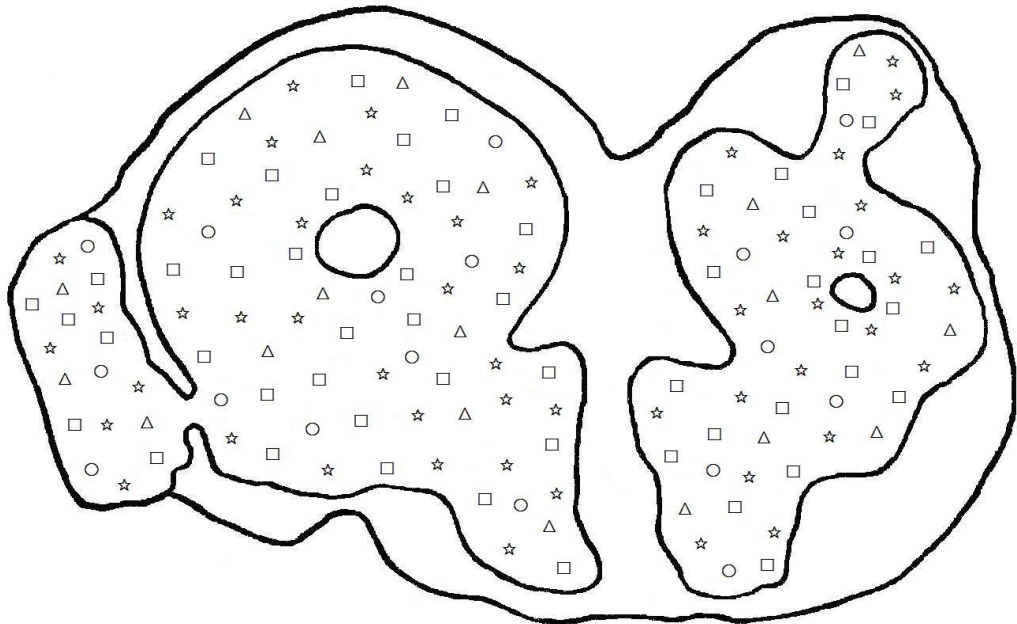
• = Tukey HSD Post Hoc Test; A eşeyler, x ve y peptitler arası ayrımı belirtmek için kullanılmıştır.

Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P < 0.05$ düzeyinde ayrım vardır.

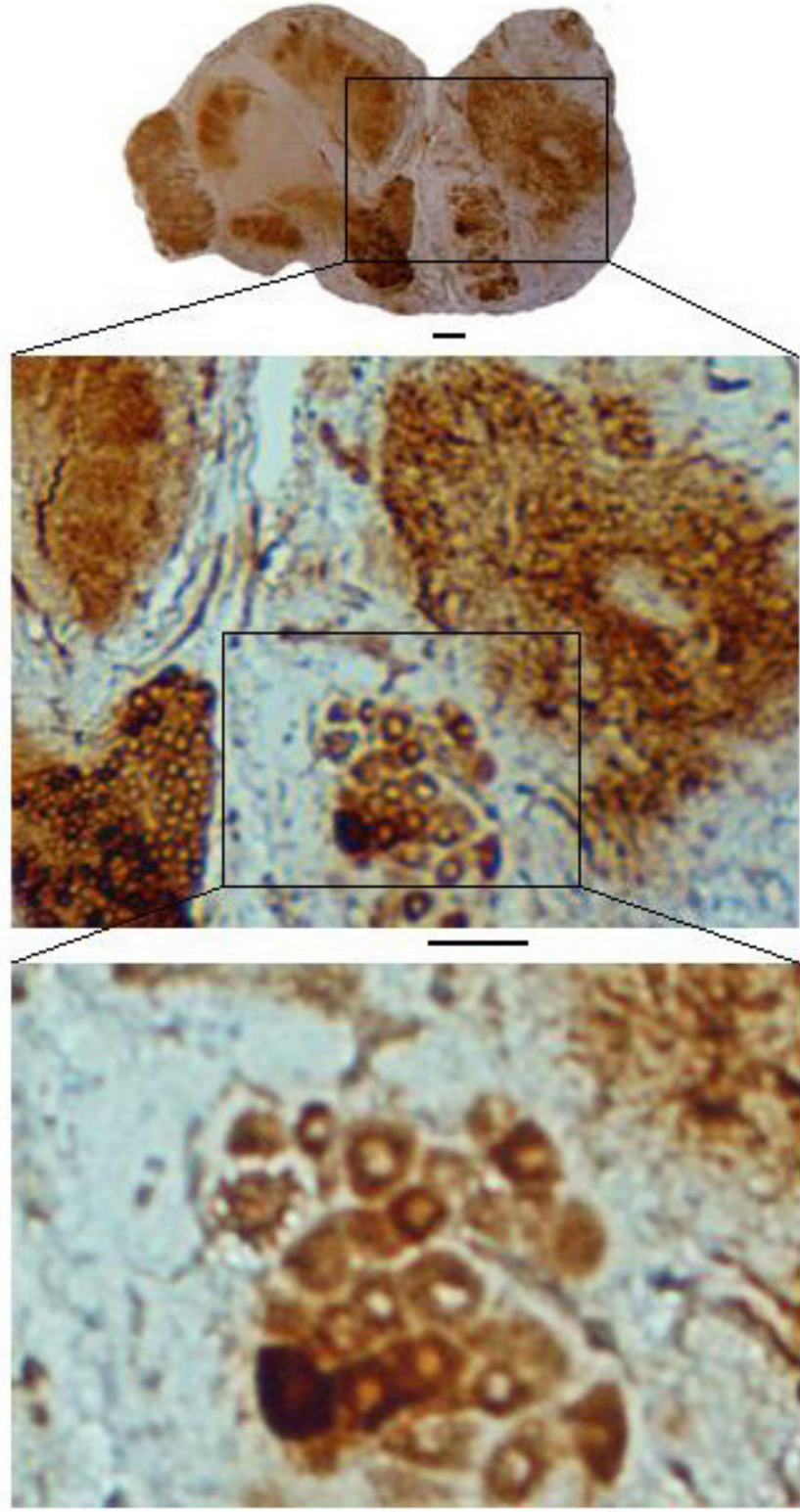
Lüschen ve ark. [68], *C. maenas* göz sapında, serebral gangliyonda ve torakal gangliyonda enkefalin varlığını göstermişlerdir. Diğer bir araştırmacı, *C. destructor*, *C. maenas*, *H. americanus*, *E. sinensis* ve *M. rosenbergi* sinir sisteminde FMRF-amid varlığını göstermiştir [69]. Bu araştırmacı tarafından, *C. destructor* beyini antenüller nöropili, tegumentar sinir, ventral sinir kökleri, *C. maenas* beyini antenüller nöropili ve tegumentar sinirinde, *H. americanus* beyini antenüller nöropilinde FMRF-amid lokalizasyonu bulunmuştur. Diğer bir araştırma grubu tarafından, *O. limosus* sinir sisteminde, FMRF-amid lokalizasyonu bulunmuştur [78]. Bu araştırmacılar, serebral gangliyonun anterior olfaktor, anterior, dorsal, lateral ve posterior somata bölgelerinde, optik gangliyonlarda, circumoesophageal konnektiflerinde ve komissural gangliyonlarda FMRF-amid'i lokalize etmişlerdir.



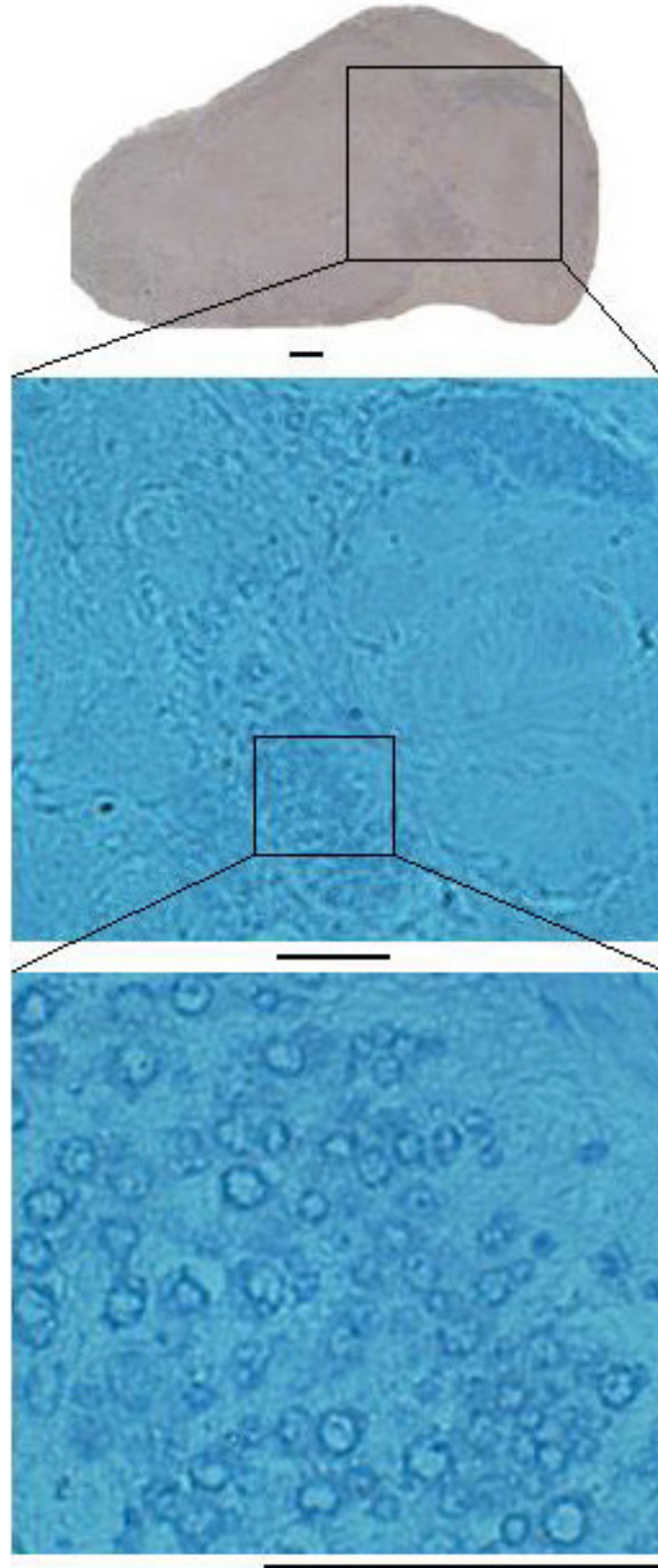
Şekil 4.21. L6s-enk ve FMRF-amid'in *C. sapidus* beyin dokusu boyunca kesitindeki lokalizasyonları.



Şekil 4.22. L6s-enk ve FMRF-amid'in *C. sapidus* beyin dokusundaki şematik lokalizasyonları; □: L6s-enk erkek, ☆: L6s-enk dişi, Δ: FMRF-amid erkek, ○: FMRF-amid dişi.



Şekil 4.23. Lös-enk'in *C. sapidus* beyin dokusu boyuna kesitindeki immünopozitifliği (Skala 50 μ m).



Şekil 4.24. *C. sapidus* beyin dokusu boyuna kesitinde negatif kontrol (Skala 50 μm).

4.1.7. *C. sapidus* Göz Sapı Dokusunda Lös-Enk ve FMRF-amid'in Lokalizasyonları

Göz sapı boyuna kesitinde, proksimalden distale doğru LG, ME, MI, MT ve ON olmak üzere, 5 bölgede immünopozitiflik araştırılmıştır. Erkek yengeçlerin göz sapı dokusunda boyanan hücrelerden, 3407 lös-enk bakımından pozitif, 196 negatif, dişilerde 3727 pozitif, 210 negatif hücre tespit edilmiştir. FMRF-amid bakımından ise, erkeklerde boyanan hücrelerden 4432 pozitif, 275 negatif, dişilerde, 4434 pozitif, 291 negatif hücre bulunmuştur. Buna göre, lös-enk erkeklerde göz sapı bölgelerinden LG'de %92, ME, MI ve MT'de %94, ON'de %95, dişilerde ise LG'de %95, ME, MT ve ON'de %94 MI'de %93 immünopozitiflik göstermiştir. FMRF-amid, erkeklerde LG, ME ve MT'de %93, MI ve ON'de %94, dişilerde ise 5 göz sapı bölgesinde de %93 oranında immün reaksiyon göstermiştir (Çizelge 4.7). Negatif kontrolde ise, herhangi bir spesifik işaretleme meydana gelmemiştir (Şekil 4.27). Yengeç göz sapı dokusunun boyuna kesitinde, 5 farklı bölgeden alınan ölçümlerin tekrarlanan analizi sonucuna göre, doku-eşey-peptit etkileşimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,276$). İkili etkileşimler incelendiği zaman, doku-peptit ($p=0,809$) ve eşey-peptit ($p=0,316$) etkileşimi de anlamlı değildir. Benzer şekilde, eşeyler arası ($p=0,931$) ve peptitler arasında da ($p=0,198$) anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Bununla beraber, doku-eşey etkileşimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,041^*$). Doku-eşey etkileşimleri için yapılan post-hoc test sonucuna göre, erkek yengeçlerde göz sapı bölgelerinden ON'deki lös-enk ve FMRF-amid'in immünoreaktivitesi LG'den anlamlı biçimde fazla bulunmuştur ($p=0,005^{**}$). Bununla beraber, erkek yengeçlerin geriye kalan göz sapı bölgeleri ile, dişi bireylerin bütün göz sapı bölgeleri arasında istatistiksel bakımdan anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Buna göre, erkek yengeçlerin göz sapı bölgelerinden LG ile ME ($p=0,934$), LG ile MI ($p=0,357$), LG ile MT ($p=0,884$), ME ile MI ($p=0,986$), ME ile MT ($p=1,000$), ME ile ON ($p=0,126$), MI ile MT ($p=0,995$), MI ile ON ($p=0,657$) ve MT ile ON ($p=0,170$) arasında, lös-enk ve FMRF-amid'in immünopozitifliği bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır. Benzer şekilde, dişi yengeçlerin göz sapı bölgelerinden LG ile ME ($p=1,000$), LG ile MI ($p=0,975$), LG ile

MT (p=0,999), LG ile ON (p=1,000), ME ile MI (p=1,000), ME ile MT (p=1,000), ME ile ON (p=1,000), MI ile MT (p=1,000), MI ile ON (p=0,984) ve MT ile ON (p=1,000) arasında, yine lös-enk ve FMRF-amid'in immüno pozitifliği bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Çizelge 4.7. *C. sapidus* göz sapı boyuna kesitinde % immüno pozitif değerleri

Eşey	Peptit Doku	Lös-enk		FMRF-amid	
		$\bar{X} \pm S_x$	•	$\bar{X} \pm S_x$	•
Erkek (n=3)	LG	92,79 ± 0.0272	Aax	93,79 ± 0.0047	Aax
	ME	94,01 ± 0.0146	Aabx	93,83 ± 0.0019	Aabx
	MI	94,67 ± 0.0053	Aabx	94,17 ± 0.0060	Aabx
	MT	94,01 ± 0.0047	Aabx	93,96 ± 0.0034	Aabx
	ON	95,73 ± 0.0105	Abx	94,93 ± 0.0059	Abx
Dişi (n=3)	LG	95,17 ± 0.0050	Aabx	93,75 ± 0.0071	Aabx
	ME	94,47 ± 0.0031	Aabx	93,86 ± 0.0054	Aabx
	MI	93,90 ± 0.0142	Aabx	93,93 ± 0.0038	Aabx
	MT	94,45 ± 0.0015	Aabx	93,76 ± 0.0068	Aabx
	ON	94,97 ± 0.0019	Aabx	93,88 ± 0.0043	Aabx

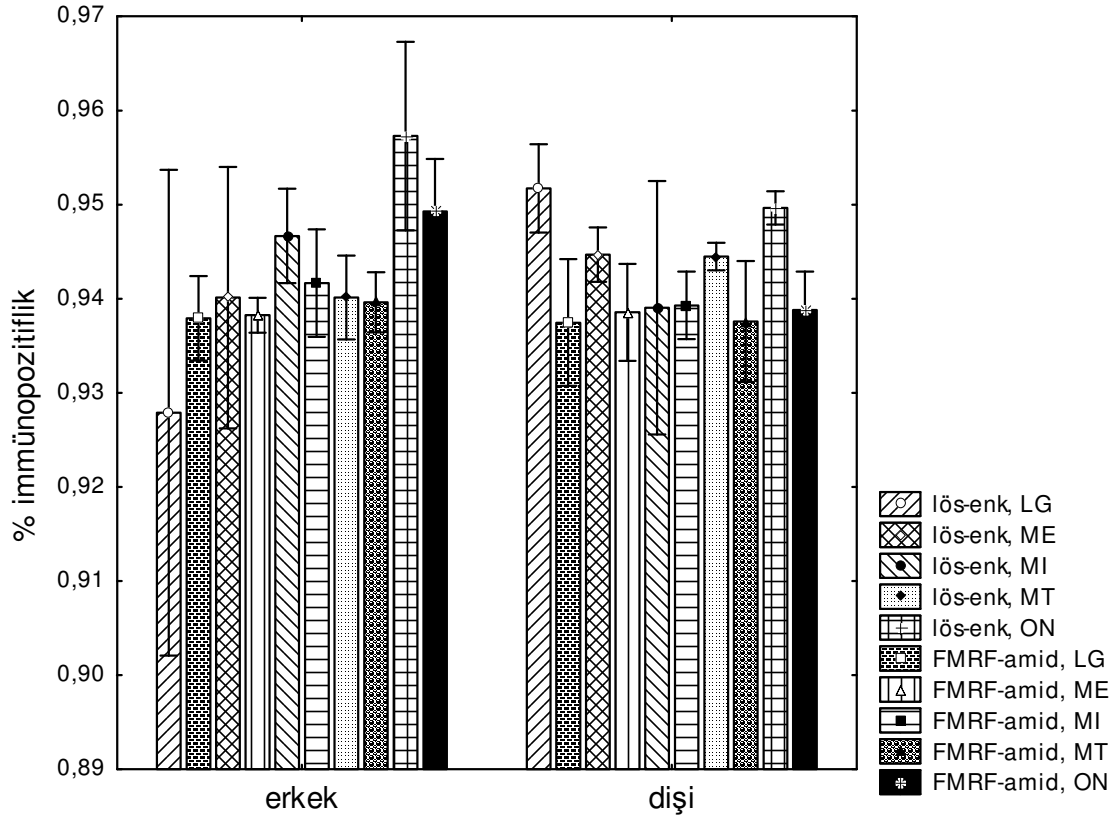
$\bar{X} \pm S_x$ = Aritmetik ortalama ± standart sapma.

• = Tukey HSD Post Hoc Test; A eşeyler, a ve b dokular, x peptitler arası ayrımı belirtmek için kullanılmıştır.

Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0.01 düzeyinde ayrım vardır.

Bu verilere dayanarak, lös-enk ve FMRF-amid'in yengeç göz sapında yüksek düzeyde immüno reaktivite göstermesi, bu iki peptitin göz sapı nöronlarında sentezlendiğine ve fizyolojik rollerinin bulunduğuna işaret etmektedir (Şekil 4.25, 4.26,

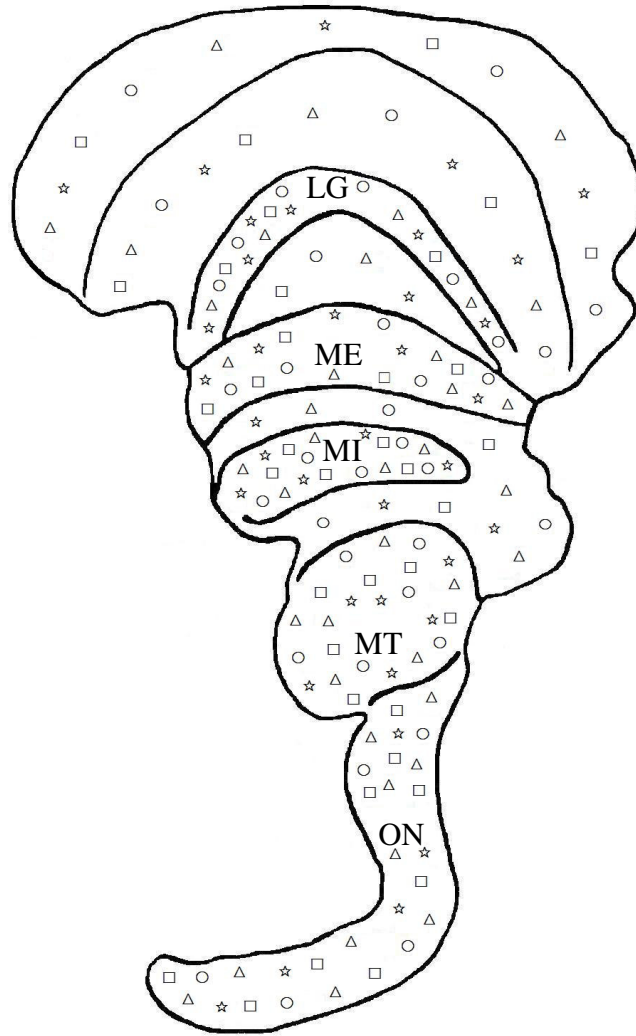
4.28). Her iki peptitin meydana getirdiği immünoaktivite, eşeye bağlı olarak değişmemektedir. Bununla beraber, erkek göz sapı bölgelerinden ON'nin, her iki peptit bakımından, LG'den önemli biçimde daha fazla immünoaktivite göstermesi, ON'deki nöronal aktivitenin daha fazla olduğunu göstermektedir [67, 72, 73, 75, 77].



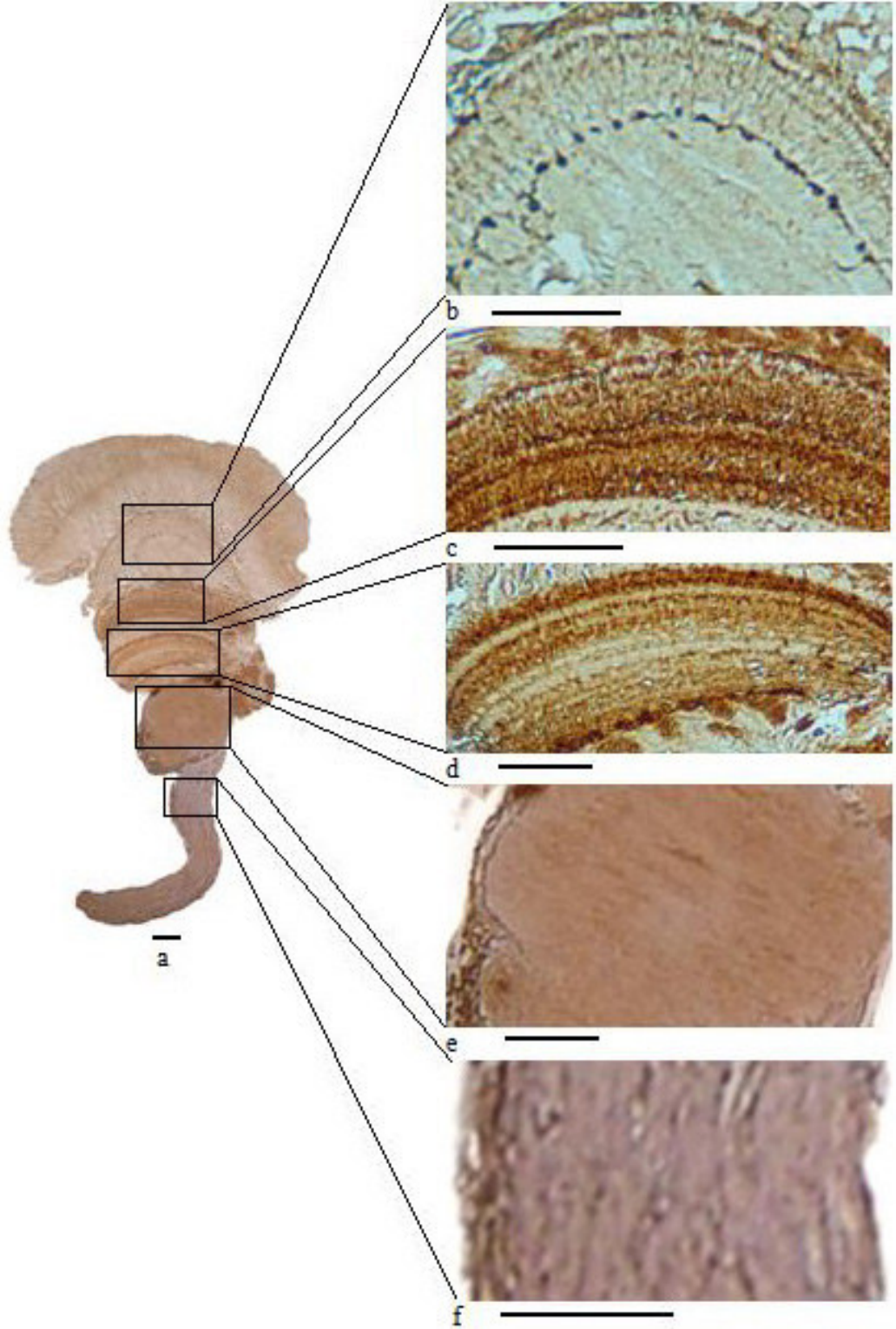
Şekil 4.25. Löt-enk ve FMRF-amid'in *C. sapidus* göz sapı dokusu boyunca kesitindeki lokalizasyonları.

Jaros ve ark. [67], immünohistokimyasal yöntemlerle, *C. maenas* göz sapının LG, ME, MI, MT, sinüs bezi, MT-Xorgan kompleksi, LG ile ME'yi bağlayan 1. kiyazma ve ME ile MI'yı bağlayan 2. kiyazma bölgelerinde, enkefalinlerce zengin sinir lifleri bulmuşlardır. Bu araştırmacılar tarafından, HPLC ve RIA yöntemleri kullanılarak, sinüs bezi ekstraktlarında löt-enk, met-enk ve met-enk-arg-phe varlığı gösterilmiştir. Diğer bir araştırma grubu tarafından, *M. rosenbergii* göz sapı ekstraktlarında FMRF-amid varlığı bulunmuştur [72]. Fingerman ve ark. [75] ise, *U. pugilator* göz sapında löt-

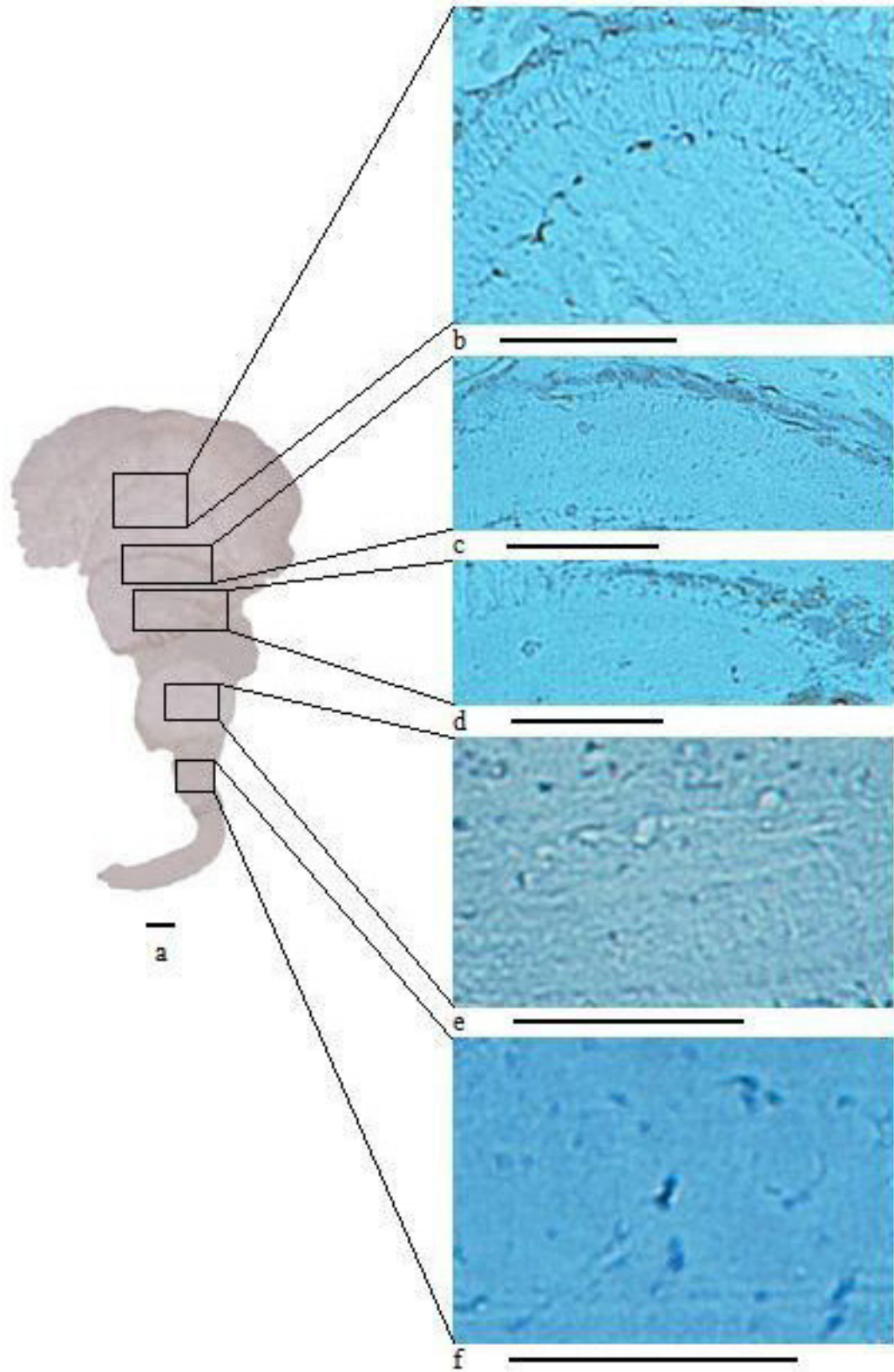
enk ve FMRF-amid varlığını bulmuşlardır. Bu araştırmacılar tarafından, göz sapının MT, LG, kiyazmatik alanlar, sinüs bezi, retinular hücrelerin çoğu ve optik pedinkül gibi bölgelerinde lös-enk, optik gangliyonun her 3 kiyazmatik bağlantı bölgeleri başta olmak üzere ME, MI, MT-Xorgan kompleksi ve optik pedinkül bölgelerinde FMRF-amid lokalize edilmiştir. Jacobs ve Van Herp [73], *E. serratus* göz sapında, FMRF-amid varlığını göstermişlerdir. Diğer bir araştırma grubu tarafından, *U. pugilator* göz sapında met-enk ve FMRF-amid varlığı bulunmuştur [77].



Şekil 4.26. Lös-enk ve FMRF-amid'in *C. sapidus* göz sapı dokusu boyunca kesitindeki şematik lokalizasyonları; □: Lös-enk erkek, ☆: Lös-enk dişi, Δ: FMRF-amid erkek, ○: FMRF-amid dişi.



Şekil 4.27. FMRF-amid'in *C. sapidus* göz sapı dokusu boyuna kesitindeki immünopozitifliği. a) Genel görünüm b) LG c) ME d) MI e) MT f) ON (Skala 150 μ m).



Şekil 4.28. *C. sapidus* göz sapı boyunca kesitinde negatif kontrol, a) Genel görünüm, b) LG, c) ME, d) MI, e) MT, f) ON (Skala 150 µm).

4.1.8. *C. sapidus* Torakal Gangliyon Dokusunda Lös-Enk ve FMRF-amid'in Lokalizasyonları

Mavi yengeç torakal gangliyonu radyal kesitinde, immüno pozitif aktivite incelenmiştir. Erkeklerin torakal gangliyon dokusunda boyanan hücrelerden, 2719 lös-enk bakımından pozitif 171 negatif, dişilerde 3344 pozitif, 186 negatif hücre tespit edilmiştir. FMRF-amid bakımından ise, erkeklerde boyanan hücrelerden 3719 pozitif, 262 negatif, dişilerde 3876 pozitif 319 negatif hücre bulunmuştur. Bu verilere göre, lös-enk erkek ve dişi yengeçlerde %94, FMRF-amid ise erkeklerde %93, dişilerde %92 immüno pozitiflik meydana getirmiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. *C. sapidus* torakal gangliyonunda % immüno pozitif değerleri

Peptit	Lös-enk		FMRF-amid	
	$\bar{X} \pm S_x$	•	$\bar{X} \pm S_x$	•
Erkek (n=3)	94,06 ± 0.0043	Ax	93,41 ± 0.0026	Ax
Dişi (n=3)	94,64 ± 0.0066	Ax	92,40 ± 0.0099	Ax
Yengeç (n=6)	94,35 ± 0.0059	Ax	92,90 ± 0.0085	Ay

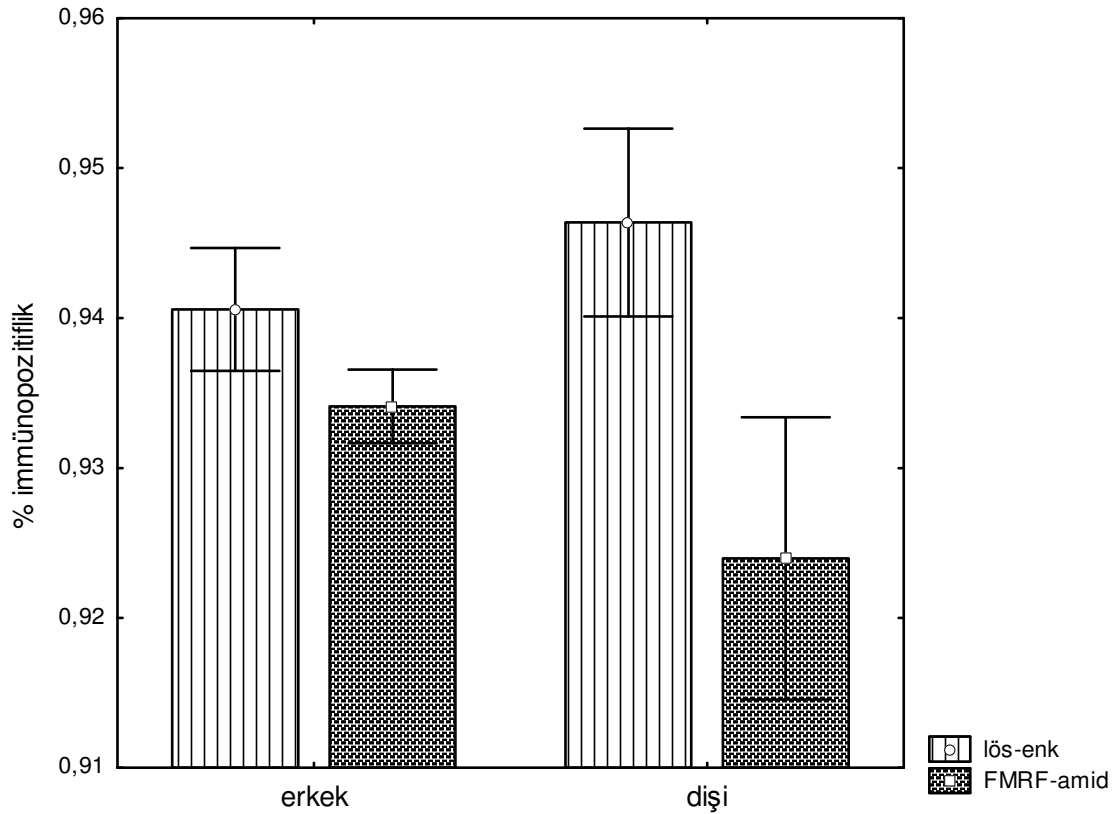
$\bar{X} \pm S_x$ = Aritmetik ortalama ± standart sapma.

• = Tukey HSD Post Hoc Test; A eşeyler, x ve y peptitler arası ayrımı belirtmek için kullanılmıştır.

Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0.01 düzeyinde ayırım vardır.

Yengeç torakal gangliyon dokusunda, eşey-peptit etkileşimi anlamlı bulunmamıştır (p=0,065). Benzer şekilde eşeyler arasında da anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,570). Bununla beraber, eşey farkı gözlemlenmeden sadece peptite dayalı yapılan analiz sonucunda, lös-enk'in immüno pozitiflik oranı, FMRF-amid'e göre istatistiksel açıdan anlamlı biçimde fazla bulunmuştur (p=0,005**). Bu verilere göre, lös-enk ve FMRF-amid'in yengeç torakal gangliyonunda yüksek düzeyde

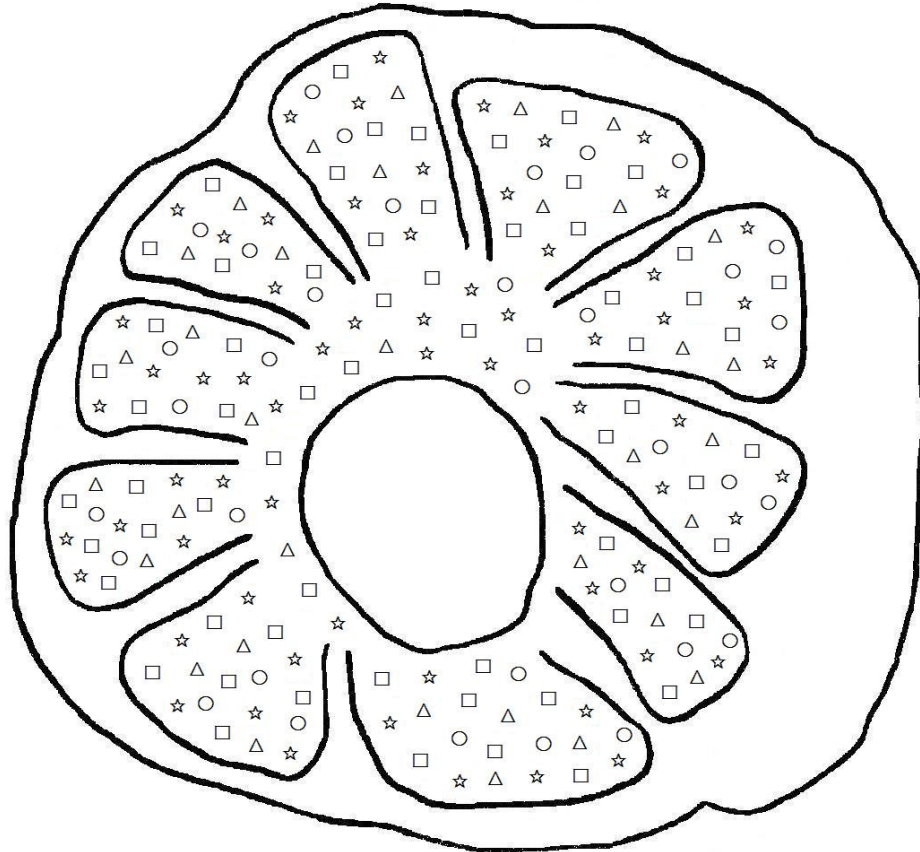
immünoaktivite göstermesi, bu iki peptidin torakal gangliyon dokusunda sentezlendiğini ve nöronal aktivitelerinin bulunduğunu göstermektedir (Şekil 4.29, 4.30, 4.31). Negatif kontrolde ise, spesifik bir işaretlemeye rastlanmamıştır (Şekil 4. 32). Lös-enk ve FMRF-amid'in meydana getirdiği immünoaktivite, eşeye bağlı olarak değişmemektedir. Bununla beraber, eşey farkı gözetmeden sadece peptite dayalı yapılan analizde, lös-enk'in FMRF-amid'e göre önemli biçimde daha fazla immünoaktivite göstermesi, lös-enk'in torakal gangliyon dokusunda fizyolojik rolünün daha fazla olduğunu ortaya koymaktadır [66, 68, 70].



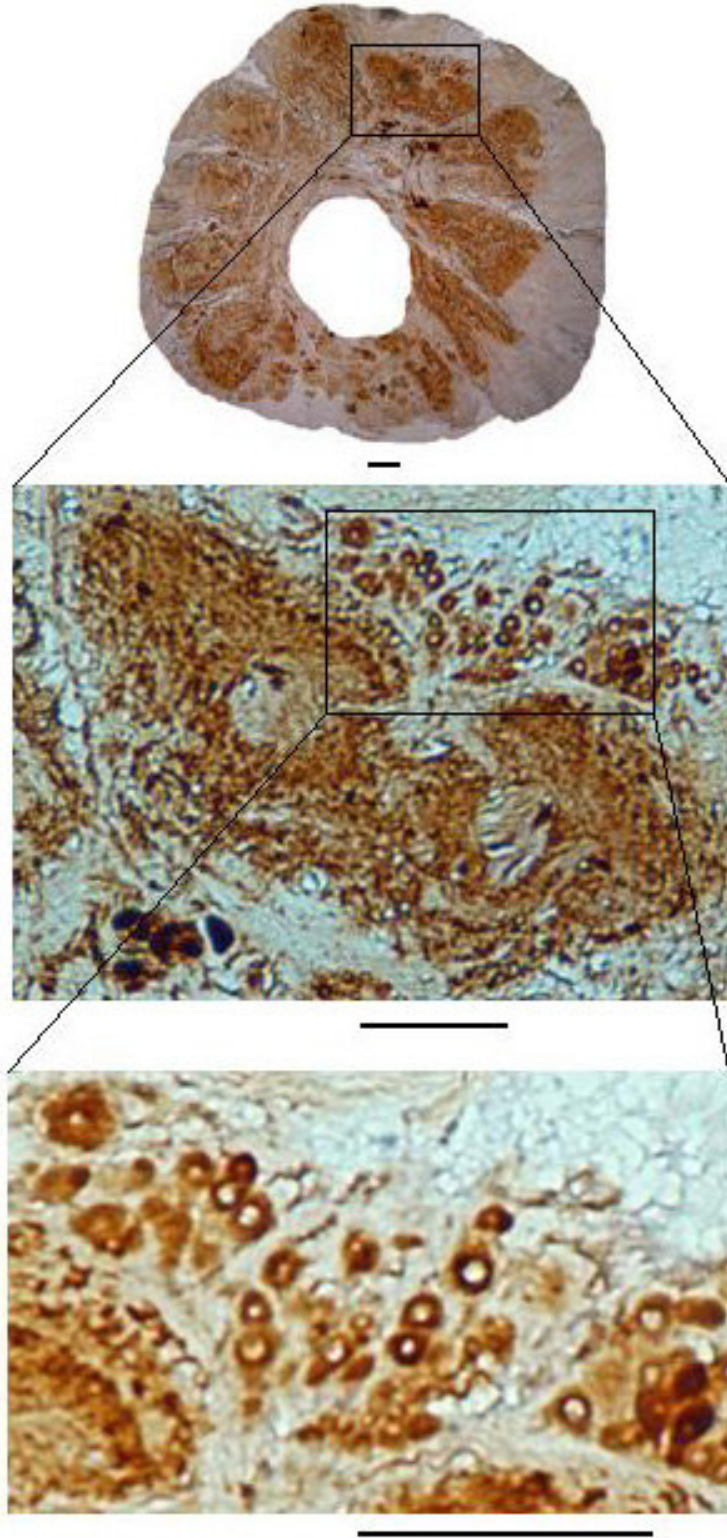
Şekil 4.29. Lös-enk ve FMRF-amid'in *C. sapidus* torakal gangliyon dokusu radyal kesitindeki lokalizasyonları.

Lüschen ve ark. [68], *C. maenas* torakal gangliyon ekstraktlarından, 3 pmol lös-enk ve 1 pmol met-enk izole etmişlerdir. Bu araştırmacılar göz sapında, serebral gangliyonda ve torakal gangliyonda enkefalin varlığını bulmuşlardır. Diğer bir

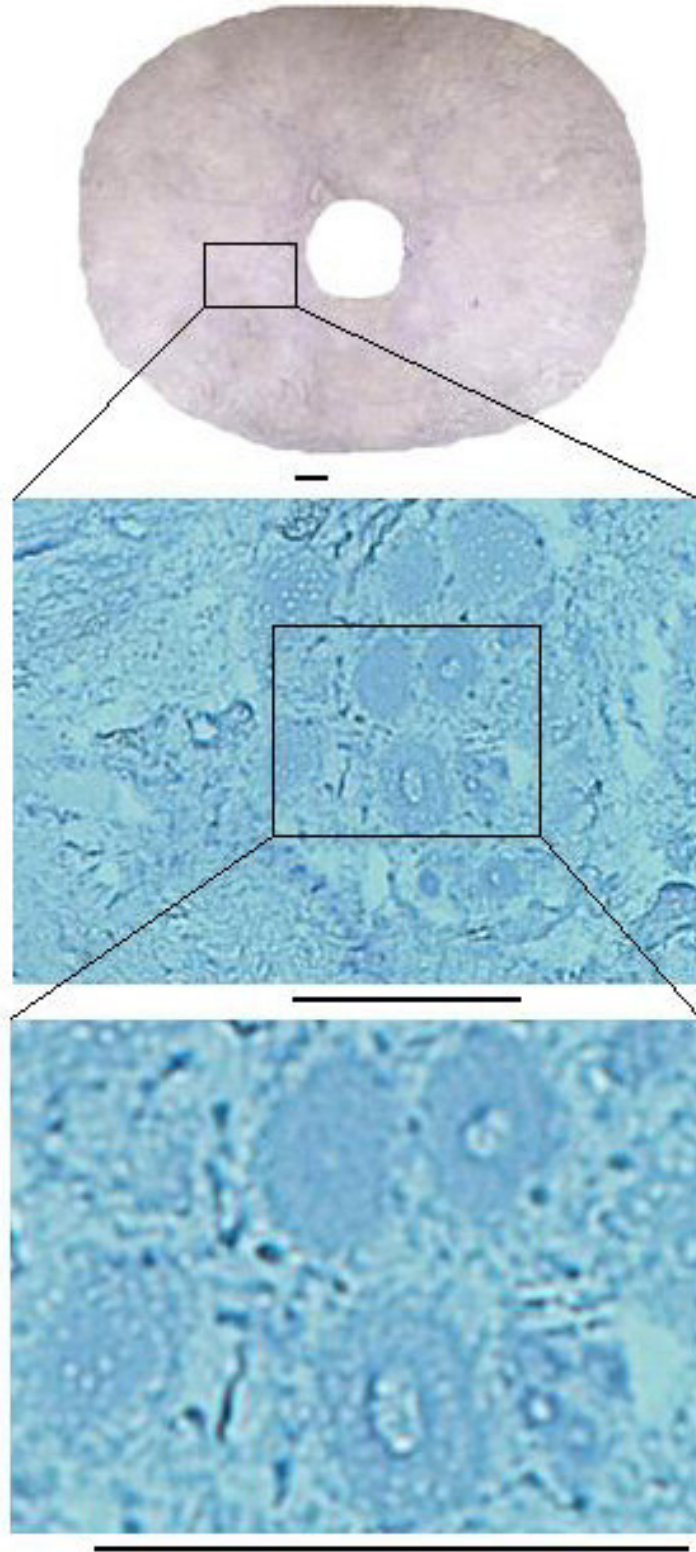
araştırma grubu, *H. americanus* sinir sistemindeki FMRF-amid lokalizasyonunu yapmıştır [70]. Bu araştırmacılar tarafından, torakal gangliyonda 5 - 50 µm çapında 75 - 80 arasında FMRF-amid bakımından immünopozitif sinir bulunmuştur. Aynı araştırmacılar tarafından, FMRF-amid immünoaktivitesinin torakal bölgede 2.03 pmol/mg protein olarak bulunmuştur. Başka bir araştırmacı tarafından, RIA ve bioassay yöntemleri kullanılarak *C. sapidus* perikardial organ ve torakal ganglion ekstraktlarından FMRF-amid benzeri bir peptit izole edilmiş ve amino asit dizisi belirlenmiştir [66].



Şekil 4.30. Lös-enk ve FMRF-amid'in *C. sapidus* torakal gangliyon dokusu radyal kesitindeki şematik lokalizasyonları; □: Lös-enk erkek, ☆: Lös-enk dişi, Δ: FMRF-amid erkek, ○: FMRF-amid dişi.



Şekil 4.31. Lös-enk'in *C. sapidus* torakal gangliyon dokusu radyal kesitindeki immünopozitifliği (Skala 150 μ m).



Şekil 4.32. *C. sapidus* torakal gangliyon radyal kesitinde negatif kontrol (Skala 150 μm).

4.1.9. *C. sapidus* Bağırsak Dokusunda Lös-Enk ve FMRF-amid'in Lokalizasyonları

Bağırsak dokudan, enine ve boyuna kesit alınarak immünohistokimyasal işaretleme yapılmıştır. Yengeç erkek bağırsak dokusunda boyanan hücrelerden, enine kesitte 397 lös-enk bakımından pozitif, 118 negatif, boyuna kesitte 415 pozitif, 120 negatif, dişilerde enine kesitte 522 pozitif, 52 negatif, boyuna kesitte 597 pozitif, 80 negatif hücre tespit edilmiştir. FMRF-amid bakımından ise, erkeklerde enine kesitte boyanan hücrelerden, 582 pozitif, 52 negatif, boyuna kesitte 880 pozitif, 41 negatif, dişilerde enine kesitte 563 pozitif, 41 negatif, boyuna kesitte 687 pozitif, 34 negatif hücre bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, lös-enk erkeklerde enine ve boyuna kesitte %77, dişilerde ise enine kesitte %90, boyuna kesitte %88 oranında immünopozitiflik meydana getirmiştir. FMRF-amid enine kesitte erkeklerde %91, dişilerde %93, boyuna kesitte ise, erkeklerde ve dişilerde %95 oranında immünopozitif aktivite göstermiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. *C. sapidus* bağırsak dokusunda % immünopozitif değerleri

Eşey	Peptit Kesit	Lös-enk		FMRF-amid	
		$\bar{X} \pm S_x$	•	$\bar{X} \pm S_x$	•
Erkek (n=3)	Enine	77,02 ± 0.0185	Aax	91,85 ± 0.0081	Aay
	Boyuna	77,41 ± 0.0317	Aax	95,54 ± 0.0035	Aby
Dişi (n=3)	Enine	90,90 ± 0.0126	Bax	93,27 ± 0.0068	Aay
	Boyuna	88,19 ± 0.0107	Bax	95,31 ± 0.0032	Aby

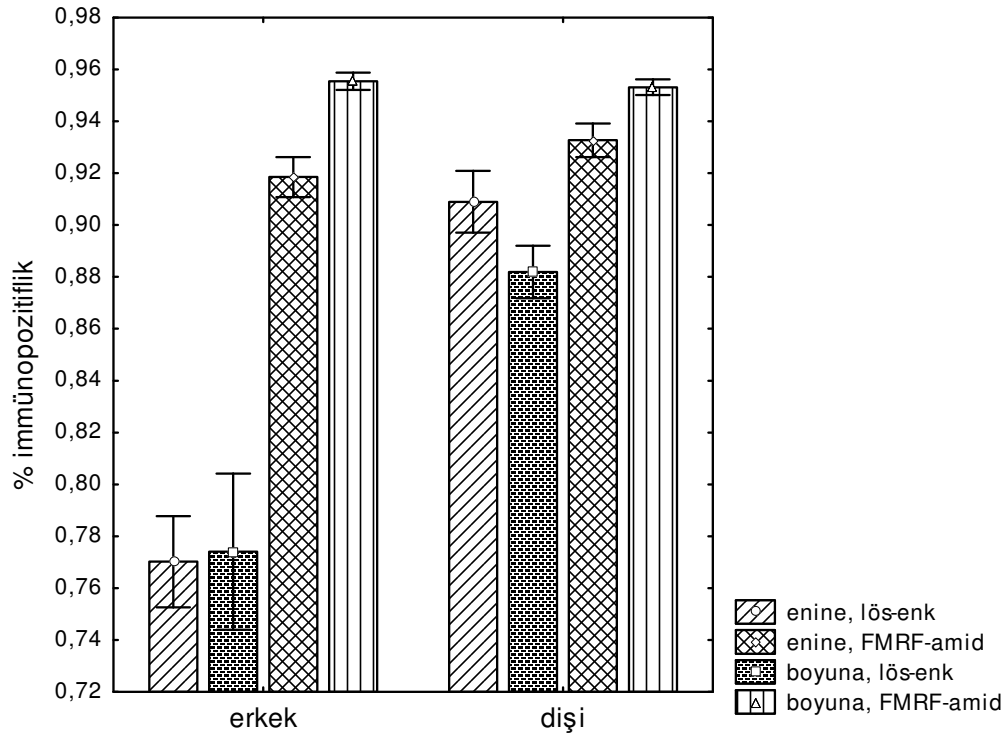
$\bar{X} \pm S_x$ = Aritmetik ortalama ± standart sapma.

• = Tukey HSD Post Hoc Test; A ve B eşeyler, a ve b kesitler, x ve y peptitler arası ayrımı belirtmek için kullanılmıştır.

Farklı harflerle gösterilen verilerde kesitler arasında $P < 0.05$, eşey ve peptitler arasında ise, $p < 0.001$ düzeyinde ayrım vardır.

Yengeç bağırsak dokusunda eşey-peptit-kesit etkileşimi, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,569$). İkili etkileşimler incelendiğinde ise kesit-peptit ($p=0,007^{**}$) ve eşey-peptit ($p=0,000^{***}$) etkileşimleri anlamlı bulunurken, eşey-kesit ($p=0,083$) etkileşimi anlamlı bulunmamıştır. Kesit-peptit etkileşimleri için yapılan post-hoc test sonucuna göre, erkek ve dişi yengeçlerden, enine ve boyuna kesit alınmış bağırsak dokularında, FMRF-amid'in immünopozitiflik oranı lös-enk'den anlamlı biçimde fazladır ($p=0,000^{***}$). Her iki eşeyde, enine ve boyuna kesit alınmış bağırsak dokuları arasında lös-enk bakımından anlamlı farklılık yoktur ($p=0,594$). Bununla beraber, FMRF-amid'in immünoreaktivitesi her iki eşeyden, boyuna kesit alınmış bağırsak dokularında, enine kesite göre anlamlı biçimde fazla bulunmuştur ($p=0,032^{*}$). Eşey-peptit etkileşimleri için yapılan post-hoc test sonucuna göre, dişi yengeçlerin enine ve boyuna kesit alınmış bağırsak dokularındaki lös-enk immünoreaktivitesi, erkeklere göre istatistiksel açıdan önemli biçimde fazladır ($p=0,000^{***}$). Bununla beraber, her iki eşeyin, enine ve boyuna kesit alınmış bağırsak dokuları arasında, FMRF-amid bakımından anlamlı farklılık yoktur ($p=0,915$). Buna karşılık, erkek yengeçlerin enine ve boyuna kesit alınmış bağırsak dokularındaki FMRF-amid'in immünopozitiflik oranı, lös-enk'e göre anlamlı biçimde fazladır ($p=0,000^{***}$). Benzer şekilde, dişi yengeçlerin enine ve boyuna kesit alınmış bağırsak dokularındaki FMRF-amid'in immünopozitiflik oranı, lös-enk'e göre, önemli biçimde fazla bulunmuştur ($p=0,001^{***}$). Bu verilere dayanarak, lös-enk ve FMRF-amid'in yengeç bağırsak dokusunda lokalize edilmesi, bu iki peptitin bağırsak dokusunda sentezlendiğini ve fizyolojik etkilerinin bulunduğunu ortaya koymaktadır (Şekil 4.33). Her iki eşeyin bağırsak dokusunda, FMRF-amid'in lös-enk'e göre önemli biçimde immünopozitiflik göstermesi, FMRF-amid'in bağırsak dokusunda daha fazla biyolojik etkilerinin olduğuna işaret etmektedir [41, 80, 81]. Yengeç bağırsak dokusunun, eşeyler arasında lös-enk bakımından karşılaştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bununla beraber, lös-enk'in dişi yengeçlerin bağırsak dokusunda erkeklerden önemli biçimde daha fazla immünoreaktivite göstermesi, dişi yengeçlerin eşeyşel özelliklerinden dolayı bağırsak epitelinde lös-enk'i daha fazla sentezlediklerine işaret etmektedir (Şekil 4.33, 4.34, 4.35, 4.36, 4.37). Ayrıca, FMRF-amid'in erkek ve dişi yengeçlerin boyuna kesit alınmış bağırsak

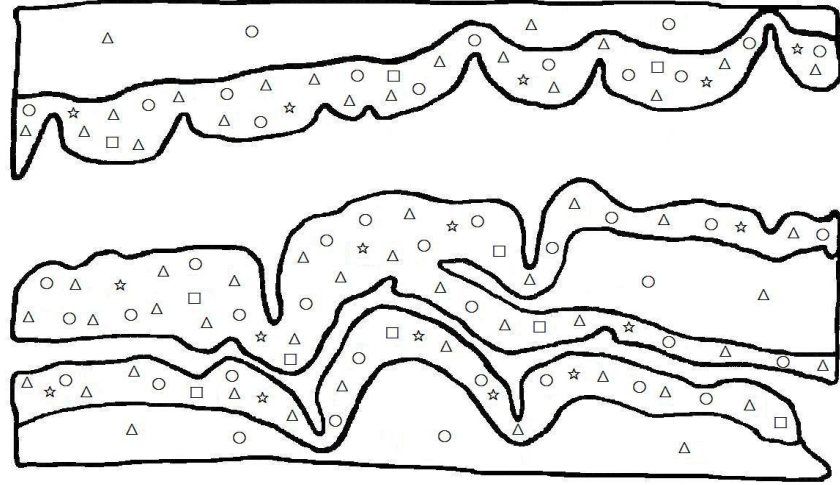
dokusunda, enine kesite göre daha fazla immünopozitiflik göstermesi, FMRF-amid'in boyuna kesitte, daha geniş bir bölgeyi işaretlemesinden ve dolayısı ile daha fazla hücrenin sayılmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Negatif kontrolde ise, spesifik bir işaretleme meydana gelmemiştir (Şekil 4.38).



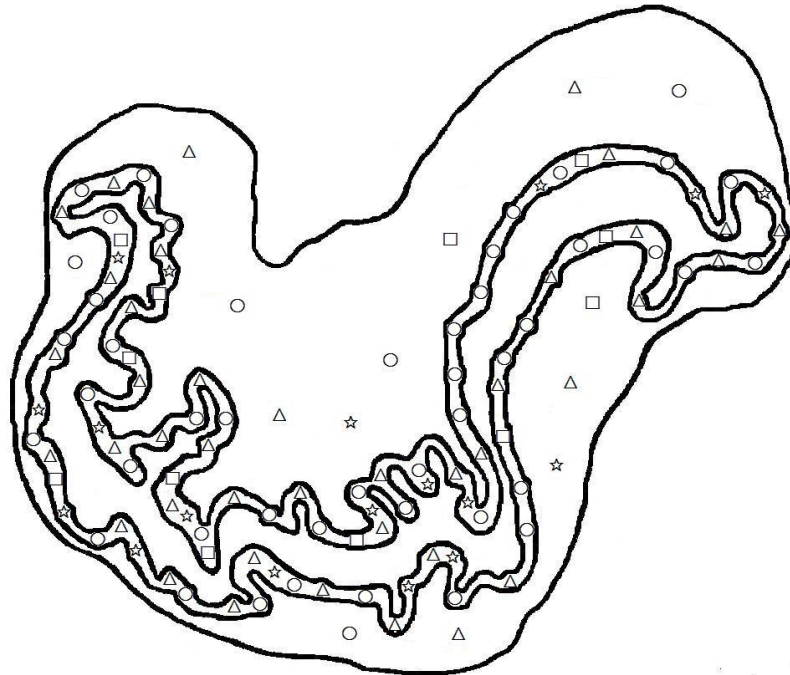
Şekil 4.33. L-senk ve FMRF-amid'in *C. sapidus* bağırsak dokusundaki lokalizasyonları.

Mercier ve ark. [80], *P. clarkii* merkezi ve periferik sinir sisteminde, FMRF-amid lokalizasyonlarını bulmuşlardır. Bu araştırmacılar tarafından, merkezi sinir sisteminin akson ve hücre gövdeleri, torakal gangliyon, perikardial organ, ince bağırsak ve son bağırsak sinirlerinde FMRF-amid lokalize edilmiştir. Aynı araştırmacılar tarafından, perikardial organ, kalp, ince bağırsak, son bağırsak, ekstensör sinirler, ekstensör kaslardan FMRF-amid izole edilmiştir. Diğer bir araştırma grubu, *O. mykiss*, pilorik çekum ve bağırsak dokusunda serotonin, somatostatin-25, bombesin, C-bombesin, P maddesi, salmon PP, NPY, PYY, PP, glukagon, GLP1, met-enk ve CCK varlığını kanıtlamıştır [81]. Bu araştırmacılar tarafından, glukagon ve GLP1'in aynı

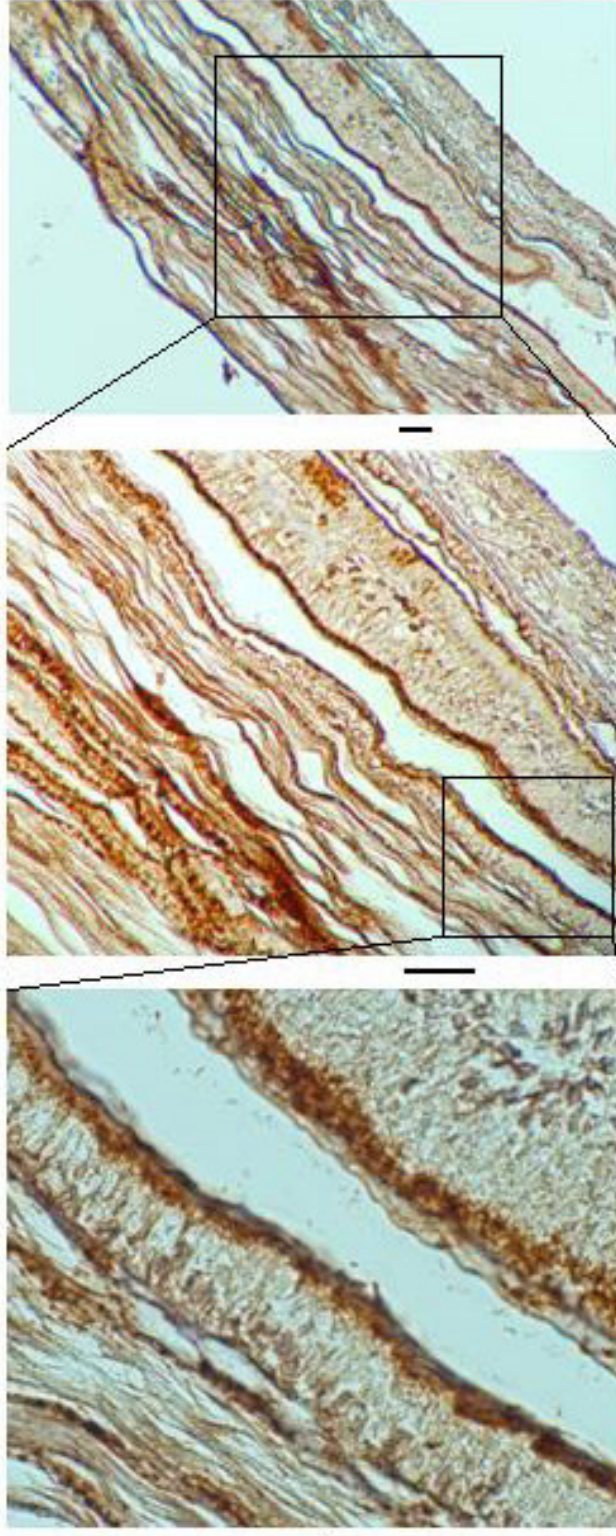
hücrede bulunduğu gözlemlenmiştir. Valverde ve ark. [41] ise, *R. temporaria* bağırsaklarının kas tabakası sinir fiberlerinde, VIP ve met-enk varlığını göstermişlerdir.



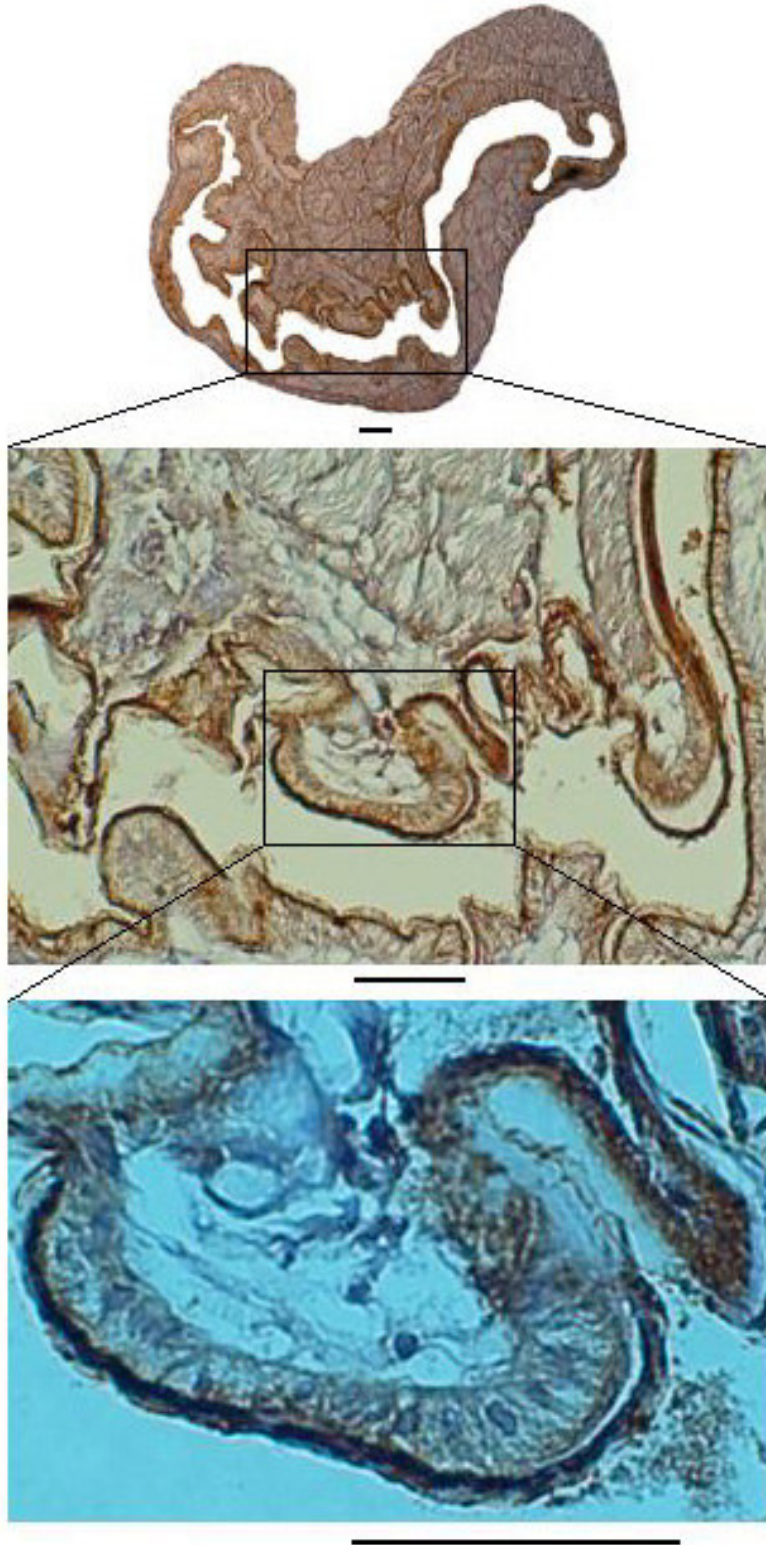
Şekil 4.34. Lös-enk ve FMRF-amid'in *C. sapidus* bağırsak doku boyuna kesitindeki şematik lokalizasyonları; □: Lös-enk erkek, ☆: Lös-enk dişi, Δ: FMRF-amid erkek, ○: FMRF-amid dişi.



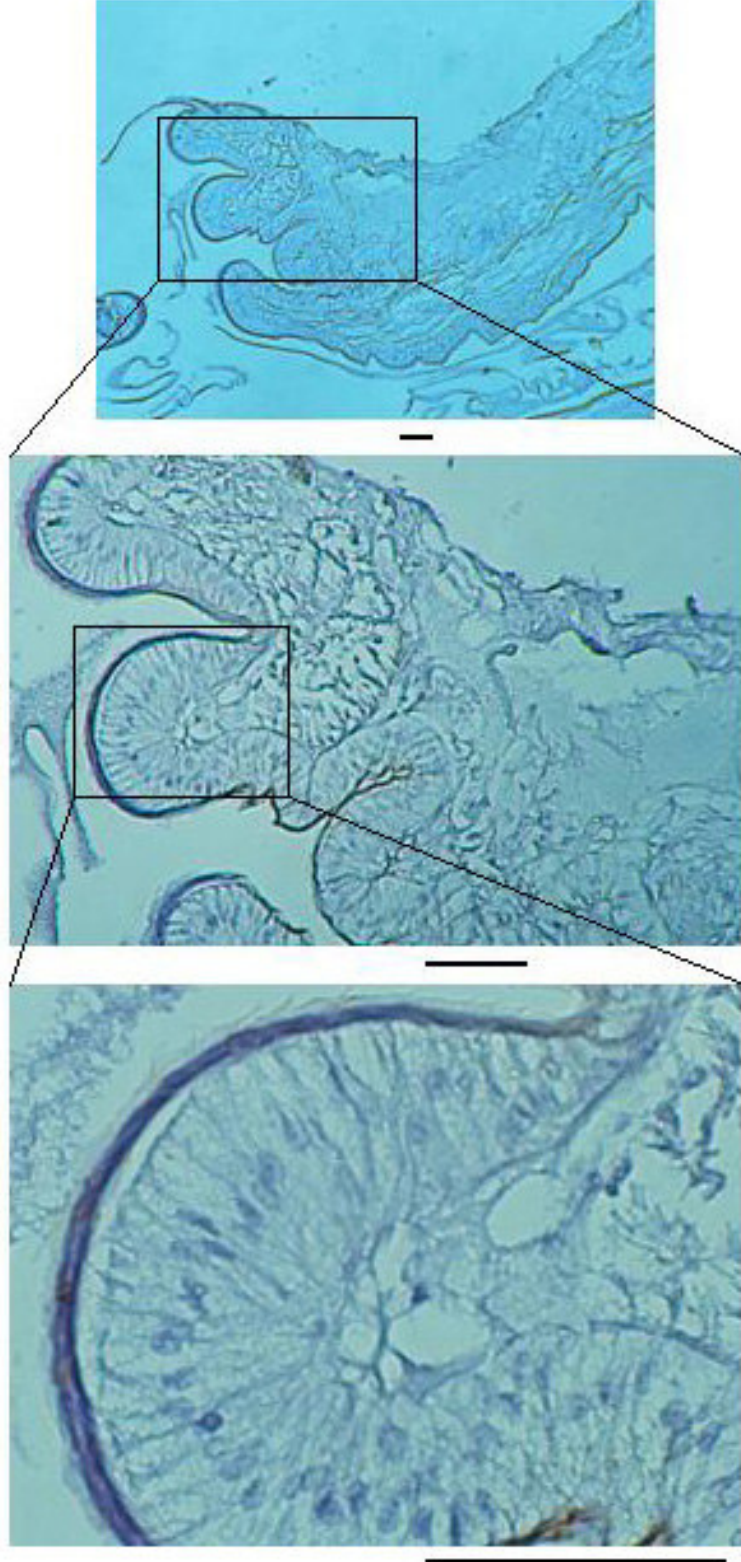
Şekil 4.35. Lös-enk ve FMRF-amid'in *C. sapidus* bağırsak doku enine kesitindeki şematik lokalizasyonları; □: Lös-enk erkek, ☆: Lös-enk dişi, Δ: FMRF-amid erkek, ○: FMRF-amid dişi.



Şekil 4.36. FMRF-amid'in *C. sapidus* bağırsak dokusu boyuna kesitindeki immünopozitifliği (Skala 200 µm).



Şekil 4.37. Lös-enk'in *C. sapidus* bağırsak dokusu enine kesitindeki immünopozitifliği (Skala 100 µm).



Şekil 4.38. *C. sapidus* bağırsak dokusu boyuna kesitinde negatif kontrol (Skala 200 μm).

4.1.10. *R. ridibunda* ve *C. sapidus* Beyin Dokusunda Lös-Enk ile FMRF-amid'in Lokalizasyonları

Kurbağa erkek beyin dokusunda boyanan hücrelerden, 11755 lös-enk bakımından pozitif, 710 negatif, dişilerde 9582 pozitif, 563 negatif hücre tespit edilmiştir. FMRF-amid bakımından ise, erkeklerde boyanan hücrelerden 8848 pozitif, 371 negatif, dişilerde 13142 pozitif 570 negatif hücre bulunmuştur. Erkek yengeçlerin beyin dokusunda boyanan hücrelerden, 373 lös-enk bakımından pozitif, 24 negatif, dişilerde 491 pozitif, 29 negatif hücre tespit edilmiştir. FMRF-amid bakımından ise, erkeklerde boyanan hücrelerden 633 pozitif, 44 negatif, dişilerde 689 pozitif 58 negatif hücre bulunmuştur. Buna göre, lös-enk kurbağa ve yengeçlerin beyin dokusunda, her iki eşeyde de %94 oranında immünopozitiflik göstermiştir. FMRF-amid kurbağaların beyin dokusunda her iki eşeyde %95 immünopozitiflik gösterirken, yengeçlerin beyin dokusunda ise erkeklerde %93, dişilerde %92 oranında immünopozitiflik göstermiştir (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. *R. ridibunda* ile *C. sapidus* beyin dokularında % immünopozitif değerleri

Canlı grubu (n=3)	Peptit	Lös-enk		FMRF-amid	
		$\bar{X} \pm S_x$	•	$\bar{X} \pm S_x$	•
Kurbağa	Erkek	94,30 ± 0.0044	Aax	95,96 ± 0.0016	Aay
	Dişi	94,56 ± 0.0097	Aax	95,83 ± 0.0021	Aay
Yengeç	Erkek	94,00 ± 0.0076	Aax	93,46 ± 0.0100	Bay
	Dişi	94,33 ± 0.0088	Aax	92,19 ± 0.0092	Bay

$\bar{X} \pm S_x$ = Aritmetik ortalama ± standart sapma.

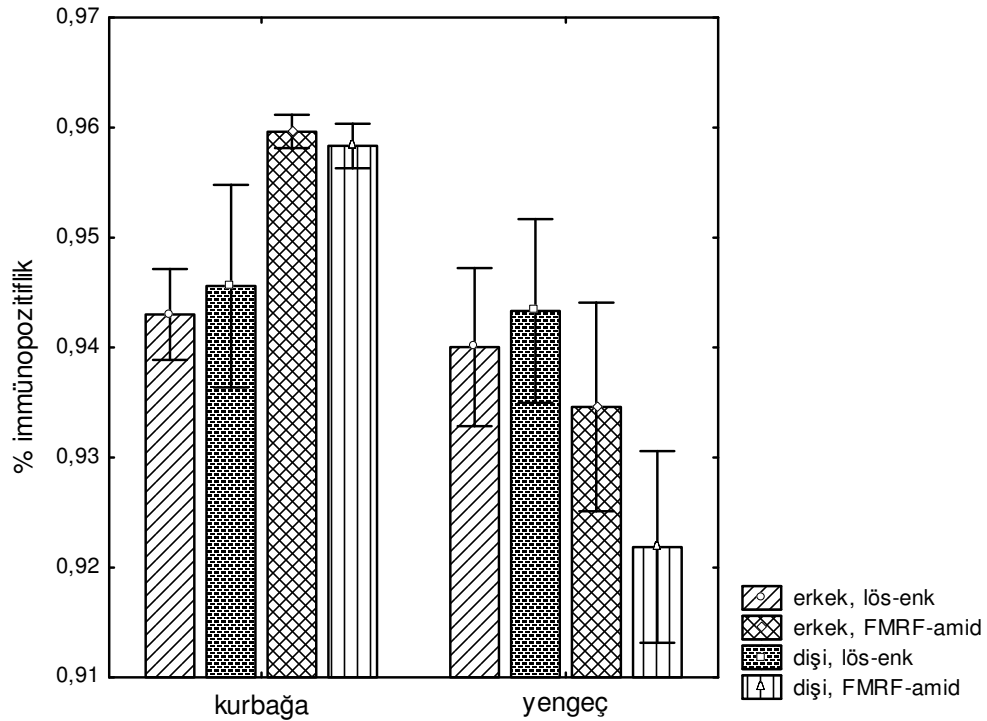
• = Tukey HSD Post Hoc Test; A ve B canlı grubu, a eşeyler, x ve y peptitler arası ayrımı belirtmek için kullanılmıştır.

Farklı harflerle gösterilen verilerde eşeyler ve peptitler arasında P<0.05, canlı grupları arasında ise, p<0.001 düzeyinde ayırım vardır.

Yengeç ve kurbağaların beyin dokusunda, canlı-eşey-peptit etkileşimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,327$). İkili etkileşimler incelendiğinde ise, eşey-peptit ($p=0,119$) ve canlı-eşey ($p=0,386$) etkileşimleri anlamlı bulunmazken canlı-peptit ($p=0,000$) etkileşimi anlamlı bulunmuştur. Canlı-peptit etkileşimine ait post-hoc test sonucuna göre, erkek ve dişi kurbağaların beyin dokusu boyuna kesitinde FMRF-amid'in immünopozitiflik oranı, lös-enk'den anlamlı biçimde fazla bulunmuştur ($p=0,017^*$). Bununla beraber, erkek ve dişi yengeçlerin beyin dokusu boyuna kesitinde lös-enk'in immünopozitiflik oranı, FMRF-amid'e göre anlamlı biçimde fazla bulunmuştur ($p=0,028^*$). Kurbağa ve yengeç beyin dokuları arasında, lös-enk bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,928$). Bununla beraber, FMRF-amid erkek ve dişi kurbağa beyin dokusunda, yengeç beyinine göre anlamlı biçimde daha fazla immünopozitiflik göstermiştir ($p=0,000^{***}$). Bu verilere göre, lös-enk ve FMRF-amid'in, kurbağa ve yengeç beyin dokularında yüksek düzeyde immünoreaktivite göstermesi, bu iki peptitin beyin dokusunda nöronal aktivitesinin bulunduğunu göstermektedir. Lös-enk'in her iki canlı grubunda meydana getirdiği immünopozitiflik birbirinden farklı değildir. FMRF-amid'in, kurbağa beyininde her iki eşeyde de lös-enk'e göre daha fazla immünoreaktivite göstermesi, FMRF-amid'in beyin dokusunda, daha fazla fizyolojik rolünün olduğunu ortaya koymaktadır (Şekil 4.39). Bununla beraber, lös-enk'in yengeç beyininde iki eşeyde de FMRF-amid'e göre, önemli biçimde daha fazla immünoreaktivite göstermesi, lös-enk'in beyin dokusunda nöronal aktivitesinin daha fazla olduğuna işaret etmektedir. FMRF-amid'in her iki eşey için, kurbağa beyininde yengeç beyinine göre önemli bir şekilde daha fazla immünopozitiflik göstermesi, kurbağa beyin merkezlerinde nöromodülatör rolünün daha fazla olduğunu göstermektedir [41, 46, 60, 68, 69, 75].

Lazar [46], kurbağa, balık ve sürüngen sinir sistemlerinde, lös-enk ve FMRF-amid lokalizasyonlarını gösteren derleme çalışması yapmıştır. Bu araştırmacının belirttiğine göre, kurbağalarda Pinelli ve ark. (1999) *R. esculenta*, *Pipa pipa*, *T. carciflex*, *T. vulgaris* ve *C. ornata* beyini enine kesitlerinde büyük beyin, ara beyin ve orta beyinde FMRF-amid bakımından zengin nöronlar bulmuşlardır. Aynı

araştırmacının belirttiğine göre, Kuljis ve Katren (1982) *R. pipiens*, Merchantaler ve ark. (1989) *R. esculenta* ve *L. moorei* beyini enine kesitlerinde, büyük beyin ve orta beyinde ls-enk'i lokalize etmişlerdir. Ayrıca, bu araştırmacının belirttiğine göre balıklarda Vecino ve ark. (1992) *O. mykiss* beyininde ls-enk, Fujii ve Kobayashi (1992) *C. auratus*, Pestarino ve Vallario (1996) *C. esox* beyininde FMRF-amid, sürüngenlerde Medina ve Smeets (1992) *G. gecko* ve *G. galloti* beyininde ls-enk, Vallario ve ark. (1994) *P. sicula* beyininde, D'Aniello ve ark. (1999) ise *C. crocodilus* sinir fiberlerinde FMRF-amid bakımından zengin nöronlar bulmuşlardır. Evrimsel ilişkiler göz önüne alındığında, canlıların ortak kökenden geldiği, canlıların çoğunda kalıtım materyalinin DNA olduğu, fizyolojik, biyokimyasal, filogenetik, anatomik ve histolojik birçok benzer hücresel organizasyona sahip oldukları bilinmektedir. Bu peptitlerin sinir sistemi başta olmak üzere, hayvansal organizmaların birçok dokusunda, çeşitli düzey ve miktarlarda bulunduğu yapılan bilimsel araştırmalar sonucu kanıtlanmıştır [19, 23, 37, 38, 41, 46, 54, 60, 67, 68, 69, 70, 72, 75, 80].



şekil 4.39. Ls-Enk ile FMRF-amid immünoreaktivitesinin *R. ridibunda* ve *C. sapidus* beyin dokularındaki karşılaştırılması.

4.1.11. *R. ridibunda* Omurilik ve *C. sapidus* Torakal Gangliyon Dokusunda Lös-Enk ile FMRF-amid'in Lokalizasyonları

Kurbağa erkek omurilik dokusunda boyanan hücrelerden, 9548 lös-enk bakımından pozitif, 706 negatif, dişilerde 10079 pozitif, 967 negatif hücre tespit edilmiştir. FMRF-amid bakımından ise, erkeklerde boyanan hücrelerden 12136 pozitif, 710 negatif, dişilerde 12898 pozitif, 707 negatif hücre bulunmuştur. Erkek yengeçlerin torakal gangliyon dokusunda boyanan hücrelerden, 2719 lös-enk bakımından pozitif, 171 negatif, dişilerde 3344 pozitif, 186 negatif hücre tespit edilmiştir. FMRF-amid bakımından ise, erkeklerde boyanan hücrelerden 3719 pozitif, 262 negatif, dişilerde 3876 pozitif 319 negatif hücre bulunmuştur. Bu verilere göre, lös-enk kurbağaların omurilik dokusu erkek bireylerinde %92 oranında immünoreaktivite gösterirken, dişilerde ise bu oran %90 olmuştur. Lös-enk yengeçlerin torakal gangliyon dokusunda her iki eşeyde de %94 oranında immünoreaktivite göstermiştir. FMRF-amid kurbağa omurilik dokusu her iki eşeyde de %94 oranında immünoreaktivite göstermiştir. FMRF-amid yengeçlerin torakal gangliyon dokusunda erkeklerde %93, dişilerde ise %92 immünoreaktivite meydana getirmiştir (Çizelge 4.11). Kurbağa omurilik dokusu ile yengeç torakal gangliyon karşılaştırıldığı zaman, canlı-eşey-peptit etkileşimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. İkili etkileşimler incelendiğinde ise, eşey-peptit ($p=0,673$) ve canlı-eşey ($p=0,486$) etkileşimleri anlamlı bulunmazken, canlı-peptit etkileşimi anlamlı bulunmuştur ($p=0,000***$). Canlı-eşey-peptit etkileşimine ait post-hoc test sonucuna göre, kurbağa erkek omurilik dokusunda lös-enk ile FMRF-amid arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,552$). Bununla beraber, kurbağa dişi omurilik dokusunda, FMRF-amid'in immünopozitiflik oranı, lös-enk'den anlamlı biçimde fazla bulunmuştur ($p=0,004**$). Erkek yengeçlerin torakal gangliyon dokusunda, lös-enk ile FMRF-amid arasında anlamlı fark yoktur ($p=0,991$). Benzer şekilde, dişi yengeçlerin torakal gangliyon dokusunda, lös-enk ile FMRF-amid arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,172$). Erkek kurbağaların omurilik dokusu ile erkek yengeçlerin torakal gangliyon dokusu arasında lös-enk bakımından anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0,829$). Benzer şekilde, erkek kurbağaların omurilik dokusu ile erkek yengeçlerin

torakal gangliyon dokusu arasında, FMRF-amid bakımından anlamlı bir fark yoktur ($p=0,889$). Dişi yengeçlerin torakal gangliyon dokusundaki lös-enk'in immünopozitiflik oranı, dişi kurbağa omurilik dokusundan istatistiksel olarak anlamlı biçimde fazladır ($p=0,006^{**}$). Bununla beraber, dişi kurbağaların omurilik dokusu ile dişi yengeçlerin torakal gangliyon dokusu arasında, FMRF-amid bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,120$).

Çizelge 4.11. *R. ridibunda* omurilik dokusu ile *C. sapidus* torakal gangliyon dokusunda % immünopozitif değerleri

Canlı grubu	Peptit Eşey	Lös-enk		FMRF-amid	
		$\bar{X} \pm S_x$	•	$\bar{X} \pm S_x$	•
Kurbağa (n=3)	Erkek	92,90 ± 0.0109	Aax	94,46 ± 0.0015	Aax
	Dişi	90,98 ± 0.0217	Aax	94,81 ± 0.0038	Aay
Yengeç (n=3)	Erkek	94,06 ± 0.0043	Aax	93,41 ± 0.0026	Aax
	Dişi	94,64 ± 0.0066	Bax	92,40 ± 0.0099	Aax

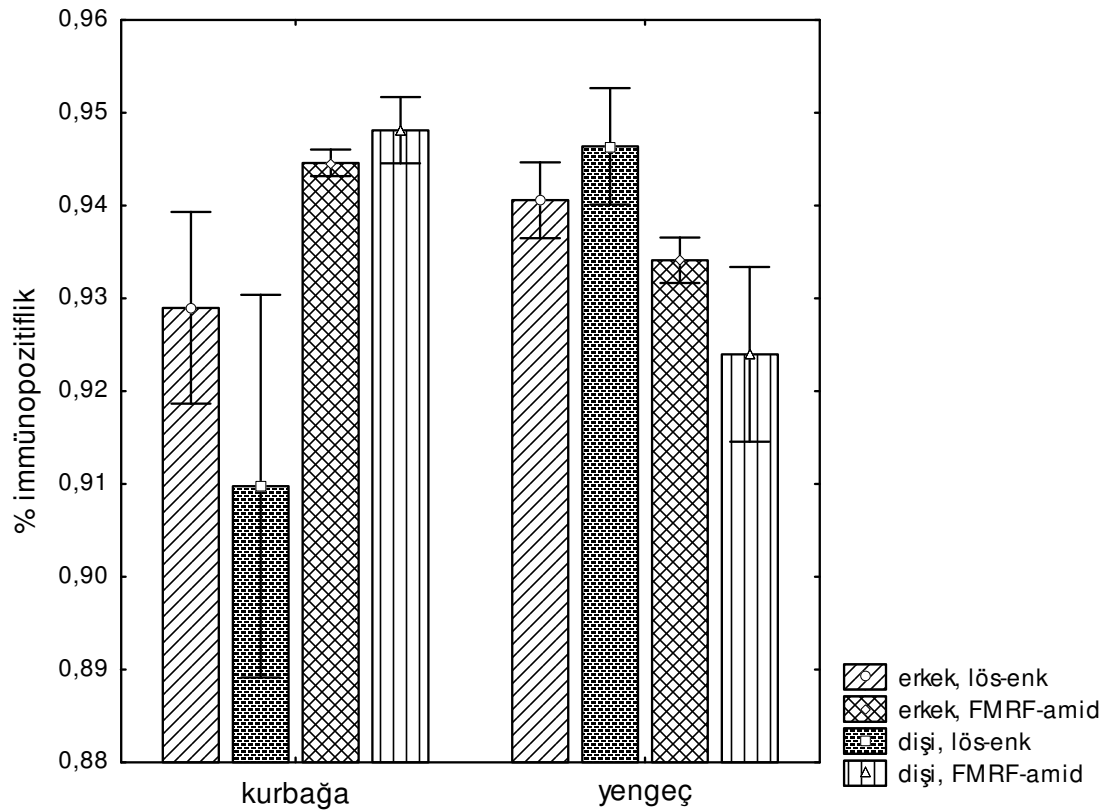
$\bar{X} \pm S_x$ = Aritmetik ortalama ± standart sapma.

• = Tukey HSD Post Hoc Test; A ve B canlı grubu, a eşeyler, x ve y peptitler arası ayrımı belirtmek için kullanılmıştır.

Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P < 0.01$ düzeyinde ayırım vardır.

Yapılan literatür araştırmasına göre, lös-enk ve FMRF-amid bakımından, kurbağa omurilik dokusu ile yengeç torakal gangliyon dokusunun karşılaştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Omurgalı hayvanlarda, beyin ile birlikte omurilik de merkezi sinir sisteminin bir parçasıdır. Omurgasızlarda ise, omurgalıların aksine merkezi sinir sistemi, belirli bir bölgede lokalize olmamıştır. Yengeçlerde merkezi sinir sistemi, bütün vücuda yayıldığından dolayı, beyin ve göz sapının yanında, torakal gangliyon da merkezi sinir sisteminin bir parçası olarak kabul edilir [12, 13, 14]. Kurbağa omuriliğinin her iki eşeyinde, FMRF-amid'in meydana getirdiği

immünopozitiflik, yengeç torakal gangliyonundan farklı değildir. Bununla birlikte, FMRF-amid'in dişi kurbağaların omuriliğinde, lös-enk'e göre daha fazla immünoaktivite taşıması, FMRF-amid'in omurilik dokusunda daha fazla nöronal aktivite meydana getirdiğini ortaya koymaktadır (Şekil 4.40). Lös-enk'in, dişi yengeçlerin torakal gangliyon dokusunda, kurbağaların omurilik dokusuna göre daha fazla immünopozitiflik meydana getirmesi, dişi yengeçlerin torakal gangliyon dokusunun ağrıya karşı daha dirençli olduğunu göstermektedir [12, 13, 14].



Şekil 4.40. Lös-enk ile FMRF-amid immünoaktivitesinin *R. ridibunda* omuriliği ve *C. sapidus* torakal gangliyon dokularındaki karşılaştırılması.

Stevens ve ark. [26], *R. pipiens* omuriliğinde met-enk, β -endorfin ve dinorfin varlığını bulmuşlardır. Başka bir araştırma grubu, Sprague/Dawley ratlarının omuriliğinde FMRF-amid varlığını göstermiştir [56]. Williams ve ark. [57], ratların beyin, omurilik ve hipofizinde FMRF-amid'i lokalize etmişlerdir. Bu araştırmacılar

tarafından, beyinin yanı sıra, beyin sapı, omuriliğin dorsal ve ventral boynuz bölgeleri ile hipofizin nöral lob bölgelerinde FMRF-amid'in lokalize olduğu gözlemlenmiştir. Lüschen ve ark. [68] ise, *C. maenas* torakal gangliyon ekstraktlarından, 3 pmol lös-enk ve 1 pmol met-enk izole etmişlerdir. Bu araştırmacılar tarafından göz sapında, serebral gangliyonda ve torakal gangliyonda enkefalin varlığı gösterilmiştir. Diğer bir araştırma grubu tarafından, *H. americanus* sinir sisteminde FMRF-amid lokalizasyonu yapılmıştır [70]. Bu araştırmacılar, optik sinirle bağlantılı olarak beyinin optik nöropil bölgesinde 5 - 15 µm çapında 60 - 75, CEG'da 5 - 50 µm çapında 8 - 12, SEG'da 10 - 80 µm çapında 80 - 90, torakal gangliyonda 5 - 50 µm çapında 75 - 80, abdominal gangliyonda 100 - 150 µm çapında 80 - 90 arasında FMRF-amid bakımından immünopozitif sinir bulmuşlardır. Aynı araştırmacılar tarafından, RIA yöntemi kullanılarak, FMRF-amid immünoaktivitesinin göz sapında 0.64 pmol/mg, beyinde 2.15 pmol/mg, torakal bölgede 2.03 pmol/mg, abdominal bölgede 1.42 pmol/mg ve kalpte 1.09 pmol/mg protein olarak bulunmuştur. Canlılar ortak kökenden gelmişlerdir ve evrimsel gerçekler incelendiğinde omurgalı ve omurgasızlar arasında bazı benzerliklerin olduğu göze çarpmaktadır. Bu yakınlık, canlıların kalıtım materyali olarak DNA taşımaları ve benzer fizyolojik, biyokimyasal, filogenetik, anatomik, sitolojik ve histolojik özelliklere sahip olmalarından kaynaklanmaktadır. Bir opioid peptit olan lös-enk ve bir kardiyookaktif peptit olan FMRF-amid amino asitlerden oluşmuş protein yapısında olduklarından, ortak köken ve evrimsel ilişkiler bunlar için de geçerlidir. Bu peptitlerin sinir sistemi başta olmak üzere hayvansal organizmaların birçok dokusunda çeşitli düzey ve miktarlarda bulunduğu yapılan bilimsel araştırmalar sonucu kanıtlanmıştır [19, 23, 37, 38, 41, 46, 54, 60, 67, 68, 69, 70, 72, 75, 80].

Bu bilgiler ışığında lös-enk ve FMRF-amid'in, *R. ridibunda* sinir sistemi ve *C. sapidus* sinir sistemi ile bağırsak dokusunda lokalize edilmeleri, literatür verileri ile uyumludur.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak opioid peptit olan lös-enk ve kardiyookaktif peptit olan FMRF-amid'in, *R. ridibunda* beyin, omurilik ve siyatik sinir dokuları ile *C. sapidus* beyin, göz sapı, torakal gangliyon ve bağırsak dokularındaki lokalizasyonları belirlenmiştir.

Her iki peptit omurgalı olan kurbağa ve omurgasız olan yengeç dokularında yüksek düzeyde immünopozitiflik göstermiştir. Lös-enk, %97 ile en fazla *R. ridibunda* erkek siyatik sinirinde immünopozitiflik oluştururken, %77 ile en düşük *C. sapidus* erkek bağırsak dokusunda immünoaktivite göstermiştir. FMRF-amid ise, %96 ile en yüksek *R. ridibunda* dişi beyin, omurilik ve her iki eşeyin siyatik sinirinde immünoaktivite meydana getirirken, %91 ile en düşük düzeyde *C. sapidus* erkek bağırsak dokusunda immünopozitiflik göstermiştir.

FMRF-amid, kurbağa beyin, omurilik ve siyatik sinir dokularında lös-enk'e göre daha fazla immünoaktivite oluşturmuştur. Lös-enk, dişi kurbağa beyin dokusunda erkeklere göre daha fazla immünopozitiflik gösterirken, erkek kurbağa siyatik sinirinde dişilere göre daha yüksek düzeyde immünoaktivite meydana getirmiştir.

Lös-enk, yengeç beyin ve torakal gangliyon dokularında FMRF-amid'e göre daha yüksek düzeyde immünoaktivite oluştururken, FMRF-amid yengeç bağırsak dokusunda lös-enk'e göre daha fazla immünopozitiflik meydana getirmiştir. Lös-enk, dişi yengeçlerin bağırsak dokusunda erkeklere göre daha fazla immünopozitiflik meydana getirirken, her iki peptit, erkek yengeçlerin göz sapı bölgelerinden ON'de LG'ye göre daha yüksek düzeyde immünopozitiflik göstermiştir.

FMRF-amid, kurbağa beyin dokusunda, yengeçlere göre daha fazla immünoaktivite gösterirken, lös-enk kurbağa ve yengeç beyin dokuları arasında önemli bir farklılık oluşturmamıştır. Bununla beraber, lös-enk dişi yengeçlerin torakal

gangliyon dokusunda, dişi kurbağaların omurilik dokusuna göre daha fazla immünopozitiflik meydana getirirken, erkeklerde önemli bir farklılık göstermemiştir. FMRF-amid ise, kurbağa omurilik dokusu ile yengeç torakal gangliyon dokusu arasında önemli bir farklılık meydana getirmemiştir.

Lös-enk ve FMRF-amid fizyolojik rolleri olan oldukça önemli peptitlerdir. Lös-enk, tıp alanında uyuşturucu, yatıştırıcı, ağrı dindirici ve tedavi edici olarak kullanılmaktadır. FMRF-amid ise, omurgasızların kalbi üzerine uyarıcı bir etkiye sahiptir ve omurgalılarda, önemli fizyolojik rolleri vardır. Bu peptitlerin, omurgalı ve omurgasız hayvanlardan izole edilmeleri büyük önem taşımaktadır. Lös-enk ve FMRF-amid'in izole edilebilmesi için dokularda lokalize oldukları bölgelerin belirlenmesi gerekmektedir. Bu araştırma ile, lös-enk ve FMRF-amid'in kurbağa ve yengeç dokularındaki lokalizasyonları bulunmuştur. Bu peptitlerin, eşeyler arasında ve iki türün dokuları arasında karşılaştırıldığı herhangi bir araştırmanın olmaması, bu çalışmanın önemini ortaya koymaktadır. Bu çalışmanın, peptitlerle ilgili literatürde önemli bir boşluğu dolduracağı ve immünohistokimya alanında daha sonra yapılacak olan çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M. "Pharmacology", Churchill Livingstone, London, 830 s., (1999).
- [2] Ertekin, C. "Nörolojide Fizyopatoloji ve Tedavi", Bilgehan Matbaası, İzmir, 833 s., (1987).
- [3] Kayaalp, O., "Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji", Hacettepe T.A.Ş., Ankara, 1751 s., (2000).
- [4] Bodnar, R.J. ve Klein, G.E. "Endogenous opiates and behavior: 2005", *Peptides*, **27**: 3391-3478, (2006).
- [5] Ozawa, A., Cai, Y. ve Lindberg, I. "Production of bioactive peptides in an in vitro system", *Analytical Biochemistry*, **366**: 182-189, (2007).
- [6] Nozaki, C. ve Kamei, J. "Possible involvement of opioidergic system in the antinociceptive effect of the selective serotonin reuptake inhibitors in sciatic nerve-injured mice", *European Journal of Pharmacology*, **552**: 99-104, (2006).
- [7] Özeti, N. ve Yılmaz, İ. "Türkiye Amfibileri", Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 221 s., (1994).
- [8] Demirsoy, A. "Türkiye Omurgalıları-Amfibiler", Meteksan A.Ş., Ankara, 69 s., (1996).
- [9] Baran, İ. ve Atatür, M.K. "Türkiye Herpetofaunası (Kurbağa ve Sürüngenler)", T.C. Çevre Bakanlığı, 214 s., Ankara, (1998).
- [10] Wyman, J. "Anatomy of the nervous system of *Rana pipiens*", Metcalf and Company, Volume 5, 67 s., Washington, (1852).
- [11] Fox, R. (30 Mayıs 2007). "Invertebrate anatomy online *Callinectes sapidus* (Blue crab with notes on *Cancer*)", Erişim: <http://webs.lander.edu/rsfox/invertebrates/callinectes.html>, [13 Temmuz 2007].
- [12] Demirsoy, A. "Yaşamın Temel Kuralları - Omurgasızlar - İnvertebrata (Böcekler Dışında)", Cilt II, Kısım I, Meteksan A.Ş., 1210 s., Ankara, (2001).

- [13] Fischer, W., Schneider, ve Bauchot, M.L. “Mediterranee Et Mer Noire-Vegetaux Et Invertebrates”, Commission des Communautés Europeennes, Volume 1, 760 s., Rome, (1987).
- [14] Bliss, D.E. ve Mantel, L.H. “The Biology of Crustacea – Integument, Pigments and Hormonal Processes”, Academic Press INC, Volume 9, 550 s., London, (1985).
- [15] Munoz, M., Martinez, A., Cuttitta, F. ve Gonzalez, A. “Distribution of adrenomedullin-like immunoreactivity in the central nervous system of the frog”, *Journal of Chemical Neuroanatomy*, **21**: 105-123, (2001).
- [16] Sabbieti, M.G., Marchetti, L., Menghi, G., Yamamoto, K., Kikuyama, S., Vaudry, H. ve Magni, A.P. “Occurrence of β -endorphin binding sites in the pituitary of the frog *Rana esculenta*: Effect of β -endorphin on luteinizing hormone secretion”, *General and Comparative Endocrinology*, **132**: 391-398, (2003).
- [17] Guglielmotti, V., Cristino, L., Sada, E. ve Bentivoglio, M. “The epithalamus of the developing and adult frog: Calretinin expression and habenular asymmetry in *Rana esculenta*”, *Brain Research*, **999**: 9-19, (2004).
- [18] Necchi, D., Soldani, C., Pisu, M.B., Bernocchi, G. ve Scherini, E. “Distribution of calretinin-like immunoreactivity in the brain of *Rana esculenta*”, *Journal of Chemical Neuroanatomy*, **16**: 233-243, (1999).
- [19] D’Aniello, B., Fiorentino, M., Pinelli, C., Di Meglio, M., Vallarino, M. ve Rastogi, R.K. “Distribution of FMRFamide-like immunoreactivity in the brain and pituitary of *Rana esculenta* during development”, *Developmental Brain Research*, **94**: 195-204, (1996).
- [20] Kozicz, T. ve Lazar, G. “Colocalization of GABA, enkephalin and neuropeptide Y in the tectum of the green frog *Rana esculenta*”, *Peptides*, **22**: 1071-1077, (2001).
- [21] Carratu, M.R., Dubois, J.M. ve Chieppa, D.M. “Block of sodium current in myelinated nerve fibre with enkephalins”, *Neuropharmacology*, **21**: 619-623, (1982).

- [22] Hu, Z., Lelievre, V., Rodriguez, W.I., Cheng, J.W. ve Waschek, J.A. "Comparative distributions of pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide and its selective type I receptor mRNA in the frog (*Xenopus laevis*) brain", *Regulatory Peptides*, **109**: 15-26, (2002).
- [23] Pinelli, C., D'Aniello, B., Polese, G. ve Rastogi, R.K. "Extrabulbar olfactory system and nervus terminalis FMRFamide immunoreactive components in *Xenopus laevis* ontogenesis", *Journal of Chemical Neuroanatomy*, **28**: 37-46, (2004).
- [24] Hernandez, C.J., Berrios, A. ve Chinapen, S. "Localization of substance P-like immunoreactivity in the palate and trigeminal ganglion of *Rana pipiens*", *Comparative Biochemistry and Physiology*, **C134**: 465-472, (2003).
- [25] Stevens, C.W. ve Rothe, K.S. "Supraspinal administration of opioids with selectivity for μ -, δ - and κ opioid receptors produces analgesia in amphibians", *European Journal of Pharmacology*, **331**: 15-21, (1997).
- [26] Stevens, C.W., Pezella, P.D. ve Yaksh, T.L. "Spinal antinociceptive action of three representative opioid peptides in frogs", *Brain Research*, **402**: 201-203, (1987).
- [27] Frank, G.B. ve Sudha, T.S. "Effects of enkephalin, applied intracellularly, on action potentials in vertebrate A and C nerve fibre axons", *Neuropharmacology*, **26(1)**: 61-66, (1987).
- [28] Tooyama, I., Abe, H., Renda, T.G. ve Kimura, H. "Production and immunohistochemical application of antiserum against Tyr-D-Ala-Phe, a N-terminal tripeptide common to dermorphin/deltorphin family", *Peptides*, **21**: 1649-1655, (2000).
- [29] Partata, W.A., Cerveira, J.F., Xavier, L.L., Viola, G.G. ve Achaval, M. "Sciatic nerve transection decrease substance P immunoreactivity in the lumbosacral spinal cord of the frog (*Rana catesbeiana*)", *Comparative Biochemistry and Physiology*, **B131**: 807-814, (2002).

- [30] Kanetoh, T., Sugikawa, T., Sasaki, I., Muneoka, Y., Minakata, H., Takabatake, I. ve Fujimoto, M. "Identification of a novel frog RFamide and its effect on the latency of the tail-flick response of the newt", *Comparative Biochemistry and Physiology*, **C134**: 259-266, (2003).
- [31] Torihashi, S. ve Kobayashi, S. "Somatostatin immunopositive neurons in the small intestine of the bullfrog (*Rana catesbeiana*)", *Acta Anatomica Nipponica*, **67**: 735-743, (1992).
- [32] Hirai, K. ve Katayama, Y. "Methionine enkephalin presynaptically facilitates and inhibits bullfrog sympathetic ganglionic transmission", *Brain Research*, **448**: 299-307, (1988).
- [33] Iwasaki, S., Iwabuchi, Y. ve Okumura, Y. "Histological and ultrastructural studies of effects of tachykinins on protein secretion from the lingual epithelium and the lingual gland of the Tokyo daruma pond frog (*Rana porosa porosa*)", *Archives of Oral Biology*, **43**: 463-471, (1998).
- [34] Mollereau, C., Pascaud, A., Baillat, G., Mazarguil, H., Puget, A. ve Meunier, J.C. "5'-guanylylimidodiphosphate decreases affinity for agonists and apparent molecular size of a frog brain opioid receptor in digitonin solution", *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, **263(34)**: 18003-18008, (1988).
- [35] Chartrel, N., Collin, F., Huang, Y.S., Montero, M., Tonon, M.C., Goos, H.J.T., Dufour, S. ve Vaudry, H. "Characterization and localization of two forms of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the spinal cord of the frog *Rana ridibunda*", *Cell and Tissue Research*, **293**: 235-243, (1998).
- [36] Soriani, O., Le Foll, F., Galas, L., Roman, F., Vaudry, H. ve Cazin, L. " σ -ligand (+)- pentazocine depresses M current and enhances calcium conductances in frog melanotrophs", *American Journal of Physiology*, **277(40)**: 73-80, (1999).
- [37] Çamlica, Y., Aşkin, A. ve Çömelekoğlu, Ü. "Evidence for the involvement of an opioid system in sciatic nerve of *Rana ridibunda*", *Neuropeptides*, **38**: 83-91, (2004).

- [38] Aşkin, A., Çamlıca, Y. ve Çömelekoğlu, Ü. “Opioid peptides as possible neuromodulators in the frog peripheral nerve system”, *Neuropeptides*, **41**: 73-81, (2007).
- [39] Wittle, L.W., Opalek, J.M. ve Ruitter, T.C. “Chromogranin A-immunoreactive cells in the olfactory system of anuran amphibians”, *General and Comparative Endocrinology*, **120**: 17-26, (2000).
- [40] Tonge, D., Edström, A. ve Ekström, P. “Use of explant cultures of peripheral nerves of adult vertebrates to study axonal regeneration in vitro”, *Progress in Neurobiology*, **54**: 459-480, (1997).
- [41] Valverde, E., De Rada, O.D., Burrell, M.A., Rovira, J. ve Sesma, P. “Immunocytochemical and ultrastructural characterization of endocrine cells and nerves in the intestine of *Rana temporaria*”, *Tissue and Cell*, **25(4)**: 505-516, (1993).
- [42] Sykova, E., Hajek, I., Chvatal, A., Kriz, M. ve Diatchkova, G.I. “Changes in extracellular potassium accumulation produced by opioids and naloxone in frog spinal cord: Relation to changes of Na-K pump activity”, *Neuroscience Letters*, **59**: 285-290, (1985).
- [43] Hajek, I., Teisinger, J. ve Sykova, E. “The effect of opioids and of naloxone on Na⁺, K⁺-adenosine triphosphatase activity in frog spinal cord membrane fractions”, *Neuroscience Letters*, **59**: 291- 295, (1985).
- [44] Ku, S.K., Lee, H.S., Koh, J.K. ve Lee, J.H. “An immunohistochemical study on the neuropeptide-producing endocrine cells in the alimentary tract of wrinkled frog, *Rana rugosa* (Ranidae)”, *General and Comparative Endocrinology*, **131**: 1-8, (2003).
- [45] Hughes, J., Smith, T.W., Kosterlitz, H.W., Fothergil, L.A., Morgan, B.A. ve Morris, H.R. “Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity”, *Nature*, **258**: 577-579, (1975).
- [46] Lazar, G. “Peptides in the frog brain areas processing visual information”, *Microscopy Research and Technique*, **54**: 201-219, (2001).

- [47] D'Este, L., Casini, A., Allegra, S.P., Cabib, S., Tooyama, I., Kimura, H. ve Renda, T.G. "Immunoreactive neurons in the brain of two Mouse strains after incubation with an antiserum recognizing Asp-Val-Val-Gly.NH₂ (DVVG), the C-terminal fragment of (D-Ala²)-deltorphin I", *Journal of Chemical Neuroanatomy*, **24**: 189-198, (2002).
- [48] Elfvin, L.G., Lindh, B., Hökfelt, T. ve Terenius, L. "An ultrastructural study of dynorphin-immunoreactive nerve fibers and terminals in the celiac-superior mesenteric ganglion of the guinea pig", *Brain Research*, **502**: 341-348, (1989).
- [49] Ruzicka, B.B. ve Jhamandas, K. "Met-enkephalin release from slices of the rat striatum and globus pallidus: Stimulation by excitatory amino acids", *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **257(3)**: 1025-1033, (1991).
- [50] Kevelaitis, E., Peynet, J., Mounas, C., Launay, J.M. ve Menasche, P. "Opening of potassium channels the common cardioprotective link between preconditioning and natural hibernation?", *American Heart Association*, **99**: 3079-3085, (1999).
- [51] Cheng, P.Y., Svingos, A.L., Wang, H., Clarke, C.L., Jenab, S., Beczkowska, I.W., Inturrisi, C.E. ve Pickel, V.M. "Ultrastructural immunolabeling shows prominent presynaptic vesicular localization of δ -opioid receptor within both enkephalin- and nonenkephalin-containing axon terminals in the superficial layers of the rat cervical spinal cord", *The Journal of Neuroscience*, **15(9)**: 5976-5988, (1995).
- [52] Olive, M.F., Anton, B., Micevych, P., Evans, C.J. ve Maidment, N.T. "Presynaptic versus postsynaptic localization of μ and δ opioid receptors in dorsal and ventral striatopallidal pathways", *The Journal of Neuroscience*, **17(19)**: 7471-7479, (1997).
- [53] Cheng, P.Y., Moriwaki, A., Wang, J.B., Uhl, G.R. ve Pickel, V.M. "Ultrastructural localization of μ opioid receptors in the superficial layers of the rat cervical spinal cord: Extrasynaptic localization and proximity to lös-enk", *Brain Research*, **731**: 141-154, (1996).

- [54] Arvidsson, U., Dado, R.J., Riedl, M., Lee, J.H., Law, P.Y., Loh, H.H., Elde, R. ve Wessendorf, M.W. “ δ -opioid receptor immunoreactivity: Distribution in brainstem and spinal cord, and relationship to biogenic amines and enkephalin”, *The Journal of Neuroscience*, **15(2)**: 1215-1235, (1995).
- [55] Majane, E.A., Panula, P. ve Yang, H.Y.T. “Rat brain regional distribution and spinal cord neuronal pathway of FLFQPQRF-NH₂, a mammalian FMRF-NH₂ like peptide”, *Brain Research*, **494(1)**: 1-12, (1989).
- [56] Ferrarese, C., Iadarola, M.J., Yang, H.Y.T. ve Costa, E. “Peripheral and central origin of Phe-Met-Arg-Phe-amide immunoreactivity in rat spinal cord”, *Regulatory Peptides*, **13(3-4)**: 245-252, (1986).
- [57] Williams, R.G. ve Dockray, G.J. “Immunohistochemical studies of FMRF-amide-like immunoreactivity in rat brain”, *Brain Research*, **276(2)**: 213-229, (1983).
- [58] Cherubini, E., Morita, K. ve North, R.A. “Opioid inhibition of synaptic transmission in the Guinea Pig myenteric plexus”, *British Journal of Pharmacology*, **85**: 805-817, (1985).
- [59] Yoshimura, M. ve North, R.A. “Substantia gelatinosa neurones hyperpolarized in vitro by enkephalin”, *Nature*, **305**: 529-530, (1983).
- [60] Millam, J.R., Wang, R., Veit, C.B.C. ve Siopes, T.D. “Apposition of enkephalinergic axons with cGnRH I-containing perikarya in the turkey hen brain”, *General and Comparative Endocrinology*, **127**: 128-135, (2002).
- [61] Takasaki, Y., Wolf, R.A., Chien, G.L. ve Winkle, D.M. “Met⁵-enkephalin protects isolated adult rabbit cardiomyocytes via δ opioid receptors”, *American Journal of Physiology*, **277**: H2442-H2450, (1999).
- [62] Katayama, Y. ve Nishi, S. “Sites and mechanisms of actions of enkephalin in the feline parasympathetic ganglion”, *Journal of Physiology*, **351**: 111-121, (1984).
- [63] Lee, K.J. ve Watson R.D. “Antipeptide antibodies for detecting crab (*Callinectes sapidus*) molt-inhibiting hormone”, *Peptides*, **23**: 853-862, (2002).

- [64] Lee, K.J., Watson R.D. ve Roer, R.D. “Molt-inhibiting hormone mRNA levels and ecdysteroid titer during a molt cycle of the blue crab, *Callinectes sapidus*”, Biochemical and Biophysical Research Communication, **249**: 624-627, (1998).
- [65] Watson, R.D., Lee, K.J., Borders, K.J., Dircksen, H. ve Lilly, K.Y. “Molt-inhibiting hormone immunoreactive neurons in the eyestalk neuroendocrine system of the blue crab, *Callinectes sapidus*”, Arthropod Structure & Development, **30**: 69-76, (2001).
- [66] Krajniak, K.G. “The identification and structure-activity relations of a cardioactive FMRFamide-related peptide from the blue crab *Callinectes sapidus*”, Peptides, **12**: 1295-1302, (1991).
- [67] Jaros, P.P., Dircksen, H. ve Keller, R. “Occurrence of immunoreactive enkephalins in a neurohemal organ and other nervous structures in the eyestalk of the shore crab, *Carcinus maenas* L. (Crustacea, Decapoda)”, Cell and Tissue Research, **241**: 111-117, (1985).
- [68] Lüschen, W., Buck, F., Willig, A. ve Jaros, P.P. “Isolation, sequence analysis, and physiological properties of enkephalins in the nervous tissue of the shore crab *Carcinus maenas* L.”, Proceedings of the National Academy of Sciences, **88**: 8671-8675, (1991).
- [69] Schmidt, M. “Distribution of presumptive chemosensory afferents with FMRFamide- or substance P-like immunoreactivity in the decapod crustaceans”, Brain Research, **746**: 71-84, (1997).
- [70] Kobierski, L.A., Beltz, B.S., Trimmer, B.A. ve Kravitz, E.A. “FMRFamide-like peptides of *Homarus americanus*: Distribution, immunocytochemical mapping, and ultrastructural localization in terminal varicosities”, The Journal of Comparative Neurology, **266**: 1-15, (1987).
- [71] Trimmer, B.A., Kobierski, L.A. ve Kravitz, E.A. “Purification and characterization of FMRFamide-like immunoreactive substances from the lobster nervous system: Isolation and sequence analysis of two closely related peptides”, The Journal of Comparative Neurology, **266**: 16-26, (1987).

- [72] Sithigorngul, P., Saraithongkum, W., Jaideechoey, S., Longyant, S. ve Sithigorngul, W. “Novel FMRFamide-like neuropeptides from the eyestalk of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*”, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **120B**: 587-595, (1998).
- [73] Jacobs, A.A.C. ve Van Herp F. “Immunocytochemical localization of a substance in the eyestalk of the prawn, *Palaemon serratus*, reactive with an anti-FMRF-amide rabbit serum”, *Cell and Tissue Research*, **235**: 601-605, (1984).
- [74] Skiebe, P. ve Schneider, H. “Allostatin peptides in the crab stomatogastric nervous system: Inhibition of the pyloric motor pattern and distribution of allostatin-like immunoreactivity”, *Journal of Experimental Biology*, **194**: 195-208, (1994).
- [75] Fingerman, M., Hanumante, M.M., Kulkarni, G.K., Ikeda, R. ve Vacca, L.L. “Localization of substance P-like, leucine-enkephalin-like, methionine-enkephalin-like, and FMRFamide-like immunoreactivity in the eyestalk of the fiddler crab, *Uca pugilator*”, *Cell and Tissue Research*, **241**: 473-477, (1985).
- [76] Quackenbush, L.S. ve Fingerman, M. “Regulation of neurohormone release in the fiddler crab, *Uca pugilator*: Effects of gamma-aminobutyric acid, octopamine, met-enkephalin and beta-endorphin”, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **79C(1)**: 77-84, (1984).
- [77] Kulkarni, G.K. ve Fingerman, M. “Distal retinal pigment of the fiddler crab, *Uca pugilator*: Release of the dark-adapting hormone by Methionine Enkephalin and FMRFamide”, *Pigment Cell Research*, **1**: 51-56, (1987).
- [78] Mangerich, S. ve Keller, R. “Localization of pigment-dispersing hormone (PDH) immunoreactivity in the central nervous system of *Carcinus maenas* and *Orchonectes limosus* (Crustacea), with reference to FMRFamide immunoreactivity in *O. Limosus*”, *Cell and Tissue Research*, **253**: 199-208, (1988).
- [79] Skerret, M., Peaire, A., Quigley, P. ve Mercier, J. “Physiological effects of two FMRFamide-related peptides from the crayfish *Procambarus clarkii*”, *The Journal of Experimental Biology*, **198**: 109-116, (1995).

- [80] Mercier, A.J., Orchard, I. ve Tebrugge, V. “FMRFamide-like immunoreactivity in the crayfish nervous system”, *The Journal of Experimental Biology*, **156**: 519-538, (1991).
- [81] Beorlegui, C., Martinez, A. ve Sesma, P. “Endocrine cells and nerves in the pyloric ceca and intestine of *Oncorhynchus mykiss* (Teleostei): An immunocytochemical study”, *General and Comparative Endocrinology*, **86(3)**: 483-495, (1992).
- [82] Stefano, G.B. ve Martin, R. “Enkephalin-like immunoreactivity in the pedal ganglion of *Mytilus edulis* (Bivalvia) and its proximity to dopamine-containing structures”, *Cell and Tissue Research*, **230**: 147-153, (1983).
- [83] Stefano, G.B., Leung, M.K., Zhao, X. ve Scharrer, B. “Evidence for the involvement of opioid neuropeptides in the adherence and migration of immunocompetent invertebrate hemocytes”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **86**: 626-630, (1989).
- [84] Leung, M. ve Stefano, G.B. “Isolation of Molluscan opioid peptides”, *Life Sciences*, **33(I)**: 77-80, (1983).
- [85] Stefano, G.B., Catapane, E.J. ve Kream, R.M. “Characterization of the dopamine stimulated adenylate cyclase in the pedal ganglia of *Mytilus edulis*: Interactions with etorphine, β -endorphin, DALA and methionine enkephalin”, *Cellular and Molecular Neurobiology*, **1(1)**: 57-67, (1981).
- [86] Martin, R., Frösch, D., Weber, E. ve Voigt, K.H. “Met-enkephalin-like immunoreactivity in a cephalopod neurohemal organ”, *Neuroscience Letters*, **15**: 253-257, (1979).
- [87] Remy, C. ve Dubois, M.P. “Immunohistological evidence of methionine enkephalin-like material in the brain of the migratory locust”, *Cell and Tissue Research*, **218**: 271-278, (1981).
- [88] Romeuf, M. ve Remy, C. “Early immunohistochemical detection of somatostatin-like and methionine-enkephalin-like neuropeptides in the brain of the migratory locust embryo”, *Cell and Tissue Research*, **236**: 289-292, (1984).

- [89] Walther, C. ve Schiebe, M. “FMRF-NH₂-like factor from neurohaemal organ modulates neuromuscular transmission in the locust”, *Neuroscience Letters*, 77: 209-214, (1987).
- [90] Stefano, G.B., Scharrer, B. ve Assanah, P. “Demonstration, characterization and localization of opioid binding sites in the midgut of the insect *Leucophaea maderae* (Blattaria)”, *Brain Research*, 253: 205-212, (1982).
- [91] Duve, H., Thorpe, A. ve Tobe, S.S. “Immunocytochemical mapping of neuronal pathways from brain to corpora cardiaca/corpora allata in the cockroach *Diploptera punctata* with antisera against met-enkephalin-arg⁶-gly⁷-leu⁸”, *Cell and Tissue Research*, **263**: 285-291, (1991).

ÖZGEÇMİŞ

1973 yılında Hatay'ın Samandağı ilçesinde doğmuşum. İlk ve orta öğrenimimi Samandağı'nda tamamladım. 1992 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandım. Aynı bölümden 1996 yılında mezun oldum. 1996 yılında öğretmen olarak göreve başladım. 1997 yılında Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimime başladım. 2001 yılında mezun oldum. 2001 yılında aynı anabilim dalında doktora eğitimime başladım. 1998 yılında Milli Eğitim'den, Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne araştırma görevlisi olarak atandım. Halen aynı bölümde araştırma görevlisi olarak görev yapmaktayım.