

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



**ERİŞKİN DİŞİ VE ERKEK SIÇANLARIN BİYOLOJİK DOKULARINDAKİ
PHOENİXİN VE NESFATİN-1'İN İMMUNOHİSTOKİMYASAL DAĞILIMININ
İNCELENMESİ**

Engin ESEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Tuba PARLAK AK

TUNCELİ-2023

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**ERİŞKİN DİŞİ VE ERKEK SIÇANLARIN BİYOLOJİK DOKULARINDAKİ
PHOENİXİN VE NESFATİN-1'İN İMMUNOHİSTOKİMYASAL DAĞILIMININ
İNCELENMESİ**

Engin ESEN
(18110801105)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Tuba PARLAK AK

TUNCELİ-2023

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**ERİŞKİN DİŞİ VE ERKEK SIÇANLARIN BİYOLOJİK DOKULARINDAKİ
PHOENİXİN VE NESFATİN-1'İN İMMUNOHİSTOKİMYASAL DAĞILIMININ
İNCELENMESİ**

**Engin ESEN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bu tez 16/01/2023 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

İmza:.....

Doç. Dr. Burcu GÜL
(Fırat Üniversitesi)

BAŞKAN

İmza:.....

Dr. Öğr. Üyesi Tuba
PARLAK AK
(Munzur Üniversitesi)

DANIŞMAN

İmza:.....

Doç. Dr. Mevlüt ALATAŞ
(Munzur Üniversitesi)

ÜYE

Bu tez, Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda hazırlanmıştır.

Doç. Dr. Murat KORUNUR
Enstitü Müdürü

Bu çalışma, Munzur Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: YLMUB019-04

NOT: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı “Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu”ndaki hükümlere tabidir.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

İmza
Engin ESEN

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Tuba PARLAK AK

TEŞEKKÜR

Tez çalışma sürecimin tüm aşamalarında bilgi birikimiyle yol göstererek desteğini esirgemeyen, kıymetli ve değerli hocam, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Tuba PARLAK AK' a,

Laboratuar analizlerinin yapılması için sağladıkları imkanlardan ötürü Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mine YAMAN'a

Tez jürimde yer alan değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Burcu GÜL'e ve Sayın Doç. Dr. Mevlüt ALATAŞ'a ve maddi desteklerinden dolayı Munzur Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Bilgi ve tecrübelerimi arttırmak amacıyla çıktığım bu zorlu yolda, manevi olarak destek ve teşviklerini hiçbir zaman esirgemeyen kıymetli babam Salih ESEN'e ve annem Zeynep ESEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Engin ESEN
TUNCELİ-2023

İÇİNDEKİLER

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	I
TEŞEKKÜR.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	V
TABLolar LİSTESİ.....	VII
RESİMLER LİSTESİ	VIII
SEMBOLLER LİSTESİ	IX
KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	XII
ABSTRACT	XIII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Nöropeptid Tanımı	2
1.1.1. Nöropeptidlerin tarihçesi	3
1.1.2. Nöropeptid reseptörleri	6
1.1.3. Nöropeptidlerin fonksiyonları	7
1.2. Hipotalamik Nöropeptidler	10
1.2.1. Phoenixin.....	11
1.2.1.1. Phoenixin geni.....	11
1.2.1.2. Phoenixin reseptörü	12
1.2.1.3. Phoenixin'in işlevleri	14
1.2.1.3.1. Phoenixin ve üreme	14
1.2.1.3.2. Phoenixin ve gıda alımı.....	14
1.2.1.3.3. Phoenixin ve hafıza-Alzheimer hastalığı	15
1.2.1.3.4. Phoenixin ve anksiyete	15
1.2.1.3.5. Phoenixin ve inflamasyon	16
1.2.1.3.6. Phoenixin ve enerji metabolizması-vücut sıvı dengesi	16
1.2.1.3.7. Phoenixin ve endokrin düzenleme	17
1.2.2. Nesfatin-1	18
1.2.2.1. Nesfatin-1 geni	18
1.2.2.2. Nesfatin-1 reseptörü	19
1.2.2.3. Nesfatin-1'in işlevleri.....	20
1.2.2.3.1. Nesfatin-1 ve beslenme-gıda alımı.....	20
1.2.2.3.2. Nesfatin-1 ve gastrointestinal sistem.....	21
1.2.2.3.3. Nesfatin-1 ve kan glikoz homeostazı	21
1.2.2.3.4. Nesfatin-1 ve su tüketimi	22
1.2.2.3.5. Nesfatin-1 ve enerji metabolizması.....	22
1.2.2.3.6. Nesfatin-1 ve anksiyete-depresyon	22
1.2.2.3.7. Nesfatin-1 ve üreme	23
1.2.2.3.4. Nesfatin-1 ve solunum	24
2. MATERYAL VE METOT	25
2.1. Deney Hayvanlarının Kimliği ve Temini	25
2.2. Deney Hayvanlarından Örneklerin Alınması	25
2.3. Histolojik İncelemeler İçin Doku Hazırlanması.....	27
2.4. İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi	27
2.5. İstatistiksel Analiz	28
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	29
3.1. İmmünohistokimyasal Bulgular	29
3.1.1. Dişi sıçanların dokularındaki immünohistokimyasal bulgular.....	29

3.1.2. Erkek sıçanların dokularındaki immünohistokimyasal bulgular.....	47
3.2. Histoskor Sonuçları	63
3.2.1. Dişi sıçanların dokularına ait histoskor sonuçları	63
3.2.2. Erkek sıçanların dokularına ait histoskor sonuçları	63
4. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	70
5. KAYNAKLAR.....	71
ÖZGEÇMİŞ	



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Sinir sistemindeki peptid nörotransmitterleri olarak nöropeptidler	8
Şekil 1.2. Endokrin sistemlerde peptid hormonları olarak nöropeptidler	9
Şekil 1.3. PNX prekürsör proteini (Smim20) ile PNX-20ve PNX-14 izoformlarının amino asit dizileri	12
Şekil 1.4. PNX'in fizyolojik ve patolojik rolleri.....	13
Şekil 1.5. NUCB2 ve nesfatin-1'in protein yapısı. PK: Prohormon konvertaz, A: Asit aminoasitler, B: Basit aminoasitler, N23: İlk 23 aminoasit (N-terminal segmenti), M30: İkinci 30 aminosit (mid-segmenti), C29: Son 29 aminoasit (C-terminal segmenti)	19
Şekil 1.6. Nesfatin-1'in merkezi ve periferik etkileri	20
Şekil 3.1. Beyin dokusunda PNX-14 immünoreaktivitesi	29
Şekil 3.2. Beyin dokusunda NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi	30
Şekil 3.3. Negatif kontrol dokusu	30
Şekil 3.4. Beyincik dokusunda PNX-14 immünoreaktivitesi	31
Şekil 3.5. Beyincik dokusunda NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi	32
Şekil 3.6. Negatif kontrol dokusu	32
Şekil 3.7. Karaciğer dokusunda PNX-14 immünoreaktivitesi	33
Şekil 3.8. Karaciğer dokusunda NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi	34
Şekil 3.9. Negatif kontrol dokusu	34
Şekil 3.10. Akciğer dokusunda PNX-14 immünoreaktivitesi.....	35
Şekil 3.11. Akciğer dokusunda NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi.....	36
Şekil 3.12. Negatif kontrol dokusu.	36
Şekil 3.13. Böbrek dokusunun korteks bölgesinde PNX-14 immünoreaktivitesi.....	37
Şekil 3.14. Böbrek dokusunun medulla bölgesinde PNX-14 immünoreaktivitesi	38
Şekil 3.15. Böbrek dokusunun korteks bölgesinde NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi	38
Şekil 3.16. Böbrek dokusunun medulla bölgesinde NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi	39
Şekil 3.17. Negatif kontrol dokusu (korteks).....	39
Şekil 3.18. Negatif kontrol dokusu (medulla).....	40
Şekil 3.19 Böbrek üstü bezinde PNX-14 immünoreaktivitesi	41
Şekil 3.20. Böbrek üstü bezinde NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi	42
Şekil 3.21. Negatif kontrol dokusu	42
Şekil 3.22. Ovaryum dokusunda luteal (siyah ok) ve granuloza (sarı ok) hücrelerinde PNX-14 immünoreaktivitesi.	43
Şekil 3.23. Ovaryum dokusunda teka (siyah ok) ve granuloza (sarı ok) hücrelerinde NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi.....	44
Şekil 3.24. Negatif kontrol dokusu	44
Şekil 3.25. Uterus dokusunda glanduler epitel (siyah ok) ve stromal (sarı ok) hücrelerde PNX-14 immünoreaktivitesi	45
Şekil 3.26. Uterus dokusunda endometriyal epitelyal (siyah ok), stromal (sarı ok) ve glanduler epitel (kırmızı ok) hücrelerinde NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi	46
Şekil 3.27. Negatif kontrol dokusu	46
Şekil 3.28. Beyin dokusunda PNX-14 immünoreaktivitesi	47
Şekil 3.29. Beyin dokusunda NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi	48
Şekil 3.30. Negatif kontrol dokusu	48
Şekil 3.31. Beyincik dokusunda PNX-14 immünoreaktivitesi	49

Şekil 3.32. Beyincik dokusunda NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi	50
Şekil 3.33. Negatif kontrol dokusu	50
Şekil 3.34. Karaciğer dokusunda PNX-14 immünoreaktivitesi	51
Şekil 3.35. Karaciğer dokusunda NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi	52
Şekil 3.36. Negatif kontrol dokusu	52
Şekil 3.37. Akciğer dokusunda PNX-14 immünoreaktivitesi.....	53
Şekil 3.38. Akciğer dokusunda NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi	54
Şekil 3.39. Negatif kontrol dokusu	54
Şekil 3.40. Böbrek dokusunun korteks bölgesinde PNX-14 immünoreaktivitesi.....	55
Şekil 3.41. Böbrek dokusunun medulla bölgesinde PNX-14 immünoreaktivitesi	56
Şekil 3.42. Böbrek dokusunun korteks bölgesinde NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi	56
Şekil 3.43. Böbrek dokusunun medulla bölgesinde NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi	57
Şekil 3.44. Negatif kontrol dokusu (korteks).....	57
Şekil 3.45. Negatif kontrol dokusu (medulla).....	58
Şekil 3.46. Böbrek üstü bezinde PNX-14 immünoreaktivitesi	59
Şekil 3.47. Böbrek üstü bezinde NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi	60
Şekil 3.48. Negatif kontrol dokusu	60
Şekil 3.49. Testis dokusunda sertoli hücrelerinde (sarı ok) ve intersitisyel hücrelerde (siyah ok) PNX-14 immünoreaktivitesi.....	61
Şekil 3.50. Testis dokusunda sertoli hücrelerinde (sarı ok) ve intersitisyel hücrelerde (siyah ok) NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi	62
Şekil 3.51. Negatif kontrol dokusu	62

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Bazı memeli nöropeptidleri ve nöropeptid aileleri.....	5
Tablo 1.2. Sinir ve endokrin sistemlerde nöropeptid işlevleri.....	10
Tablo 2.1. %10'luk tamponlu nötral formalin solüsyonunun hazırlanması	25
Tablo 3.1. Dişi sıçanların dokularında PNx-14 ve NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitelerinin histoskoru	63
Tablo 3.2. Erkek sıçanların dokularında PNx-14 ve NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitelerinin histoskoru	63



RESİMLER LİSTESİ

Resim 2.1. Karaciğer, akciğer, böbrek, adren, ovaryum, uterus ve testis dokularının alınması.....	26
Resim 2.2. Beyin ve beyincik dokularının alınması	26



SEMBOLLER LİSTESİ

μm	: Mikrometre
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece
%	: Yüzde
p	: Anlamlılık
pH	: Tampon çözelti (asidik)
g	: Gram
pg	: Pikogram
mL	: Mililitre
H_2O_2	: Hidrojen peroksit
>	: Büyük
<	: Küçük
$\pm$	: Yaklaşık olarak



KISALTMALAR LİSTESİ

ACTH	: Adrenokortikotropik Hormon
ADH	: Antidiüretik Hormon
AEC	: 3-amino-9-ethylcarbazole
AGRP	: Agouti Geniyle İlişkili Protein
AIDS	: Edinilmiş Bağışıklık Yetmezliği Sendromu
AKH	: Adipokinetik Hormon
AMP	: Adenozin Monofosfat
ARC	: Arkuat Çekirdek
BPA	: Bisfenol A
CART	: Kokain ve Amfetamin Düzenlenmiş Transkript
CAT	: Katalaz
CCK	: Kolesistokinin
CGRP	: Kalsitonin Gen İlişkili Peptid
CREB	: cAMP Yanıt Element Bağlayıcı
CRH	: Kortikotropin Salıcı Hormon
DH	: Dorsal Hipotalamus
DHA	: Dokosaheksaenoik Asit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ELISA	: Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Assay
FSH	: Folikül Stimüle Edici Hormon
FÜDAM	: Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi
FÜHADYEK	: Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
GAL	: Galanin
GHRH	: Büyüme hormonu Salıcı Hormon
GLP-1	: Glukojen Benzeri Peptid-1
GnRH	: Ganodotropin Releasing Hormon
GOAT	: Ghrelin-O-Asil Transferaz
GPCR	: G-Protein-Bağlı Reseptör
GPR173	: G-Protein-Bağlı Reseptör 173
HPA	: Hipotalamus-Hipofiz-Adren
HPG	: Hipotalamus-Hipofiz-Gonad
IL-12	: İnterlökin-12
IL-1β	: İnterlökin-1 β
IL-6	: İnterlökin-6
i.c.v.	: İntraserebroventriküler
i.p.	: İntraperitoneal
i.v.	: İntravenöz
LH	: Lateral Hipotalamus
LH	: Luteinize Edici Hormon
LHRH	: Luteinizan Hormon Salıcı Hormon
LPS	: Lipopolisakkarit
MCH	: Melanin Konsantre Edici Hormon
MCR$\frac{3}{4}$	: Melanokortin Reseptörü
MDA	: Malondialdehit
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
mTOR	: Rapamisin Protein Kompleksinin Memeli Hedefi
NKA	: Neurokinin

NPP	: Nöropeptid Prekürsör Proteini
NPY	: Nöropeptid Y
NRF2/HO-1	: Eritroid 2 İle İlişkili Faktör 2/Heme Oksijenaz-1
NTS	: Nükleus Traktus Solitarius
NUCB2	: Nükleobindin2
PACAP	: Hipofiz Adenilat Siklaz Aktive Edici Peptid
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PHI	: Peptid Histidin İzolösün
PNX	: Phoenixin
PNX-14	: Phoenixin 14
PNX-20	: Phoenixin 20
PVN	: Paraventriküler Çekirdek
PYY	: Peptid Tirozin-Tirozin
rER	: Kaba Endoplazmik Retikulum
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
s.k.	: Subkutan
Smim20	: Küçük İntegral Membran Proteini 20
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SOM	: Somatostatin
SON	: Supraoptik Çekirdek
SREB	: Süper Korunmuş Reseptör
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktörü- α
TRH	: Tirotropin Salgılatıcı Hormon
TSH	: Tirotropin Uyarıcı Hormon
VIP	: Vazoaktif Bağırsak Polipeptidi
VMH	: Ventromedial Hipotalamus
ZI	: Zona İncerta
IAPP	: Adacık Amiloid Polipeptidi

ÖZET

Nöropeptidler, nöroendokrin sistemlerde hücresel ve fizyolojik fonksiyonları düzenleyen çeşitli nöronal sinyal molekülleridir. Yakın zamanda keşfedilmiş nöropeptidlerden, birkaç hipotalamik çekirdekte ortak lokalize oldukları ve potansiyel olarak etkileşime girdikleri bildirilen phoenixin (PNX) ve NUCB2/nesfatin-1'in önemli pleiotropik rollerine işaret edilmektedir.

Bu çalışmada, erişkin dişi ve erkek sıçanların biyolojik dokularındaki PNX ve nesfatin-1'in immünohistokimyasal dağılımının incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla 3-4 aylık, 6 adet dişi ve 6 adet erkek olmak üzere toplam 12 adet Sprague-Dawley cinsi sıçan dekapite edilerek beyin, beyincik, karaciğer, akciğer, böbrek, böbrek üstü bezi, ovaryum, uterus ve testis dokuları hızlı bir şekilde çıkarıldı. Alınan dokular immünohistokimyasal incelemeler için %10'luk tamponlu nötral formalin solüsyonunda immersiyon yöntemi ile tespit edildi. Avidin-biotin-peroksidaz kompleksi yöntemine göre immünohistokimya boyama prosedürü uygulanarak dokulardaki PNX-14 ve NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktiviteyi incelendi.

Dişi sıçanların beyin dokusunda yoğun PNX-14 ve orta NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi belirlenirken beyincik dokusunda orta PNX-14 ve yoğun NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi tespit edildi. Karaciğer dokusunda hafif PNX-14 ve orta NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi belirlenirken akciğer dokusunda orta PNX-14 ve yoğun NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi görüldü. Böbrek dokusunda orta PNX-14 ve yoğun NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi belirlenirken böbrek üstü bezinde yoğun PNX-14 ve orta NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi tespit edildi. Ovaryum ve uterus dokularında ise yoğun PNX-14 ve orta-yoğun NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktiviteyi gözlemlendi.

Erkek sıçanların beyin dokusunda yoğun PNX-14 ve orta NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi gözlenirken beyincik dokusunda hafif PNX-14 ve orta NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi belirlendi. Karaciğer dokusunda orta PNX-14 ve NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi tespit edilirken akciğer dokusunda yoğun PNX-14 ve NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi görüldü. Böbrek dokusunda yoğun PNX-14 ve orta-yoğun NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi belirlenirken böbrek üstü bezinde yoğun PNX-14 ve orta NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi gözlemlendi. Testis dokusunda ise orta PNX-14 ve yoğun NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi belirlendi.

Sonuç olarak, bu iki nöropeptidin, hem dişi hem de erkek sıçanların merkezi ve periferik dokularındaki dağılımı sayesinde pek çok nöroendokrin ve fizyolojik aktivitenin düzenlenmesinde oldukça önemli roller aldıkları düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Phoenixin, nesfatin-1, sıçan, immünohistokimya

ABSTRACT

Investigation of Immunohistochemical Distribution of Phoenixin and Nesfatin-1 in Biological Tissues of Adult Female and Male Rats

Neuropeptides are various neuronal signaling molecules that regulate cellular and physiological functions in neuroendocrine systems. Among the recently discovered neuropeptides, important pleiotropic roles are pointed out for phoenixin (PNX) and NUCB2/nesfatin-1, which have been reported to co-localize and potentially interact in several hypothalamic nuclei.

In this study, it was aimed to investigate the immunohistochemical distribution of PNX and nesfatin-1 in the biological tissues of adult female and male rats. For this purpose, 6 female and 6 male rats -a total of 12 Sprague-Dawley rats- that were 3-4 months old, were decapitated and their brain, cerebellum, liver, lung, kidney, adrenal gland, ovary, uterus and testis tissues were quickly removed. Tissues were fixed by immersion method in 10% neutral buffered formalin solution for immunohistochemical examinations. PNX-14 and NUCB2/nesfatin-1 immunoreactivities in the tissues were examined by applying the immunohistochemistry staining procedure according to the avidin-biotin-peroxidase complex method.

Intense PNX-14 and moderate NUCB2/nesfatin-1 immunoreactivity were observed in the brain tissue of female rats, while moderate PNX-14 and intense NUCB2/nesfatin-1 immunoreactivity were observed in the cerebellum tissue. Mild PNX-14 and moderate NUCB2/nesfatin-1 immunoreactivity were observed in liver tissue, while moderate PNX-14 and intense NUCB2/nesfatin-1 immunoreactivity were observed in lung tissue. Moderate PNX-14 and intense NUCB2/nesfatin-1 immunoreactivity were observed in the kidney tissue, while intense PNX-14 and moderate NUCB2/nesfatin-1 immunoreactivity were observed in the adrenal gland. Intense PNX-14 and moderate-intense NUCB2/nesfatin-1 immunoreactivities were observed in ovarian and uterine tissues.

Intense PNX-14 and moderate NUCB2/nesfatin-1 immunoreactivity were observed in the brain tissue of male rats, while mild PNX-14 and moderate NUCB2/nesfatin-1 immunoreactivity were observed in the cerebellum tissue. Moderate PNX-14 and NUCB2/nesfatin-1 immunoreactivity were observed in liver tissue, while intense PNX-14 and NUCB2/nesfatin-1 immunoreactivity were observed in lung tissue. Intense PNX-14 and moderate-intensity NUCB2/nesfatin-1 immunoreactivity were observed in the kidney tissue, while intense PNX-14 and moderate NUCB2/nesfatin-1 immunoreactivity were observed in the adrenal gland. Moderate PNX-14 and intense NUCB2/nesfatin-1 immunoreactivity were observed in testis tissue.

In conclusion, considering the distribution of these two neuropeptides in the central and peripheral tissues of both female and male rats, it is thought that they play very important roles in the regulation of many neuroendocrine and physiological activities.

Keywords: Phoenixin, nesfatin-1, rat, immunohistochemistry

1. GİRİŞ

Tüm canlılar veya organizmalar küçük, kimyasalların konsantre sulu çözeltisiyle dolu zarla çevrili birimler olan ve büyüyüp akabinde ikiye bölünerek kendilerinin kopyalarını yaratma konusunda olağanüstü bir yeteneğe sahip hücrelerden inşa edilmiştir. Yaşamın temel birimleri olan hücrelerin yapılarının, işlevlerinin ve davranışlarının incelenmesini konu alan hücre biyolojisi, yaşamın ne olduğu ve nasıl çalıştığı sorusuna yanıt aramamız gereken ilk yerdir (Alberts ve ark., 2009). Birçok biyolojik süreci anlayabilmek için hücrelerin kendilerini dokular halinde nasıl organize ettiklerini de bilmek gereklidir. Zira yetişkin yaşamında doku homeostazını sürdürmek doku işlevini ve bütünlüğünü sağlamak için hücrelerin uzay-zamansal koordinasyonunu gerektirmektedir (Xavier da Silveira Dos Santos ve Liberali, 2019). Bu koordinasyonun yanı sıra hücreler arasındaki güçlü iletişim de, homeostaz ve sağlığın korunmasında oldukça önemlidir (Diaz-Garrido ve ark., 2021). Dolayısıyla canlı hücrelerin çevrelerini algılayabilmeleri ve çevreleriyle etkileşim kurabilmeleri, kuşkusuz yaşam için bir ön koşuldur. Tek hücreli organizmalar, beslenmenin yerini belirleme, üreme ipuçlarını okuma ve savunma mekanizmalarını kurma gibi işlevler için bu temaslara bağlıdır. Çok hücreli türlerde ise, alınan bilginin miktarı ve türü zorunlu olarak daha karmaşık olduğundan, sinyal verme mekanizmaları daha çeşitlidir. Bu nedenle, insanlar da dahil olmak üzere daha yüksek ökaryotlar, organ ve tüm organizma düzeylerinde ek karmaşıklık katmanları ile hücresel düzeyde çok karmaşık hücre dışı sinyal sistemlerine sahiptirler (De Paoli-Roach, 2010).

Genellikle sinyal iletimi veya transmembran sinyal olarak da adlandırılan hücre sinyali, hücrelerin çevreleriyle iletişim kurduğu ve orada algıladıkları dış ipuçlarına geçici olarak yanıt verdiği bir süreçtir. Her ne kadar amaç, mekanizma ve tepki bakımından geniş bir çeşitlilik gösterse de, tüm hücreler bunu bir dereceye kadar başarıma kapasitesine sahiptirler. Aynı zamanda, özellikle ökaryotik alemde oldukça çeşitli türler arasında dikkate değer derecede benzerlikler bulunduğundan karşılaştırmalı fizyoloji bu alanın gelişmesinde faydalı bir araç olmuştur. Bu genel fenomenin, hücreler tarafından dış uyaranların algılanmasını içeren merkezi önemi, son otuz yılda gerçekten de hücre ve moleküler biyoloji araştırmalarının baskın bir parçası haline gelmiştir. Çünkü kısmen hücrelerin dış uyaranlara verdiği dinamik tepkilerin tanımı özünde yaşam sürecinin kendisinin bir tanımıdır (De Paoli-Roach, 2010).

Merkezi sinir sistemindeki (MSS) hücreler arası iletişimin kimyasal olarak aracılık edildiği çok sayıda çalışma ile ortaya konulmuştur. Bu sistemde, özellikle peptidlerin sinyal molekülleri olarak rolü yaklaşık elli yılı aşkın süreden beri araştırılmaktadır. Süreç içerisinde çok sayıda peptidin aynı zamanda sinir sisteminde haberciler olarak görev aldığına dair çeşitli kanıtlar ortaya çıkmıştır (Hökfelt ve ark., 2003). Özellikle, büyük ve evrimsel olarak eski bir proteinli hücre-hücre sinyal molekülleri ailesinin üyeleri olan nöropeptidlerin, yaygın şekilde MSS işlevi ve davranışının son derece güçlü düzenleyicileri oldukları kabul edilmektedir (Smith ve ark., 2020). Esas olarak, hücresel düzeyde iyon kanalı ve sinaps işlevinin modülasyonu yoluyla hareket ettiği bilinen çeşitli nöropeptid reseptörlerinin, yalnızca sinir sisteminde değil, diğer birçok periferik dokuda da geniş bir şekilde dağıldığı öne sürülmüştür (Hökfelt ve ark., 2003).

Tezin amacı; vücut homeostazını ve sağlığı korumada oldukça önemli olan hücreler arası iletişimin kritik bir düzenleyicisi olarak bilinen nöropeptidlerden phoenixin ve nesfatin-1'in erişkin dişi ve erkek sıçanların çeşitli biyolojik dokularındaki dağılımlarının immünohistokimyasal olarak ortaya konulmasıdır.

1.1. Nöropeptid Tanımı

Hızlı sinaps ve iyon kanalı fonksiyonunun yayılabilir hücre-hücre sinyal molekülleri yoluyla kademeli ve nispeten yavaş ayarlanması olarak tanımlanan nöromodülasyon, adaptif sinir sistemi fonksiyonu için temel bir gerekliliktir (Marder ve ark., 2015; Nusbaum ve ark., 2017). Nöromodülatör moleküller; nitrik oksit gibi iki atomlu gazlar, endokannabinoidler gibi lipid metabolitleri ve amino asitler ve bunların glutamat, GABA, asetilkolin, serotonin ve dopamin gibi metabolitleri dahil olmak üzere birçok farklı kimyasal form almaktadır. Bununla birlikte, bugüne kadar bilinen en büyük nöromodülatör molekül ailesi, nöropeptidler ismiyle tanımlanan evrimsel olarak eski proteinli sinyal moleküllerini içermektedir (Baraban ve Tallent, 2004; Wang ve ark., 2015; Gonzalez-Suarez ve Nitabach, 2018). En yaygın olarak incelenen nöropeptidler; enkefalinler, endorfinler ve dinorfinler gibi endojen opioid peptidlerdir. Fakat insan genomunda yaklaşık yüze yakın farklı nöropeptid prekürsör proteini (NPP) geni yer almaktadır ve bilinen hemen hemen tüm hayvan genomlarında çok sayıda homolog bulunmaktadır (Jékely, 2013; Elphick ve ark., 2018).

Nöropeptidin en geniş tanımı, bir nörondan diğerine yayılarak haberci görevi gören herhangi bir çözünür peptidi kapsamaktadır. Bununla birlikte daha dar fakat daha yaygın bir nöropeptid tanımı gerekmektedir. Bu tanım; NPP'nin kaynak nöronun kaba endoplazmik retikulumunun (rER) lümenine çevrilmesi, NPP'nin rER-golgi kompleksinden geçişi sırasında veya sonrasında bir veya daha fazla nöropeptid ürününe enzimatik bölünmesi ve yoğun çekirdekli veziküllere paketlenmesi, yoğun çekirdekli veziküllerin kaynak nöron içinde taşınması ve depolanması, aktiviteye ve kalsiyuma bağlı yoğun çekirdekli vezikül ekzositozu ile talep üzerine nöropeptid ürününün salgılanması ve sonra bir ligand-spesifik reseptöre bağlanarak hedef nöron üzerinde hareket etmek için intersitisyel difüzyonun gerçekleşmesi şeklinde sıralanmaktadır (Burbach, 2011).

1.1.1. Nöropeptidlerin tarihçesi

Nörotransmitterler, nöromodülatörler veya nörohormonlar gibi davranan hücreler arası sinyal molekülleri olarak peptidlerin salınması, nöronların evrimsel olarak eski bir özelliğidir. Bu nöropeptidler, tipik olarak spesifik G-protein-bağlı reseptörlere (GPCR'ler) bağlanarak ve onları aktive ederek hedef hücreler üzerinde etki göstermekte ve aşağı akış efektörlerinin aktivitesinde değişikliklere yol açmaktadırlar. Hücresele seviyedeki bu etkiler daha sonra sırasıyla fizyolojik aktivite ve/veya davranışta değişiklikler olarak organ sistemleri ve/veya tüm hayvan seviyesinde tezahür etmektedir. Böylece, nöropeptid fonksiyonu moleküler seviyeden davranışsal seviyeye kadar atfedilebilmektedir (Taghert ve Nitabach, 2012; van Den Pol, 2012; Schoofs ve ark., 2017).

Memelilerde kimyasal olarak tanımlanan ilk nöropeptidler arasında, sistemik olarak hormonlar gibi hareket eden ve sosyal davranışı etkilemek için beyin içinde hareket eden vazopressin ve oksitosin hipotalamik nöropeptidleri bulunmuştur (Donaldson ve Young, 2008; Young ve ark., 2011). Nöropeptid sinyalinin evrimsel antik çağının kanıtı, omurgasızlarda nöropeptidlerin moleküler olarak tanımlanmasıyla ortaya çıkmıştır (Brown, 1975; Stone ve ark., 1976; Price ve Greenberg, 1977). Ayrıca, omurgalı nöropeptidlerine karşı antikorların kullanıldığı çalışmalar, omurgasızlarda (Duve ve Thorpe, 1979; Fritsch ve ark., 1979) ve tersi (Boer ve ark., 1980) immünoreaktivitenin varlığını ortaya koymuştur. Bununla birlikte, antikor özgüllüğü ile ilgili endişeler nedeniyle başlangıçta omurgalılarda ve omurgasızlarda aynı tip nöropeptidlerin bulunup bulunmadığına dair bir belirsizlik öne sürülmüştür (Greenberg ve Price, 1983). Fakat, 1980'lerin sonlarında,

omurgasızlardan izole edilen omurgalı tipi nöropeptidlerin dizilimi ile bazı nöropeptidlerin yaygın filogenetik dağılımının ve evrimsel eskiliğinin kesin kanıtı elde edilmiştir (De Loof ve Schoofs, 1990). Örneğin, 1986'da bir böcekte kolesistokinin (CCK) tipi bir nöropeptid tanımlanmıştır (Nachman ve ark., 1986) ve 1987'de vazopressin/oksitosin tipi nöropeptidler böcek ve yumuşakça türlerinde belirlenmiştir (Cruz ve ark., 1987; Proux ve ark., 1987).

Bununla birlikte, 21. yüzyılın başına kadar, nematod *Caenorhabditis elegans*, böcek *Drosophila melanogaster* ve *Homo sapiens*'in genom dizilimi ile (*C. Elegans* Sıralama Konsorsiyumu, 1998; Adams ve ark., 2000; Lander ve ark., 2001) omurgasızlar ve omurgalılarıdaki nöropeptid sistemleri arasındaki ilişkileri kapsamlı bir şekilde araştırmak mümkün hale gelmiştir (Hewes ve Taghert, 2001; Vanden Broeck, 2001). Ardından, *Drosophila* ve *C. Elegans*'ta daha önce yetim (orphan) GPCR'ler olarak adlandırılanlar için nöropeptid ligandları tanımlanmış ve bu durum nöropeptid ilişkileri ve evrimi hakkında büyüleyici yeni bilgiler sağlamıştır (Meeusen ve ark., 2003; Husson ve ark., 2007; Clynen ve ark., 2010; Holden-Dye ve Walker, 2013). Örneğin, böcek nöropeptidi adipokinetik hormonun (AKH) bir *Drosophila* gonadotropin releasing hormon (GnRH) tipi reseptör için ligand olduğu keşfedilmiştir (Park ve ark., 2002; Staubli ve ark., 2002). Daha sonra, *C. Elegans*'ta bir GnRH-tipi reseptör için ligand olarak GnRH/AKH-benzeri peptid tanımlanmıştır (Lindemans ve ark., 2009). Böylece AKH ve GnRH arasındaki ilişki ortaya çıkarılmış ve GnRH/AKH tipi sinyalleşmenin evrimsel antikliği ortaya konmuştur (Lindemans ve ark., 2011). Dolayısıyla *C. Elegans*, *Drosophila* ve insan genomları sıralandığından beri diğer birçok omurgasız ve omurgalı türünün genomları nöropeptid sinyalizasyon sistemlerinin evrimsel tarihinin araştırılmasına olanak verecek şekilde sekanslanmaktadır.

1970'lerin ortalarından beri sürekli keşfedilip araştırılmasına rağmen, özellikle memelilerde tanımlanan bazı nöropeptid ve nöropeptid ailelerine moleküler biyoloji tekniklerine dayalı güncel yaklaşımların kullanılması sayesinde yenileri eklenmeye devam etmektedir (Tablo 1.1). Başlangıcın yetim bir reseptör olduğu ve endojen ligandın arandığı tersine bir yaklaşımla bazı yetim ligandlar peptidler olarak tanımlanabilmektedir (Hökfelt ve ark., 2000).

Tablo 1.1. Bazı memeli nöropeptidleri ve nöropeptid aileleri (Hököfelt ve ark., 2000).

<i>Hipotalamik hormonlar</i>
Oksitosin (9 amino asit kalıntısı, a.a.r.)
Vazopressin (9 a.a.r.)
<i>Hipotalamik salıcı ve inhibe edici hormonlar</i>
Kortikotropin salıcı hormon (CRH) (41 a.a.r.)
Büyüme hormonu salıcı hormon (GHRH) (44 a.a.r.)
Luteinizan hormon salıcı hormon (LHRH) (10 a.a.r.)
Somatostatin (SOM), büyüme hormonu salımı inhibe edici hormon (14 a.a.r. artı birkaç form)
Tirotropin salgılatıcı hormon (TRH) (3 a.a.r.)
<i>Taşikininler</i>
Neurokinin a (NKA) (K maddesi) (10 a.a.r.)
Neurokinin b (10 a.a.r.)
Nöropeptid K (36 a.a.r.)
Madde P (SP) (11 a.a.r.)
<i>Opioid peptidleri</i>
b-endorfin (30 a.a.r.)
Dynorphin (17 a.a.r. ve diğer formlar)
Met- ve leu-enkephalin (5 a.a.r.)
<i>NPY ve ilgili peptidler</i>
Nöropeptid tirozin (NPY) (36 a.a.r.)
Pankreatik polipeptid (36 a.a.r.)
Peptid tirozin-tirozin (PYY) (36 a.a.r.)
<i>VIP-glukagon ailesi</i>
Glukojen benzeri peptid-1 (GLP-1) (29 a.a.r.)
Peptid histidin izölösün (PHI) (27 a.a.r.)
Hipofiz adenilat siklaz aktive edici peptid (PACAP) (27 veya 38 a.a.r.)
Vazoaktif bağırsak polipeptidi (VIP) (28 a.a.r.)
<i>Diğer nöropeptidler</i>
Beyin natriüretik peptidi (32 a.a.r.)
Kalsitonin gen ilişkili peptid (CGRP) (a-ve b-formu) (37 a.a.r.)
Kolesistokinin (CCK) (8 a.a.r. ve diğer formlar)
Glukagon benzeri peptid 1 (30 a.a.r.)
Galanin (GAL) (29 veya 30 a.a.r.)
Adacık amiloid polipeptidi (IAPP) veya amilin (37 a.a.r.)
Melanin konsantre edici hormon (MCH) (19 a.a.r.)
Melanokortinler (ACTH, a-MSH ve diğerleri)
Nöropeptit FF (F8Fa) (8a.a.r.)
Nörotensin (13 a.a.r.)
Paratiroid hormonu ile ilgili protein (34 veya 37 a.a.r.)
<i>'Yeni' nöropeptidler</i>
Agouti geniyle ilişkili protein (AGRP) (131 a.a.r.)

Tablo 1.1. Bazı memeli nöropeptidleri ve nöropeptid aileleri'nin devamı (Hökfelt ve ark., 2000).

Kokain ve amfetamin düzenlenmiş transkript (CART)/peptid Kortikostatin (14 a.a.r., 29 a.a.r.) (kortikostatin-14'te, 11 a.a.r. somastotatin ile paylaşılır)
Endomorfın-1 ve -2 (her ikisi de 4 a.a.r.)
5-HT modülü (4 a.a.r.)
Hipokretinler/oreksinler (29 veya 39 a.a.r.)
Nosiseptin/orfanin FQ (17 a.a.r.)
Nosistatin (17 a.a.r.)
Prolaktin salan peptid (20 veya 31 a.a.r.)
Secretoneurin (33 a.a.r.)
Urocortin (40 a.a.r.; CRH ile %45 sekans özdeşliği)

1.1.2. Nöropeptid reseptörleri

Çoğu nöropeptid reseptörü, GPCR genlerinin çok büyük süper ailesinin üyeleri tarafından kodlanmaktadır (Deutch ve ark., 2014; Meriney ve Fanselow, 2019). GPCR'ler, karakteristik yedi transmembran segment atomik yapıları ve heterotrimerik G-proteinlerini içeren sinyal iletimi ile ayırt edilen seçici, yüksek affiniteli reseptörler olarak bilinmektedir (Syrovatkin ve ark., 2016; Weis ve Kobilka, 2018). GPCR genlerinin çoğu, koku alma reseptörlerini kodlamakta (Buck ve Axel, 1991; Zhang ve Firestein, 2002) ancak fare ve insan genomları, çeşitli endojen ligandlar için seçici olan GPCR'leri kodlayan 350'den fazla geni içermektedir. Bunlardan en az yüz tanesi nöropeptid seçici iken düzinelercesinin dopamin, serotonin, norepinefrin ve endokannabinoidler dahil olmak üzere geniş çapta çalışılan diğer nöromodülatörler için seçici olduğu bilinmektedir (Vassilatis ve ark., 2003). Dolayısıyla nöropeptidler ve diğer kimyasal nöromodülatörlerin çoğu için seçici olan GPCR'leri kodlayan genlerin, hemen hemen tüm metazoanların genomlarında bulunduğunu gösteren filogenomik kanıtlar, bu reseptörlerin çok erken evrimsel kökenlerine işaret etmiştir (Jékely, 2013; Katz ve Lillvis, 2014).

GPCR sinyali uzun zamandır karmaşık ve çok yönlü olarak kabul edilmiş olsa da bilinen çoğu nöronal nöropeptid-GPCR eylemleri iyon kanallarının fosforilasyonunu, sinaptik proteinleri veya ikinci haberciler siklik adenosin monofosfat (AMP) veya kalsiyuma bağlı protein kinazların aracılık ettiği transkripsiyon faktörlerini yansıtmaktadır (van Den Pol, 2012; Nadim ve Bucher, 2014). Sinir sisteminde sinapslar, hızlı iletim için öncelikle küçük molekülü vericilerin ve ligand kapılı iyon kanallarının geri

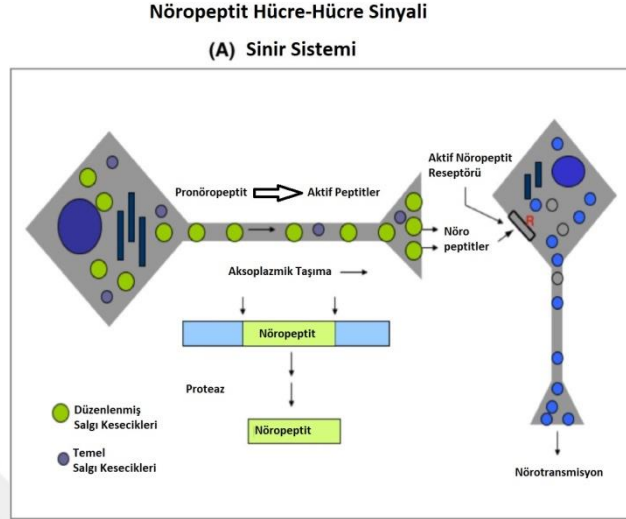
dönüştürülmesine dayanmaktadır. Ancak, hızlı geri dönüşüm vericileri ve diğer birçok salgılanan molekül (glutamat, asetilkolin, monoaminler ve nöropeptidler) dahil olmak üzere çok çeşitli ligandlar için seçici olan GPCR'ler, hızlı sinaptik iletimin ve elektriksel aktivitenin daha yavaş modülasyonunda kritik roller oynamaktadır (Grimmelikhuijzen ve Hauser, 2012; Varoquaux ve Fasshauer, 2017; Elphick ve ark., 2018). GPCR'lerin, peptid ligandları gibi yalnızca sinir sisteminde değil aynı zamanda diğer birçok dokuda da geniş bir şekilde dağılımının belirlenmesiyle ayrıca periferik etkilerinin olduğu belirtilmiştir (Hökfelt ve ark., 2000; Hökfelt ve ark., 2003).

Modülatör nöropeptidler, hızlı sinaptik iletim için gerekli olan hızlı verici yeniden alım ve/veya bozunma süreçlerine tabi olmadığından, salgılanan nöropeptidlerin, salım bölgelerinden yüzlerce mikrometre uzaktaki çok yüksek affiniteli nöropeptid-GPCR'lerine difüzyon için beyin intersitisyel boşluklarında yeterince uzun süre kaldıkları düşünülmektedir (Ludwig ve Leng, 2006; Nassel, 2009; Russo, 2017). Dolayısıyla, nöropeptid sinyalinin, önemli difüzyon mesafeleri boyunca reseptör-pozitif hücrelere çarpan bireysel nöronlardan salgılanmasıyla ve birçok lokal salgılayan nörondan tek reseptör-pozitif nöronlara difüzyonla yakınsamasıyla parakrin ve nispeten yavaş olduğu varsayılabilir (Smith ve ark., 2019). Moleküler yöntemlerde gözlemlenen son gelişmeler, sinaptik iletimi doğrudan etkileyebilen ve/veya parakrin bir şekilde hareket edebilen çok sayıda modülatör nöropeptidin varlığına işaret etmektedir (Palasz ve ark., 2015).

1.1.3. Nöropeptidlerin fonksiyonları

Nöropeptidler, nöroendokrin sistemlerde hücreler ve fizyolojik fonksiyonları düzenleyen çeşitli nöronal sinyal molekülleri sınıfı olarak bilinmektedir (Elphick ve ark., 2018). Sinir sisteminde, nöropeptidler daha küçük klasik nörotransmitter grubuyla birlikte en büyük nörotransmitter sınıfı olarak işlev görmektedir (Şekil 1.1). MSS, bu peptidleri davranışların kontrolü ve nöroendokrin sistemlerin merkezi düzenlenmesi için kullanırken, periferik sempatik ve parasempatik sinir sistemi, hedef fizyolojik organ sistemlerinin sinirsel düzenlenmesi için kullanılmaktadır. Nöropeptidler, nöronal hücre gövdesinden sinir terminallerine taşınan salgı veziküllerinde sentezlenmektedir. Bu tür salgı keseciklerinin aksonal taşınması sırasında, pro-nöropeptid prekürsörleri veya prohormon, olgun nöropeptidlere öncü işleme için proteazlarla birlikte yeni sentezlenmiş salgı veziküllerine

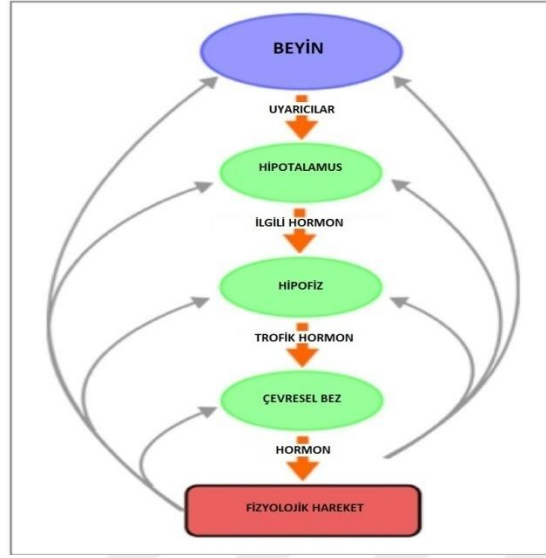
paketlenmektedir. Sekresyonun aktiviteye bağılı düzenlenmesi de, nörotransmisyon için sinir terminallerinde nöropeptidleri serbest bırakmaktadır (Hook ve ark., 2018).



Şekil 1.1 Sinir sistemindeki peptid nörotransmitterleri olarak nöropeptidler (Hook ve ark., 2018).

Endokrin sistemde ise, nöropeptidler hedef fizyolojik sistemler arasında hücreler arası sinyali koordine etmek için peptid hormonları olarak işlev görmektedir. Bu hormon sistemleri, özellikle homeostazdaki ve çevreye tepkilerdeki fizyolojik fonksiyonları koordine etmek için geri besleme peptid hormon sistemlerini kullanan nöropeptidleri kullanmaktadır (Şekil 2.2). Beyin nöropeptidleri ve endokrin peptid hormonları, fizyolojik düzenlemenin ince ayarı için geri bildirim sistemlerinde birlikte düzenlenmektedir. Çok sayıda peptid hormonu, uyarıcı ve geri besleme sistemindeki fizyolojik fonksiyonları düzenlemektedir. Örneğin hipotalamo-nörohipofizyal sistem, hipofizden adrenokortikotropik hormonunun (ACTH) salgılanmasını indüklemek için beyin hipotalamus bölgesinden kortikotropin salgılatıcı hormonu (CRF) salgılayarak hipofiz-adrenal eksenini düzenlemektedir. Serbest bırakılan ACTH, glukokortikoid üretiminin uyarılması için adrenal korteksi hedeflemektedir. Plazma glukokortikoid seviyesinde ortaya çıkan artışlar ise, sabit glukokortikoid seviyelerini korumak için CRF ve ACTH'ın geri bildirim inhibisyonuna katılmaktadır (Hook ve ark., 2018).

Nöropeptit Hücre-Hücre Sinyali
(B) Endokrin Sistem



Şekil 1.2. Endokrin sistemlerde peptid hormonları olarak nöropeptidler (Hook ve ark., 2018).

Nöropeptidlerin biyoaktiviteleri, beyin ve fizyolojik organların çeşitli fonksiyonlarını düzenlemektedir (Tablo 1.2). Bunlardan; aktif beyin nöropeptidleri analjeziyi düzenleyen ve kronik ağrı durumlarında önemli olan enkefalin, dinorfin ve beta-endorfinin opioid peptidlerini içermektedir (Inturrisi, 2002; Charbogne ve ark., 2014; Podvin ve ark., 2016). Bunun yanı sıra galanin, normal ve nörodejenerasyon koşullarında bilişi düzenlerken (Steiner ve ark., 2001; Counts ve ark., 2011), CCK (Degen ve ark., 2001) ve nöropeptid Y (NPY) (Kageyama ve ark., 2012) beslenme davranışını ve obeziteyi düzenlemektedir. Ayrıca kalsitonin, kalsiyum homeostazını (Tordoff, 2001) ve migren ağrısını (Raddant ve Russo, 2011), substance P ise hafızanın yanı sıra ağrıyı düzenlenmektedir (de Avila ve ark., 2014).

Nöroendokrin hormon sistemlerinde nöropeptidler; gelişme, büyüme, homeostaz, çevresel koşullara tepkiler ve ilgili temel fizyolojik işlevleri düzenleyen peptid hormonları olarak işlev görmektedir (Felig ve ark., 1981). Hipotalamusta üretilen peptid büyüme hormonu salıcı hormon (GHRH), gelişimsel büyüme ve metabolizmanın düzenlenmesinde büyüme hormonu üretimini ve hipofiz bezinden salgılanmasını düzenlemek için salgılanmaktadır. Yine hipotalamusta üretilen tirotropin salgılatıcı hormon (TRH) büyümeyi, gelişmeyi ve metabolizmayı kontrol etmek için tiroid bezinin tiroksin salınımını uyarmak üzere hipofizden tirotropin uyarıcı hormonun (TSH) salınımını uyarmaktadır.

Arka hipofizden salınan ve aynı zamanda antidiüretik hormon (ADH) olarak da bilinen vazopressin ise, su dengesini ve böbrek fonksiyonunu düzenlemektedir. Bu örnekler, nöropeptidlerin sinir ve nöroendokrin sistemlerdeki çeşitli etkilerinin varlığını göstermektedir. Dolayısıyla insanlarda, omurgalılarda ve ayrıca omurgasız türlerde tüm organ sistemleri arasında hücre-hücre iletişimi için gerekli olan nöropeptidlerin, hedef hücre fonksiyonlarını düzenlemek için yapılarını ve bunlara karşılık gelen biyolojik aktivitelerini tanımlamanın kritik öneme sahip olduğu bilinmektedir (Hook ve ark., 2018).

Tablo 1.2. Sinir ve endokrin sistemlerde nöropeptid işlevleri (Hook ve ark., 2018).

Nöropeptidler	Fizyolojik Düzenlemedeki İşlevleri
Beyin Nöropeptitleri	
Enkefalin	Analjezi, ağrı kesici
β -Endorfin	Analjezi, ağrı kesici
Dinorfin	Kronik ağrı
P maddesi	Ağrı nöro-transmisyonu
Galanin	Bilişsellik
Kolesistokinin (CCK)	İştah, öğrenme, hafıza
Nöropeptid Y (NPY)	Beslenme davranışı
Kalsitonin	Kalsiyum regülasyonu, migren
Endokrin Nöropeptidler	
Büyüme hormonu salıcı hormon (GHRH)	Büyüme ve gelişme
Tirotropin salgılatıcı hormon (TRH)	Büyüme ve gelişme
ACTH (adrenokortikotropin hormonu)	Steroid salınımı ve üretimi
CRF (kortikotropin salgılatıcı hormon)	Steroid üretimi ve stres
İnsülin	Glikoz metabolizması
Glukagon	Glikoz üretimi ve metabolizması
Vazopressin	Su dengesi

1.2. Hipotalamik Nöropeptidler

Nöropeptidlerin ikna edici bir çoğunluğu, hipotalamus ve limbik sistem dahil olmak üzere çok sayıda nöronal yolda, geniş bir fizyolojik aktivite spektrumunun yanı sıra benzersiz özellikler göstermektedir (Palasz ve ark., 2018). Bu nöronal yollardan biri olan hipotalamus, özellikle homeostaz için gerekli olan bir dizi otonomik fonksiyonu düzenleyen ön beyin bölgesi olarak bilinmektedir. Dolayısıyla hipotalamik nöropeptidler

ile bunların işlevleri ve dağılımları ile ilgili yapılan araştırmalar, çağdaş sinirbilimde büyük önem taşımaktadır (Palasz ve ark., 2015).

Moleküler nörobiyoloji ve biyoinformatik yöntemlerin dinamik gelişimi nedeniyle, son yıllarda birkaç yeni beyin nöropeptidi tanımlanmış ve karakterize edilmiştir (Palasz ve ark., 2018). Özellikle farklı tanımlama stratejileri, biyolojik aktivitelerden tanımlama, reseptör veya genomik yaklaşımlar dahil olmak üzere kullanılan bu teknikler, yeni peptidlerin keşfedilmesine büyük olanak tanımaktadır (Billert ve ark., 2020). Yakın zamanda keşfedilmiş nöropeptidlerden, birkaç hipotalamik çekirdekte ortak lokalize oldukları ve potansiyel olarak etkileşime girdikleri bildirilen phoenixin ve nesfatin-1'in önemli pleiotropik rollerine işaret edilmektedir (Friedrich ve ark., 2019).

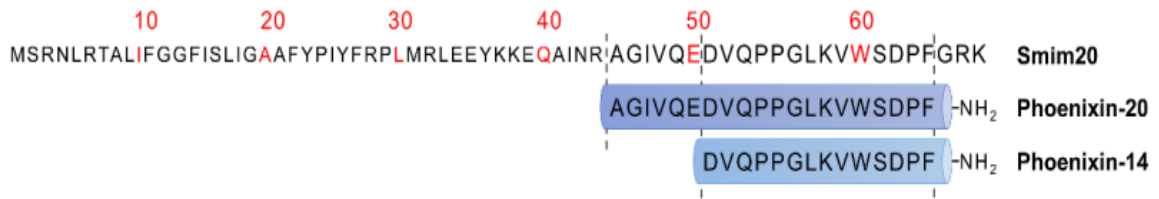
1.2.1. Phoenixin

İlk olarak 2013 yılında Yosten ve arkadaşları tarafından sıçan beyinde tanımlanan phoenixin (PNX), endojen bir nöropeptid olarak belirlenmiştir (Yosten ve ark., 2013). Sırasıyla, ilk olarak sıçan hipotalamusu ve sığır kalbinden tanımlanarak izole edilen bu nöropeptidin, insan, sıçan, fare, domuz ve köpek dahil olmak üzere çoklu türler arasında yüksek oranda korunduğu bildirilmiştir (Yosten ve ark., 2013). PNX'in ilk karakterizasyonu, normal üreme işlevi için oldukça önemli olduğunu göstermiş ve sonrasında PNX'in üremeye katılımı daha anlaşılır hale gelerek reseptörü tanımlanmıştır (McIlwraith ve Belsham, 2018). Daha sonra yapılan araştırmalar, PNX'in reproduktif bir peptidden daha fazlası olduğunu ve çeşitli biyolojik etkiler gösterebileceğini kanıtlamıştır. Ayrıca PNX'in MSS dışında periferik dokularda da eksprese edilen ve salgılanan bir nöropeptid olduğu da belirtilmiştir (Billert ve ark., 2020).

1.2.1.1. Phoenixin geni

PNX prekürsörü, C4orf52 geni tarafından kodlanarak sitoplazmik ribozomlarda sentezlendikten sonra membran proteinlerinin parçalandığı düzenlenmiş bir süreç olan ekto alan saçılması ile bölünmektedir (Hayashida ve ark., 2010; McIlwraith ve Belsham, 2018). Daha büyük prekürsör protein olan küçük integral membran proteini 20'nin (Smim20) C-terminalinden proteolitik bölünmeyle ayrılan PNX (Lyu ve ark., 2013; Yosten ve ark., 2013), PNX-14 ve PNX-20 olarak adlandırılan amidlenmiş 14 veya 20 amino asit zincirine

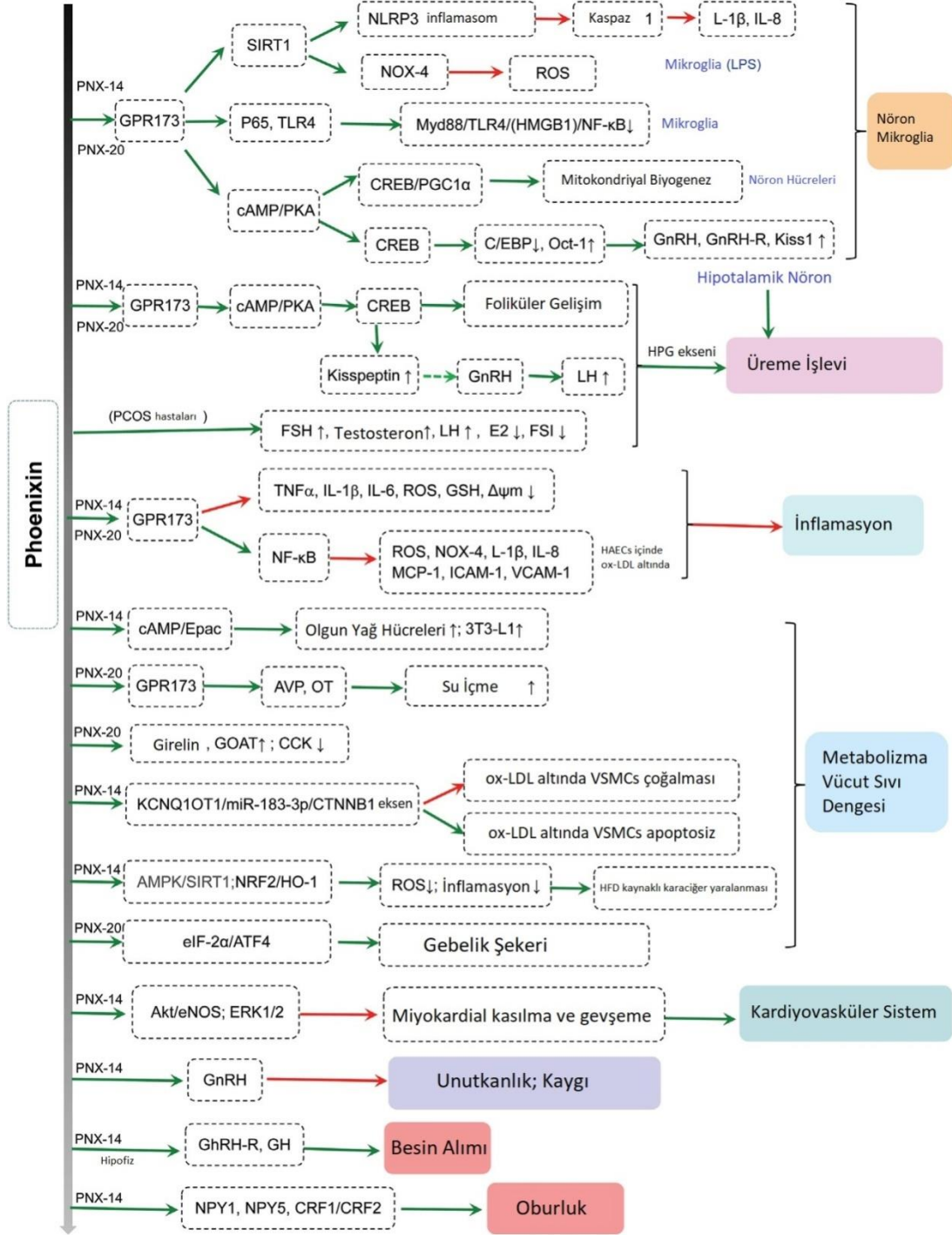
bölünmektedir (Yosten ve ark., 2013). Bu iki alt tip benzer biyoaktif özelliklere sahiptir ve bu aktiviteler için gerekli olan ortak bir C-terminal 14 amino asitlik segmenti paylaşmaktadır. C-terminal olarak amidlenmiş PNX-14'ün, amid asit dizisi DVQPPGLKVWSDPF-amid olarak sekanslanmaktadır. Bununla birlikte, N-terminal uzatılmış PNX-20 ise, AGIVQEDVQPPGLKVWSDPF-amid şeklinde sekanslanmaktadır (Şekil 1.3) (Lyu ve ark., 2013). Türler açısından yakından korunan PNX'in amino asit dizisi insan, sıçan, fare, sığır ve domuzda aynıdır. PNX-20'de ise insanlar ve kemirgenler arasında yalnızca bir amino asit farklı bulunmaktadır (Yosten ve ark., 2013).



Şekil 1.3. PNX prekürsör proteini (Smim20) ile PNX-20 ve PNX-14 izoformlarının amino asit dizileri (Billert ve ark., 2020).

1.2.1.2. Phoenixin reseptörü

GPCR ailesinin bir üyesi olan GPR173, beyinde eksprese edilen süper korunmuş reseptör (SREB) olarak bilinen, yüksek oranda korunmuş reseptör ailesinin bir parçasıdır (Matsumoto ve ark., 2000). En çok beyinde ve gonadlarda eksprese edilen SREB3 olarak da bilinen GPR173 (Matsumoto ve ark., 2000) için PNX potansiyel bir ligand olarak görev yapmaktadır (Stein ve ark., 2016; Mcilwraith ve ark., 2019). Son araştırmalar, PNX'in GPR173 reseptör aktivasyonu aracılığıyla birçok biyolojik işlevi yerine getirebileceğini bildirmiştir (Billert ve ark., 2020). PNX-20'nin granuloza hücrelerinin çoğalmasını hızlandırdığı, estradiol üretimini indüklediği ve reseptörü GPR173 aracılığıyla foliküler büyümeyi desteklediği gösterilmiştir (Nguyen ve ark., 2019). Ayrıca bu peptidin GPR173'ü aktive ederek lipopolisakkarit (LPS) kaynaklı sitotoksisteyi azalttığı belirlenmiştir (Sun ve ark., 2020). Ek olarak, güncel çalışmalar PNX'in çeşitli fizyolojik ve patolojik fonksiyonlarda rol oynadığını göstermiştir (Şekil 1.4) (Liang ve ark., 2022).



Şekil 1.4. PNX'in fizyolojik ve patolojik rolleri (Liang ve ark., 2022).

1.2.1.3. Phoenixin'in işlevleri

1.2.1.3.1. Phoenixin ve üreme

Hipotalamus, hipofiz ve gonadlar, cinsel olgunluğu teşvik eden ve üreme işlevini sürdüren, hayati öneme sahip düzenleyici hormonlar olan nörohormonları üretmektedir. İlk olarak PNX'in GnRH reseptörünün ekspresyonunu modüle ederek hipofiz gonadotropin sekresyonunu düzenlediği bulunmuştur (Yosten ve ark., 2013). Ayrıca bu peptidin hipotalamus-hipofiz-gonad (HPG) eksenini aktivitesinde ve stres kaynaklı doğurganlık bozukluklarında önemli bir rol oynadığı öne sürülmüştür (Yosten ve ark., 2013; Golysznay ve ark., 2022). PNX geni ve Smim20 proteininin, yetişkin zebrafish balığında üremenin kontrolünde önemli olan hipotalamus bölgeleri dahil olmak üzere beyinde ifade edildiği belirtilmiştir (Ceriani ve ark., 2021). PNX'in yumurtalık periyodikliğini düzenlemede de önemli bir aracı olduğu kanıtlanmıştır. Bu peptidin, GnRH tarafından uyarılan luteinize edici hormonun (LH) salgılanmasını arttırdığı ve gonadotropinler üzerinde direkt etki gösterdiği bildirilmiştir (Stein ve ark., 2016). C/EBP ve oct-1, GnRH promotörünün iki temel transkripsiyon faktörüdür ve PNX-20'nin, C/EBP geninin ekspresyonunu azaltarak ve Oct-1'in ekspresyonunu artırarak GnRH'nin ekspresyonunu düzenlediği belirtilmiştir. (Treen ve ark., 2016; Schalla ve Stengel, 2018). Ek olarak endometriyal hiperplazi veya piyometra dahil olmak üzere köpek uterus bozukluklarının gelişiminin, PNX ve reseptörü GPR173 ekspresyonunda bir aşağı regülasyonu indüklediği bulunmuştur (Rybska ve ark., 2022).

1.2.1.3.2. Phoenixin ve gıda alımı

Beyinde PNX immünoreaktivitesi, arkuat çekirdek (ARC) ve Nükleus traktus solitariusta (NTS) belirlenirken (Yosten ve ark., 2013; Prinz ve Stengel, 2017), reseptörü GPR173 ARC ve paraventriküler çekirdekte (PVN) eksprese edilmiştir (Stein ve ark., 2016; Treen ve ark., 2016). Bu beyin bölgeleri, gıda alımının düzenlenmesi ile yakından ilişkili olduğundan (Prinz ve ark., 2017; Schalla ve Stengel, 2018), PNX gıda alımında potansiyel bir rol oynamaktadır. Hipotalamustaki PNX ekspresyonu, hormonlar ve yağ asitleri gibi çevresel sinyaller tarafından modüle edilmiştir (McIlwraith ve ark., 2018). Diyetin PNX sekresyonunu uyarabileceği, GnRH nöronları üzerinde etki gösterebileceği ve

ardından GnRH'nin aktivasyonunu indükleyebileceği tahmin edilmiştir (Valsamakis ve ark., 2021). Aydınlatma altında intraserebroventriküler (i.c.v.) PNX-14 enjeksiyonunun, sıçanlarda gıda alımında doza bağlı bir artışa neden olduğu bildirilmiştir. Spesifik olarak, gıda alımının derinlemesine değerlendirilmesi, i.c.v. PNX-14 enjeksiyonunun, öğünün büyüklüğü, süresi ve gıda alım hızında artışa neden olurken, öğünler arasındaki aralık ve tokluk oranında azalmayı sağladığı ifade edilmiştir. Ancak, PNX-14'ün i.c.v. olarak karanlıkta veya intraperitoneal (i.p.) olarak ışık altında enjeksiyonunun gıda alımını etkilemediği belirtilmiştir (Schalla ve ark., 2017).

1.2.1.3.3. Phoenixin ve hafıza-Alzheimer hastalığı

İ.c.v. PNX-14 enjeksiyonunun, hayvanlarda yeni nesne tanıma ve hedef konum tanıma görevleri için hafıza oluşumunu desteklediği ve hafızada tutma süresini uzattığı bildirilmiştir (Jiang ve ark., 2015b). Yapılan bir klinik çalışma, sübjektif hafıza bozukluğu, hafif bilişsel bozukluk ve hafif Alzheimer hastalığı olan bireylerde PNX düzeylerini karşılaştırmış ve hafif bilişsel bozukluk grubundaki ortalama plazma PNX seviyesinin mantıksal bellek ile negatif korelasyon gösterdiğini vurgulamıştır (Yürüyen ve ark., 2017). Sübjektif hafıza bozukluğu grubundaki ortalama plazma PNX seviyesinin, anında hatırlama ile pozitif olarak ilişkili olması, plazma PNX seviyesinin bilişsel hafıza bozukluğu üzerinde öngörücü bir etkiye sahip olabileceğini düşündürmüştür (Yürüyen ve ark., 2017).

1.2.1.3.4. Phoenixin ve anksiyete

PNX, hipofiz gonadotropinlerinin salgılanmasını GnRH reseptör geninin ekspresyonunu arttırmak suretiyle düzenlemektedir (Millar ve Newton, 2013; Yosten ve ark., 2013). GnRH, anksiyeteye beyin tepkisini düzenlemede önemli bir rol oynadığından (Umathe ve ark., 2008; Telegdy ve ark., 2009) PNX'in anksiyete düzenleme mekanizmasına dahil olabileceği varsayılmıştır (Palasz ve ark., 2018). Yapılan bir çalışma, PNX-14'ün, açık alan testinde ve yükseltilmiş artı labirent testinde fareler üzerinde doza bağlı bir anti-anksiyete etkisi gösterdiği ve bu etkisinin PNX-14'ün amigdalada değil ön hipotalamusa enjeksiyonundan sonra ortaya çıktığına dikkati çekmiştir (Jiang ve ark.,

2015a). Yakın zamanda yapılan bir başka çalışma da, kısıtlama stresinin erkek sıçanlarda dolaşımdaki PNX seviyelerini düşürdüğünü göstermiştir (Schalla ve ark., 2020).

1.2.1.3.5. Phoenixin ve inflamasyon

Nöroinflamasyonun genellikle yaşanan beyinde ve Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, Edinilmiş Bağışıklık Yetmezliği Sendromu (AIDS) demans kompleksi ve inme gibi çeşitli hastalıklarda görüldüğü bildirilmiştir (Vesce ve ark., 2007). LPS, astrositlerin iltihaplanmasına neden olarak iltihaplı cisimleri aktive etmekte ve GPR173'ün gen ve protein ekspresyonunu inhibe etmektedir. PNX-14'ün ise, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini azaltabildiği ve LPS tarafından indüklenen süperoksit dismutaz (SOD) seviyesini düşürebildiği belirtilmiştir (Wang ve ark., 2020). Bunun yanı sıra PNX-14'ün, tümör nekroz faktörü- α (TNF- α), interlökin-1 β (IL-1 β) ve interlökin-6 (IL-6) gibi proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu düzenleyebildiği ve ROS oluşumunu azaltabildiği bildirilmiştir. Ayrıca BV2 mikrogliasında oksijen-glikoz yoksunluğu/reperfüzyon hasarının neden olduğu glutatyon seviyesini ise arttırdığı ortaya konulmuştur (Ma ve ark., 2020). Başka bir çalışmada, PNX-14'ün koruyucu nitrik oksit sentaz ve nitrik oksit ekspresyonunu arttırdığı ve insan beyni endotelial bEnd.3 hücrelerinde endotelial tek tabakanın geçirgenliğini azalttığı bulunmuştur (Zhang ve Li, 2020). Çok yakın zamanda yapılan bir çalışmada, PNX-14'ün sıçanlarda indometazin ile indüklenen duodenal ülseri koruyabildiği ifade edilmiştir. İnflamatuvar sitokinlerin (IL-1 β , TNF- α , IL-6 ve IL-12) serum seviyelerinde, malondialdehit (MDA) ve miyeloperoksidaz aktivitesinde bir azalışın, SOD ve katalaz (KAT) aktivitesinde ise bir artışın sergilendiği belirlenmiştir (Zandeh-Rahimi ve ark., 2022).

1.2.1.3.6. Phoenixin ve enerji metabolizması-vücut sıvı dengesi

PNX, insan vücut kitle indeksi ile pozitif korelasyona sahiptir ve bu da vücut ağırlığının düzenlenmesinde potansiyel bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Bu peptidin, beyaz adipositlerin üretimini teşvik edebileceği ve vücut ağırlığı kontrolünde yer alabileceği ifade edilmiştir. Ayrıca Smim20 ve GPR173 genleri, 3T3-L1 ve sıçan primer preadipositlerinde tespit edilmiş ve PNX-14'ün, 3T3-L1 ve sıçan primer preadipositlerinin cAMP/Epac'a bağımlı yoldan olgun adipositlere dönüşümünü uyardığı belirtilmiştir

(Billert ve ark., 2018). PNx-14'ün, deneysel alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı farelerinde AMP ile aktive olan protein kinaz/Sirtuin1 ve Eritroid 2 ile ilişkili faktör 2/heme oksijenaz-1 (NRF2/HO-1) yollarının aktivasyonu yoluyla yüksek yağlı diyetle indüklenen karaciğer hasarını hafiflettiği bildirilmiştir (Yang ve ark., 2020). Ek olarak streptozotosin ile indüklenen diyabetli farelerde PNx-14'ün, sirtuin-3 yolu aracılığıyla kardiyak hasarlara karşı koruma sağladığı da açıklanmıştır (Yao ve ark., 2021). PNx'in intraventriküler uygulamasının, sıçanlarda rastgele koşullar altında su içmeyi uyardığı ve geceleri susuzluk altında içme suyu miktarını arttırdığı belirtilmiştir. Bununla birlikte, losartan ile ön tedavinin, PNx etkisini bloke ettiği ortaya konmuştur (Haddock ve ark., 2020). Hem PNx hem de reseptörü GPR173'ün, hipotalamusun supraoptik çekirdek (SON) ve PVN'nda eksprese edilmesinden dolayı PNx'in, arginin vazopressin veya oksitosinin salgılanmasını etkileyebileceği öne sürülmüştür (Gasparini ve ark., 2018).

1.2.1.3.7. Phoenixin ve endokrin düzenleme

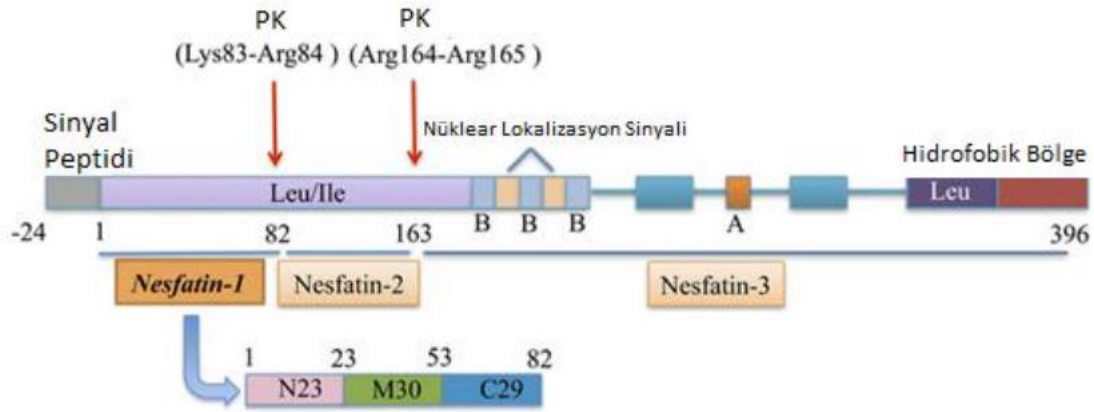
PNx ekspresyonu, bisfenol A (BPA), yağlı asit palmitat, dokosaheksaenoik asit (DHA) ve oleat tarafından düzenlenmektedir (McIlwraith ve ark., 2018). BPA, endokrin bozucu bir kimyasal olarak östrojenik aktiviteye sahiptir (Acconcia ve ark., 2015). Oleat ve palmitoleat tekli doymamış yağ asitleridir ve DHA çoklu doymamış yağ asitidir. Ölümsüzleştirilmiş hipotalamik nöronların palmitik asit veya BPA ile 2-24 saat tedavi edilmesinden sonra GPR173 geninin ekspresyon seviyesinin azaldığı belirlenmiştir. Sonuçlar, PNx'in çoklu yağ asitlerinin yanı sıra östrojenik aktiviteye yanıt verdiğini göstermiştir (McIlwraith ve ark., 2018). Ayrıca, palmitik asit ile ön muamelenin, PNx kaynaklı fosforile cAMP yanıt element bağlayıcı protein (CREB) seviyesini bloke ettiği bildirilmiştir (McIlwraith ve ark., 2019). Yakın zamanda yapılan bir çalışma, PNx-20'nin metabolik hormonları düzenlemek için doğrudan bağırsak hücreleri üzerinde hareket edebileceğini göstermiştir. Bu peptidin, fare mide endokrin hücrelerinde (MGN3-1) ghrelin ve ghrelin-O-asil transferazın (GOAT) mRNA seviyelerini önemli ölçüde yukarı regüle ettiği ve fare enteroendokrin hücrelerinde (STC-1) CCK mRNA seviyesini belirgin şekilde baskıladığı ortaya çıkarılmıştır (Mukherjee ve Unniappan, 2021).

1.2.2. Nesfatin-1

İlk kez 2006 yılında Oh-I ve arkadaşları tarafından hipotalamusta keşfedilen nesfatin-1 insanlarda, farelerde ve sıçanlarda yüksek oranda korunmuş bir protein olan nükleobindin2'nin (NUCB2) amino terminal parçası olarak tanımlanmıştır (Oh-I ve ark., 2006). Beslenme kontrolünde yer alan ve merkezi olarak hareket eden anoreksijenik bir peptid olan nesfatin-1'in hipotalamusun iştah kontrolünden sorumlu çekirdeklerinden salgılandığı gösterilmiştir. Araştırmacılar, ayrıca leptin geninin mutant olduğu obez farelerde bu peptidin yiyecek alımını baskıladığını bildirmiştir (Oh-I ve ark., 2006). Nesfatinin iştah kontrolündeki etkinliğini leptin yolağından bağımsız olarak gerçekleştirmesi nedeniyle leptin geninin mutant olduğu kişilerin obezite tedavisinde nesfatin kullanılmasının etkin olabileceği düşünülmüştür (Cowley ve Grove, 2006).

1.2.2.1. Nesfatin-1 geni

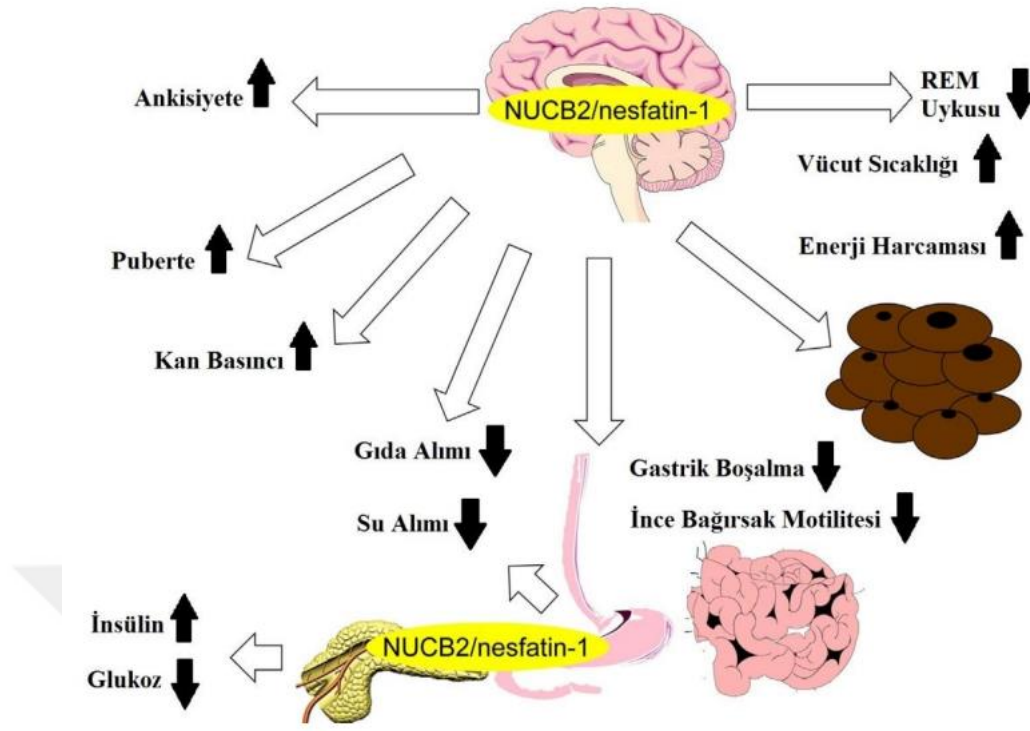
Yaklaşık 9,8 kDa ağırlığına sahip, yarılanma ömrü 23,5 dakika olan nesfatin-1, prekürsör proteini NUCB2'den türemiş, 82 aminoasit uzunluğunda bir nöropeptiddir (Oh-I ve ark., 2006; Aydın, 2013). NUCB2 plazma membranı ve nöroplazmada yer alan ve önünde 24 amino asitlik sinyal peptidinin yer aldığı 396 amino asit uzunluğunda bir polipeptiddir (Palasz ve ark., 2012). Posttranslasyonel modifikasyonlar için birçok bölgeye sahip olan NUCB2'nin özel prohormon dönüştürücü enzimlerce (Prohormon konvertaz; PC3/1 ve PC2) gerçekleşen modifikasyonları sonucunda; nesfatin-1 (1-82 amino asitleri arasından kırılma ürünü), nesfatin-2 (85-163 amino asitleri arasından kırılma ürünü) ve nesfatin-3 (166-396 amino asitleri arasından kırılma ürünü) formunda üç farklı ürün ortaya çıkmaktadır (Aydın, 2013). Yapılan çalışmalarda nesfatin-1'in birçok fizyolojik etkisi gösterilmiş olmakla birlikte, kalsiyum bağlayan proteinin DNA yapısı ile aynı yapıya sahip olan nesfatin-2 ve nesfatin-3'ün herhangi bir biyolojik aktiviteye sahip olduğuna dair henüz bir kanıt bulunmamaktadır (Garcia-Galiano ve ark., 2010a). N-terminal (N23), orta kısım (M30) ve C-terminal (C29) olmak üzere üç bölgeden oluşan nesfatin-1'in anoreksijenik etkileri başta olmak üzere tüm fizyolojik etkilerinin gösterilmesinde M30 bölgesinin anahtar rolü oynadığı ifade edilmiştir (Şekil 5) (Yamada ve ark., 2010; Palasz ve ark., 2012; Aydın, 2013).



Şekil 1.5. NUCB2 ve nesfatin-1'in protein yapısı. PK: Prohormon konvertaz, A: Asit aminoasitler, B: Basit aminoasitler, N23: İlk 23 aminoasit (N-terminal segmenti), M30: İkinci 30 aminoasit (mid-segmenti), C29: Son 29 aminoasit (C-terminal segmenti) (Feijoo-Bandin ve ark., 2016).

1.2.2.2. Nesfatin-1 reseptörü

Nesfatin-1 reseptörü henüz tanımlanmamış olsa da, özelliklerini inceleyen bazı çalışmalar bulunmaktadır. Nesfatin-1'in bir GPR reseptörü ile etkileşerek, N- (Iwasaki ve ark., 2009), L- ve P/Q-tipi kalsiyum kanal blokerleri (Brailoiu ve ark., 2007) tarafından baskılanan bir kalsiyum akışına yol açmasıyla (Brailoiu ve ark., 2007) bu kanalları içeren bir etki tarzı olduğunu önermektedir. Önceki çalışmalar, sinyalleme kaskadının bir kısmının bir Gi/o (Brailoiu ve ark., 2007; Ishida ve ark., 2012) ve/veya GS-protein-bağlı reseptör aktivasyonunun yanı sıra protein kinaz A sinyali (Brailoiu ve ark., 2007) olduğunu göstermektedir. Otoradyografi hipofiz, adrenal bezler, testis, pankreas ve yağ dokusu gibi çeşitli endokrin organların yanı sıra iskelet kası, karaciğer, böbrekler, kalp ve akciğerlerdeki olası reseptör ekspresyon bölgelerini göstermiştir. Merkezi varsayılan reseptör ekspresyon bölgeleri arasında korteks, PVN, area postrema, Vagus sinirinin dorsal motor çekirdeği ve beyinciğin bulunması (Prinz ve ark., 2016), nesfatin-1'in geniş bir homeostatik fonksiyonunun olduğunu düşündürmektedir (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. Nesfatin-1'in merkezi ve periferik etkileri (Stengel, 2015).

1.2.2.3. Nesfatin-1'in işlevleri

1.2.2.3.1. Nesfatin-1 ve beslenme-gıda alımı

Gıda alımının kontrolünde merkezi bir rol oynadığı bilinen nesfatin-1'in, beyin ventrikülüne yapılan enjeksiyonundan sonra doyumluk hissinin artmasına ve besin alımının azalmasına, kronik uygulanmasından sonra ise vücut ağırlığının düşüşüne sebep olduğu bildirilmiştir (Oh-I ve ark., 2006; Goebel ve ark., 2011). Sıçan (Könczöl ve ark., 2012), fare (Goebel ve ark., 2011), domuz (Lents ve ark., 2013) ve balık (Gonzalez ve ark., 2010) gibi çeşitli türler üzerinde yapılan araştırmalar, bu peptidin ventriküler enjeksiyonundan sonraki anoreksijenik etkisini desteklemiştir. Bununla birlikte yüksek dozda nesfatin-1'in i.p. yolla uygulamasının farelerde besin alımı üzerine azaltıcı (Shimizu ve ark., 2009), subkutan (s.k.) yolla kronik enjeksiyonunun ise inhibe edici bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Mortazavi ve ark., 2015). Nesfatin-1'in merkezi anoreksijenik etkilerini, MSS'de çeşitli reseptörler ve sinyal yolları üzerinden gösterdiği ifade edilmiştir (Sedbazar ve ark., 2014; Folgueira ve ark., 2017; Heidarzadeh ve ark., 2018).

1.2.2.3.2. Nesfatin-1 ve gastrointestinal sistem

Serebral yan ventrikül yoluyla Nesfatin-1'in, amigdalanın merkezi çekirdeği (Wang ve ark., 2014), bazomedial amigdala (Xu ve ark., 2015), ARC (Li ve ark., 2013a), PVN (Guo ve ark., 2015), lateral hipotalamus (LH) (Xu ve ark., 2017) ve ventromedial hipotalamusa (VMH) (Gao ve ark., 2017) yapılan mikro enjeksiyonlarından sonra gastrik boşaltımın azalması (Stengel ve ark., 2009b) ile antral ve duodenal motilitenin inhibisyonu (Atsuchi ve ark., 2010) gıda alımında inhibitör aktivitesinin bir göstergesi olarak kabul görmektedir. Nesfatin-1'in intravenöz (i.v.) olarak enjeksiyonunun, mide kasılmalarını azalttığı ve bu etkinin periferik reseptörler aracılığı ile gerçekleşebileceği öne sürülmüştür (Stengel ve ark., 2013; Watanabe ve ark., 2015). Son zamanlarda yapılan bir araştırmada, inatçı kusma ve bulantının tedavi edilmesi amacıyla kullanılan kronik gastrik elektrik stimülasyonunun, dolaşımdaki nesfatin-1 düzeyini azalttığı ve nesfatin-1'in bu hastalığa patofizyolojik olarak katkıda bulunduğu ortaya konmuştur (Meleine ve ark., 2017). Mide motilitesini etkilemesinin yanı sıra, serebral yan ventrikül yoluyla uygulanan nesfatin-1, 2-deoksi-D-glikoz ile uyarılmış mide asiti salgısını azaltarak sekretuar fonksiyonları da değiştirebilmektedir (Xia ve ark., 2012).

1.2.2.3.3. Nesfatin-1 ve kan glikoz homeostazı

Nesfatin-1'in, farklı türlerde pankreasın endokrin bezlerinde insülin ile ortak lokalize olduğu bildirilmiştir (Foo ve ark., 2010; Mohan ve Unniappan, 2012; Morton ve ark., 2018). *İn vitro* olarak glikoz ile uyarılmış insülin salınımını nesfatin-1 arttırmakta (Gonzalez ve ark., 2011a) ve bu durum da bu peptidin pankreastaki varsayılan reseptörlerinin desteklediği kan glikozunu düşürücü bir etki olarak kabul edilmektedir (Prinz ve ark., 2016). Oral yolla glikoz alımından sonra kan glikoz seviyelerinin ayarlanmasında görev almasının yanı sıra (Gonzalez ve ark., 2011b), i.v. (Dong ve ark., 2013) veya s.k. (Li ve ark., 2013b) nesfatin-1 enjeksiyonu, kan glikozunun düşürülmesinde rol alan mekanizmaları dahil ederek de glikoz homeostazının korunmasında büyük roller üstlenmektedir. Ayrıca Tip 2 diyabet koşullarında pankreatik nesfatin-1 ekspresyonunda bir azalış gözlenmesine rağmen (Riva ve ark., 2011), genel dolaşımdaki nesfatin-1 düzeylerinde bir artış görüldüğü ifade edilmiştir (Dong ve ark., 2013).

1.2.2.3.4. Nesfatin-1 ve su tüketimi

Nesfatin-1, yeme davranışlarının düzenlenmesinin yanı sıra vücut sıvılarının dengelenmesinde de önemli bir rol oynamaktadır (Yosten ve ark., 2012; Yoshimura ve ark., 2014). Serebral yan ventrikül yoluyla uygulanan nesfatin-1'in, melanokortin ($MCR^{3/4}$) ve oksitosin reseptörleri üzerinden su alımında azalmaya yol açtığı gösterilmiştir. Nesfatin-1'in antidipsojenik etkinliği, anoreksijenik etkinliğinden daha kısa sürede belirgin hale geldiğinden, besin alımındaki azalmanın su alımındaki düşüşten kaynaklandığı kabul edilmektedir (Yosten ve Samson, 2009). Doza bağımlı olarak uygulanan nesfatin-1'in gece boyu su kısıtlaması ve hipertonic sıvı tüketimi sonrasında artış gösteren anjiyotensin II'nin etkinliğini de zayıflattığı bildirilmiştir (Yosten ve ark., 2012). Vücut sıvı dengesinin merkezi olarak düzenlenmesinde rol alan bölgelerden biri olan subfornikal organda, NUCB2 mRNA ekspresyonunun var olduğu da bilinmektedir (Kuksis ve Ferguson, 2014).

1.2.2.3.5. Nesfatin-1 ve enerji metabolizması

Nesfatin-1'in merkezi uygulamasının vücut sıcaklığını arttırdığı (Könczöl ve ark., 2012), enerji tüketimi, esmer yağ doku büyümesi ve kuyruk ısısının ayarlanması gibi metabolik olayları $MCR^{3/4}$ yolu üzerinden düzenlediği ifade edilmiştir (Dore ve ark., 2017a). Özellikle soğuk hava şartlarında, PVN'teki nesfatin-1 immünoreaktif nöronların aktive oldukları da belirtilmiştir (Könczöl ve ark., 2012). Nesfatin-1'in rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi (mTOR) sinyal yolağı aracılığıyla esmer yağ doku farklılaşmasını uyarmasından dolayı enerji harcanmasında uzun süreli değişikliklere sebep olabileceği kabul edilmektedir (Wang ve ark., 2016). Nesfatin-1'in s.k. olarak uygulanmasıyla, besin alımı ve vücut ağırlığından bağımsız olarak, plazma kolesterol ve trigliserid düzeylerinde bir azalmanın meydana geldiği bilinmektedir (Yin ve ark., 2015). Diyabet şartlarında, i.v. yolla uygulanan nesfatin-1'in, serbest yağ asitlerini ve vücut ağırlığını normal seviyelere getirdiği gözlenmiştir (Dong ve ark., 2013).

1.2.2.3.6. Nesfatin-1 ve anksiyete-depresyon

Anksiyete davranışlarında ve stres yanıtlarının düzenlenmesinde görev alan bazı beyin bölgelerinde NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi tespit edilmiştir (Brailoiu ve

ark., 2007; Goebel-Stengel ve ark., 2011). Serebral yan ventrikülyoluyla uygulanan nesfatin-1'in, hem plazma ACTH hem de kortikosteron seviyelerini arttırdığı (Könczöl ve ark., 2010; Yoshida ve ark., 2010) ve bu sayede hipotalamus-hipofiz-adren (HPA) eksenini düzenlenmesinde görev alabileceği gösterilmiştir. Ayrıca, bilateral adrenalectomi sonrasında PVN'ta NUCB2 mRNA ekspresyonunun arttığı ve bu yükselişin HPA eksenini aktivitesi ile modüle edildiği de bildirilmiştir (Könczöl ve ark., 2010). Yapılan davranış testleriyle nesfatin-1'in merkezi olarak uygulamasının kaygı benzeri davranışlara sebep olduğu (Merali ve ark., 2008), hem merkezi (Yosten ve Samson, 2009) hem de periferik (Ge ve ark., 2015) olarak kronik uygulamasının ise anksiyete benzeri davranışları arttırdığı ortaya konmuştur. Ayrıca NUCB2/nesfatin-1'in otonomik, nöroendokrin ve davranışsal stres yanıt mekanizmalarında da görev aldığı gösterilmiştir (Dore ve ark., 2017b).

1.2.2.3.7. Nesfatin-1 ve üreme

Birçok fonksiyonel görevinin yanında nesfatin-1'in üremenin olgunlaşması ve işlevleri üzerinde de önemli bir rolü olduğu bildirilmiştir (Schalla ve Stengel, 2018). Pubertal geçiş esnasında dişilerde, hipotalamik NUCB2 mRNA düzeylerinde ve NUCB2/nesfatin-1 protein içeriğinde artışların meydana geldiği ve merkezi olarak nesfatin-1 uygulamasının dolaşımdaki gonadotropinlerin yükselmesine sebep olduğu da belirtilmiştir (Garcia-Galiano ve ark., 2010b). Ayrıca, nesfatin-1'in testis dokusundan koryonik gonadotropin ile uyarılmış testosteron salınımında bir yükselişe sebep olduğu da gösterilmiştir (Garcia-Galiano ve ark., 2012). Merkezi yolla nesfatin-1 uygulamasının, hipotalamik GnRH, kisspeptin, hipofizer folikül stimüle edici hormon (FSHb), LHb ve testiküler steroidogenik akut düzenleyici protein ekspresyonlarında bir düşüşe sebep olduğu ortaya koyulmuştur (Garcia-Galiano ve ark., 2010b; Gao ve ark., 2016). Bir in vitro çalışmada, testosteronun hipotalamik ve hipofizer NUCB2/nesfatin-1 protein ekspresyonunu stimüle ettiği dikkati çekmiştir (Hatef ve Unniappan, 2017). Yakın zamanda yapılan bir başka çalışmada ise, nesfatin-1 ve ko-eksprese edilen PNX kombinasyonu ile tedavinin, kandaki üreme hormonu seviyelerini sinerjetik bir etki ile etkileyerek erkek HPG eksenini üzerinde düzenleyici bir etki sağladığı rapor edilmiştir (Güvenç ve ark., 2019).

1.2.2.3.8. Nesfatin-1 ve solunum

Nesfatin-1'in solunum ile ilgili çeşitli merkezlerdeki ekspresyonu ile (Goebel ve ark., 2009; Goebel ve ark., 2011) solunumun kontrolünde de görev alabileceği düşünülmektedir. 12 saat aç bırakılmış ve akabinde *ad libitum* olarak beslenmiş sıçanlarda yapılan bir çalışmada, i.c.v. nesfatin-1 enjeksiyonunun tidal volüm, solunum sayısı ve dakika solunum hacmini doza ve zamana bağlı olarak arttırdığı ve hiperventilasyona yol açtığı belirtilmiştir. Ayrıca nesfatin-1'in periferik olarak uygulamasının, sıçanlarda tidal volümde bir değişikliğe sebep olmaksızın, solunum sayısı ve dakika solunum hacminde bir yükselişe neden olduğu da ortaya konmuştur (Çiftçi ve ark., 2019).



2. MATERİYAL VE METOT

2.1. Deney Hayvanlarının Kimliği ve Temini

Çalışmada deney hayvanı olarak 3-4 aylık, 6 adet dişi ve 6 adet erkek olmak üzere toplam 12 adet Spraque-Dawley cinsi sıçan kullanıldı. Sıçanlar, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi (FÜDAM) tarafından temin edildi ve çalışma boyunca buradaki standart laboratuvar koşullarında (%40-60 nem, $24\pm3^{\circ}\text{C}$ ortam ısısı, 12 saat (07:00-19:00) aydınlık: 12 saat (19:00-07:00) karanlık barındırıldı. Sıçanlara, standart rat pellet yemi ve su *ad libitum* olarak sağlandı.

Sıçanlar üzerinde uygulanan tüm prosedürler, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (FÜHADYEK) onayladığı 15.12.2019 tarih ve 145 sayılı etik kurul kararı doğrultusunda gerçekleştirildi.

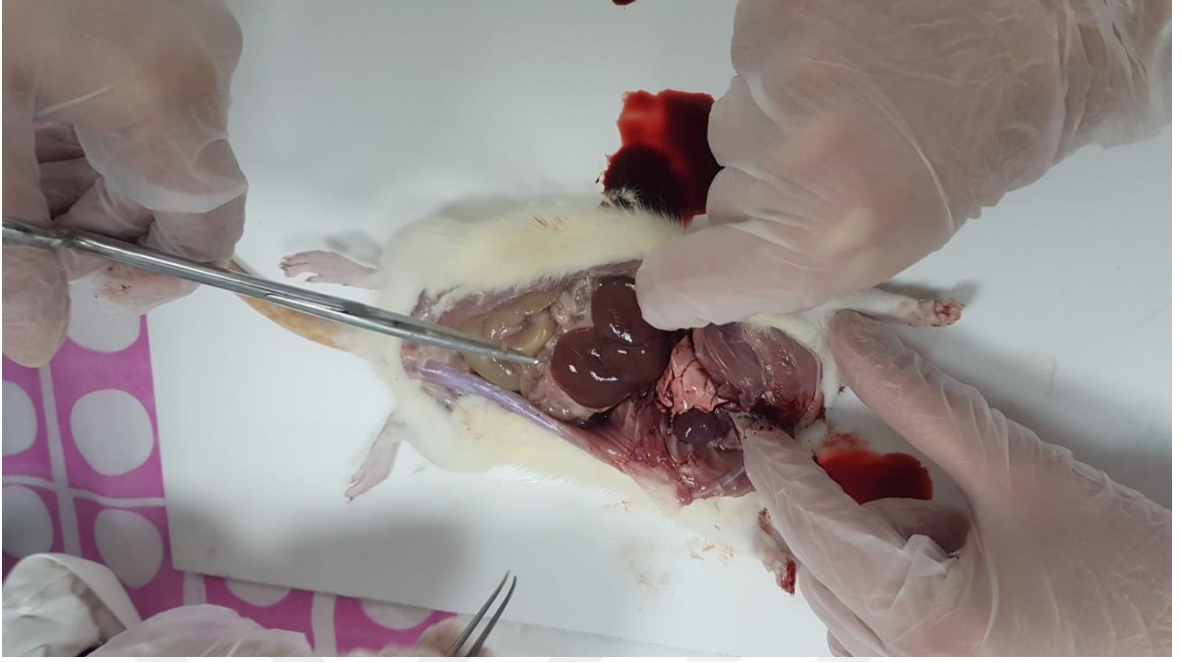
2.2. Deney Hayvanlarından Örneklerin Alınması

Dişi ve erkek olmak üzere 2 gruba ayrılan toplam 12 adet sıçan, anestezi altında dekapite edilerek beyin, beyincik, karaciğer, akciğer, böbrek, böbrek üstü bezi, ovaryum, uterus ve testis dokuları hızlı bir şekilde çıkarıldı (Resim 2.1-2.2). Alınan dokular immünohistokimyasal incelemeler için %10'luk tamponlu nötral formalin solüsyonunda (Tablo 2.1) immersiyon yöntemi ile tespit edildi.

Tablo 2.1. %10'luk tamponlu nötral formalin solüsyonunun hazırlanması (Suvarna ve ark., 2018).

Kimyasal	Miktar
Çeşme suyu	900 mL
Formaldehid (%37)	100 mL
Sodyum fosfat, monobazik, monohidrat	4 g
Sodyum fosfat, dibazik, anhidroz	6.5 g

pH: 7.2-7.4 arasında olmalıdır.



Resim 2.1. Karaciğer, akciğer, böbrek, adren, ovaryum, uterus ve testis dokularının alınması



Resim 2.2. Beyin ve beyincik dokularının alınması

2.3. Histolojik İncelemeler İçin Doku Hazırlanması

Dokular %10'luk tamponlu nötral formalin solüsyonunda 24-30 saat süreyle tespit edildi. Akarsu altında yıkamanın ardından, dokular rutin histolojik takip prosedürleri için %70, %80, %96'lık ve %100'lük dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidratasyon işlemi tamamlandı. Sonraki aşamada saydamlaştırma işlemi için ksilol serileri ile muamele edildikten sonra dokular ksilol-parafin karışımında 45°C'lik etüvde 1 gece bekletildi. Bu süre sonunda dokular üç farklı parafin serisinde birer saat bekletilerek parafin blokları hazırlandı. Elde edilen parafin bloklardan, immünohistokimyasal boyamalar için mikrotom (Thermo Scientific, HM325) ile 5 mikrometre (µm) kalınlığında kesitler polilizin kaplı lamlara alındı (Şahin ve Aydın, 2013).

2.4. İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi

Avidin-biotin-peroksidaz kompleksi yöntemine göre immünohistokimya boyama prosedürü uygulandı (Hsu ve ark., 1981). Alınan doku kesitleri, ksilol ile deparafinize edildikten sonra azalan dereceli alkol serilerinden geçirilerek rehidratasyon işlemi uygulandı. Daha sonra, kesitler antijen maskelenmesinin ortadan kaldırılması için sitrat tampon solüsyonu (pH:6) içerisine daldırılarak, mikrodalga fırında, 15 dakika süre ile kaynatıldı. Kaynatma işleminden sonra, kesitler soğuması için oda ısısında yaklaşık olarak 20 dakika bekletildi. Daha sonra kesitler Phosphate Buffered Saline (PBS) solüsyonu (Sigma-Aldrich Chemical Co., USA) ile 3'er kez tekrarlanmak suretiyle 5'er dakika yani toplamda 15 dakika boyunca yıkandı. Akabinde, kesitler endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için H₂O₂ blok solüsyonu (Hydrogen Peroxide Block, TP-015-HA, Thermo Fisher Scientific Co., USA) ile 15 dakika inkübe edildi. PBS ile 3x5 dakika yıkanan kesitlere spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için 10 dakika Ultra V Block (TP-015-HA, Thermo Fisher Scientific Co., USA) solüsyonu uygulandı. Yapılan bu işlemlerden sonra kesitler, 1/300 oranında sulandırılan PNX-14 (H-079-01, Phoenix Pharmaceuticals Inc., Burlingame, CA, USA) ve NUCB2/nesfatin-1 (H-003-22, Phoenix Pharmaceuticals Inc., Burlingame, CA, USA) primer antikörleri ile 1 gece boyunca +4 C°'de nemli ortamda inkübe edildi. Negatif kontrol için primer antikor yerine PBS solüsyonu damlatıldı.

Dokular primer antikor uygulamalarından sonra PBS ile 3x5 dakika yıkanarak sekonder antikor (Biotinylated Goat Anti-Polyvalent (anti-mouse/rabbit IgG), TP-015-HA,

Thermo Fisher Scientific Co., USA) ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildi. Akabinde, dokular tekrar PBS ile 3x5 dakika yıkanıp Streptavidin Peroxidase (TP-015-HA, Thermo Fisher Scientific Co., USA) ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon işleminden sonra dokular tekrar PBS ile yıkandı. Dokulara 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) chromogen vesubstrate (TP-015-HA, Thermo Fisher Scientific Co., USA) içeren solüsyon damlatıldı ve ışık mikroskopunda görüntü sinyali alınır alınmaz dokular çeşme suyu ile yıkamaya alındı. Dokuların zıt boyaması Mayer hematoksilen ile yapıldıktan sonra dokular tekrar çeşme suyundan geçirilerek boyama işlemi tamamlandı. Kesitler uygun kapatma solüsyonu (Aqua Mount, Thermo Fisher Scientific Co., USA) ile kapatıldı.

Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda (Olympus BX-51, Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, JAPAN) incelendi ve kesitlerdeki boyama miktarı beş farklı mikroskop sahasının taranmasıyla değerlendirildi. Boyamalar 0=negatif, 0.5=eser, 1=hafif, 2=orta ve 3=yoğun olmak üzere 0-3 arasında sayısal bir puanlama ile hesaplandı. Negatif alanlara 0, <% 25 boyama alanlarına 0.1, % 26-50 boyama alanlarına 0.4, % 51-75 boyama alanlarına 0.6 ve % 76-100 boyama alanlarına 0.9 değerleri verildi. Nihai histoskor hesaplaması: histoskor=alan×yoğunluk formülü kullanılarak yapıldı (Aydın ve ark., 2016).

2.5. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel veriler, IBM SPSS/PC (Versiyon 21.0, IBM Co., North Castle, New York, ABD) yazılım programı ile analiz edildi. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunuldu. İstatistiksel anlamlılık $p<0.05$ olarak belirlendi.

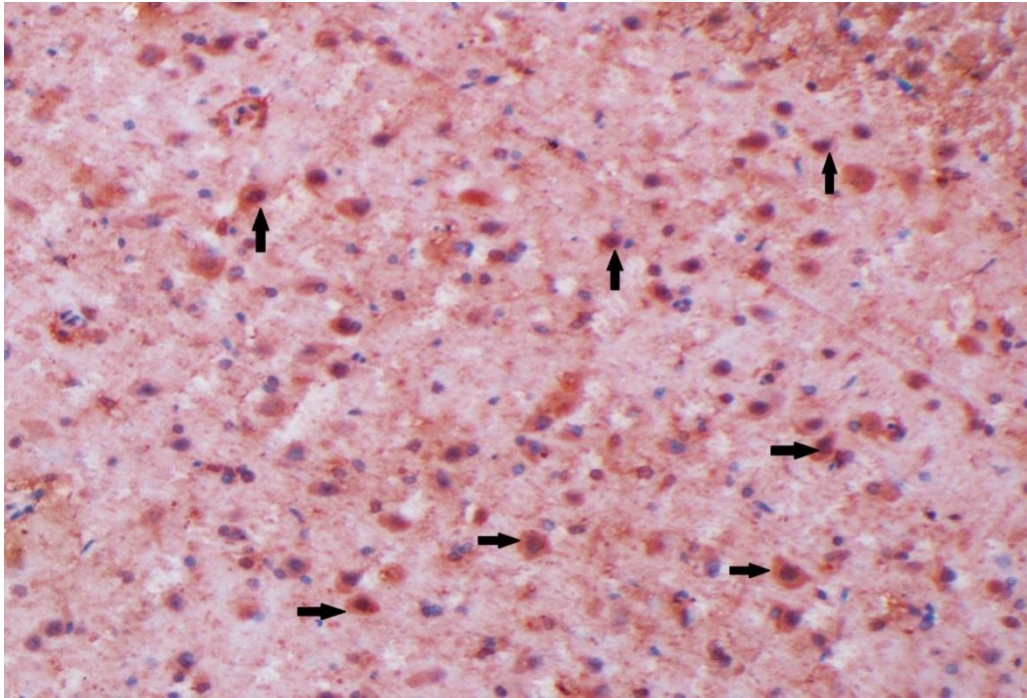
3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. İmmünohistokimyasal Bulgular

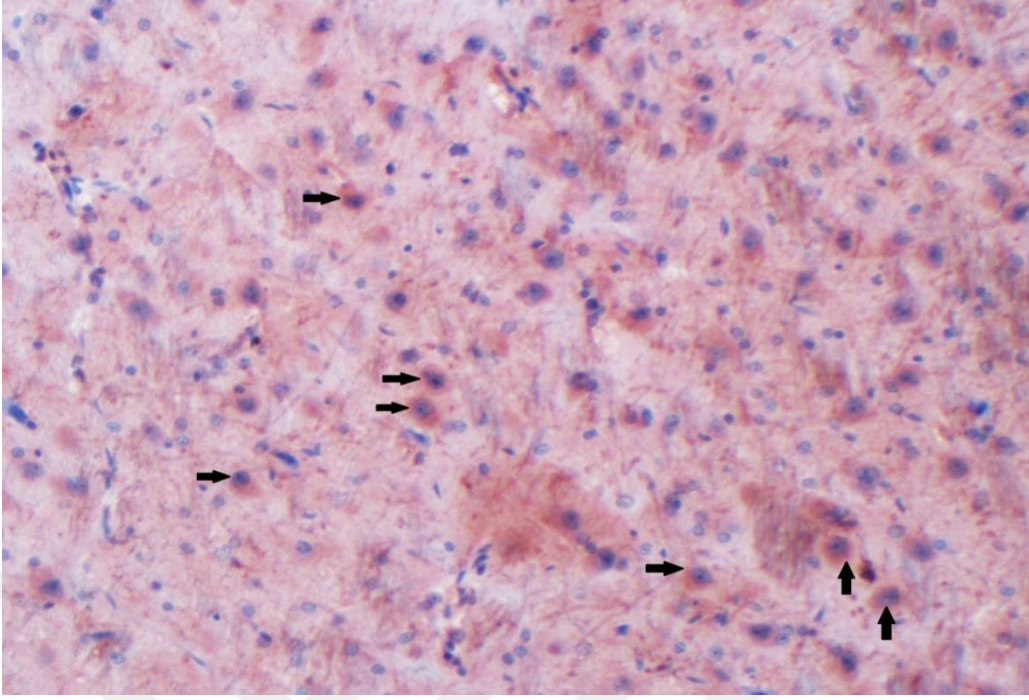
3.1.1. Dişi sıçanların dokularındaki immünohistokimyasal bulgular

Işık mikroskobu altında yapılan inceleme sonucunda, dişi sıçanların beyin, beyincik, karaciğer, akciğer, böbrek, böbrek üstü bezi, ovaryum ve uterus dokularında PNX-14 ve NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivite belirlendi.

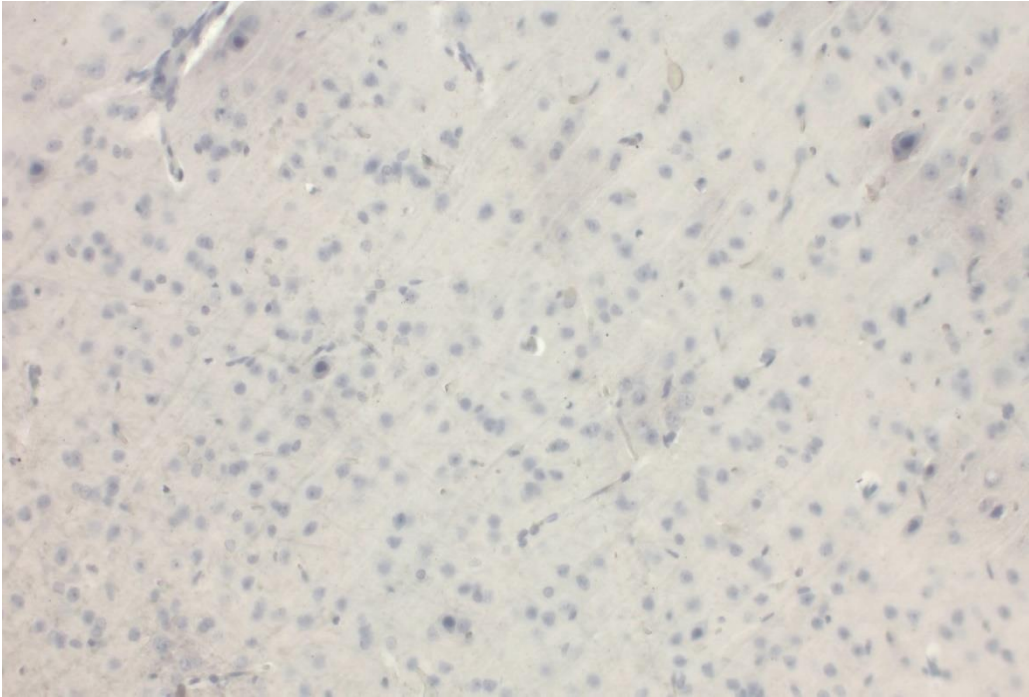
Beyin dokusunun moleküler tabakasındaki nöronlarda yoğun şiddette PNX-14 immünoreaktivitesi gözlenirken (Şekil 3.1), NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesinin orta şiddette olduğu belirlendi (Şekil 3.2). Negatif kontrol dokusunda ise herhangi bir immünoreaktivite gözlenmedi (Şekil 3.3).



Şekil 3.1. Beyin dokusunda PNX-14 immünoreaktivitesi (oklar) (Mayer hematoxilen, Büyütme: X20 μ m)

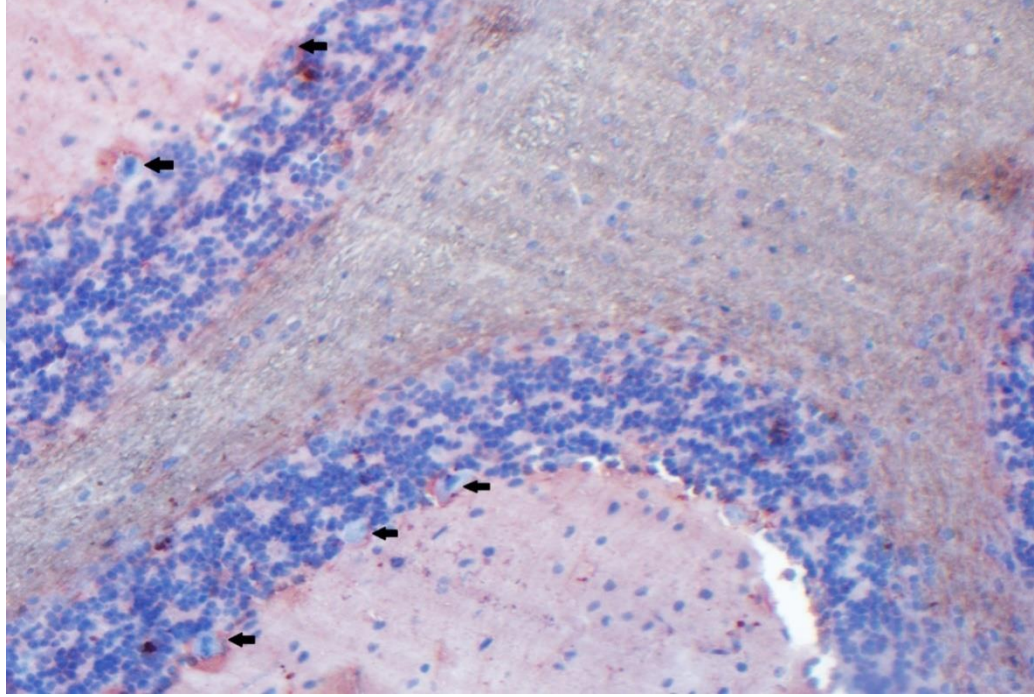


Şekil 3.2. Beyin dokusunda NUCB2/nesfatin-1 immünoaktivitesi (oklar) (Mayer hematoxilen, Büyütme: X20 μ m)

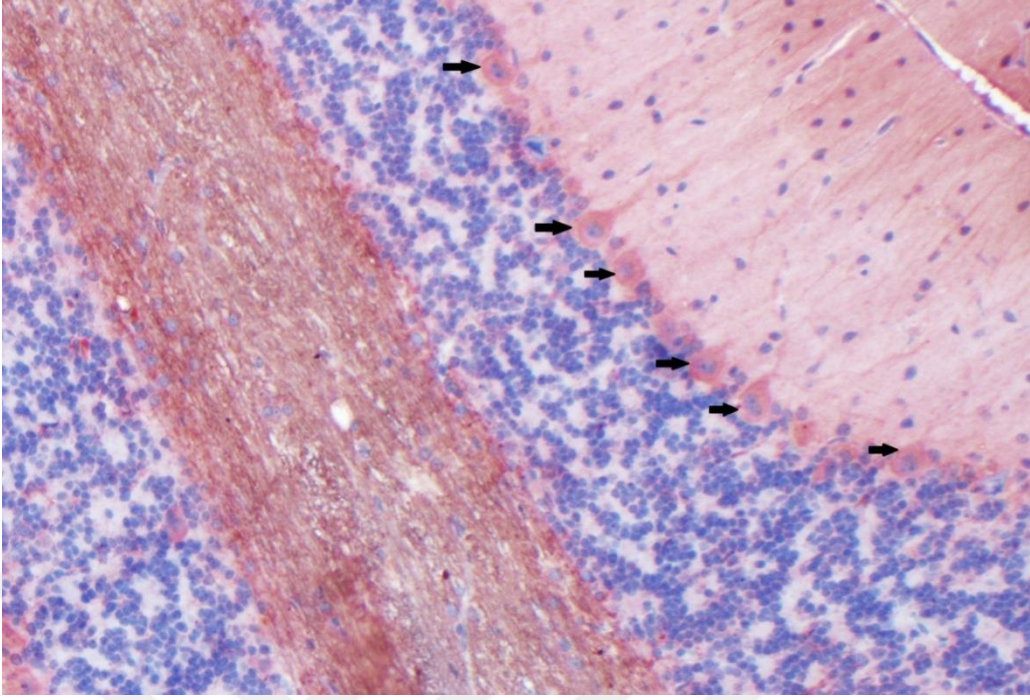


Şekil 3.3. Negatif kontrol dokusu (Mayer hematoxilen, Büyütme: X20 μ m)

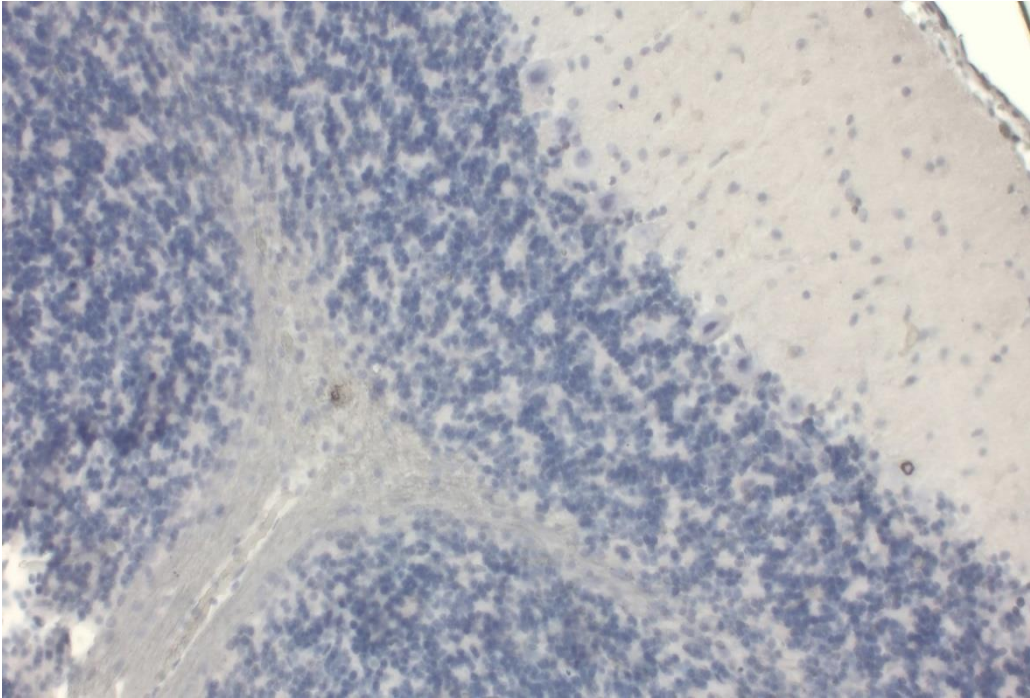
Beyincik dokusunun gangliyoner tabakasındaki purkinje hücrelerinde orta şiddette PNX-14 immünoreaktivitesi gözlenirken (Şekil 3.4), NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesinin yoğun şiddette olduğu belirlendi (Şekil 3.5). Negatif kontrol dokusunda ise herhangi bir immünoreaktivite gözlenmedi (Şekil 3.6).



Şekil 3.4. Beyincik dokusunda PNX-14 immünoreaktivitesi (oklar) (Mayer hematomksilen, Büyütme: X20 μ m)

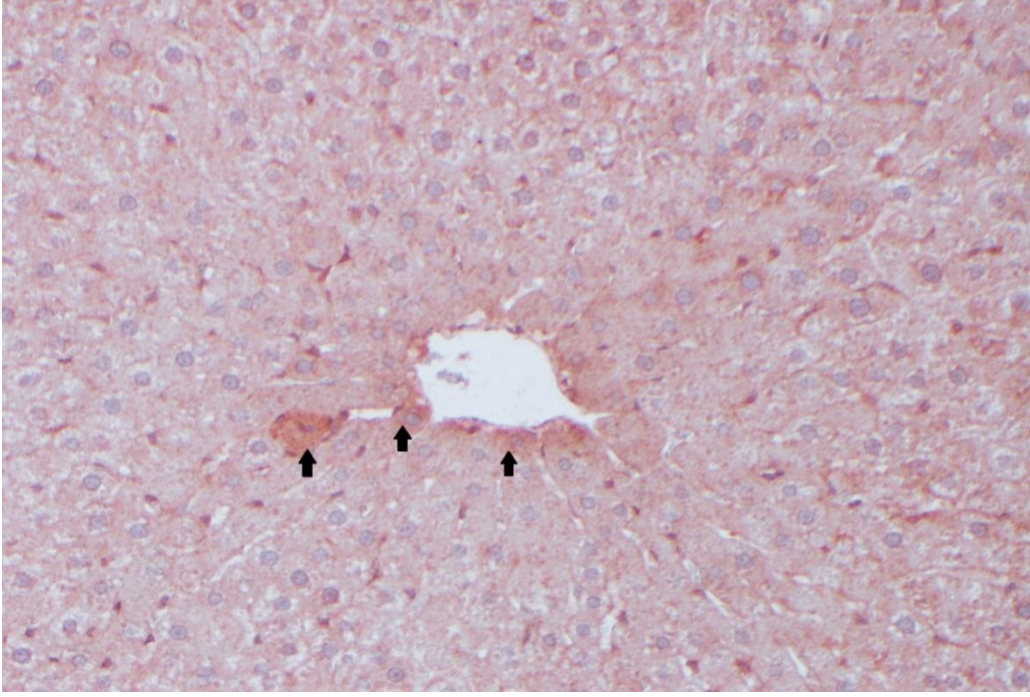


Şekil 3.5. Beyincik dokusunda NUCB2/nesfatin-1 immünoaktivitesi (oklar) (Mayer hematoxilen, Büyütme: X20 μ m)

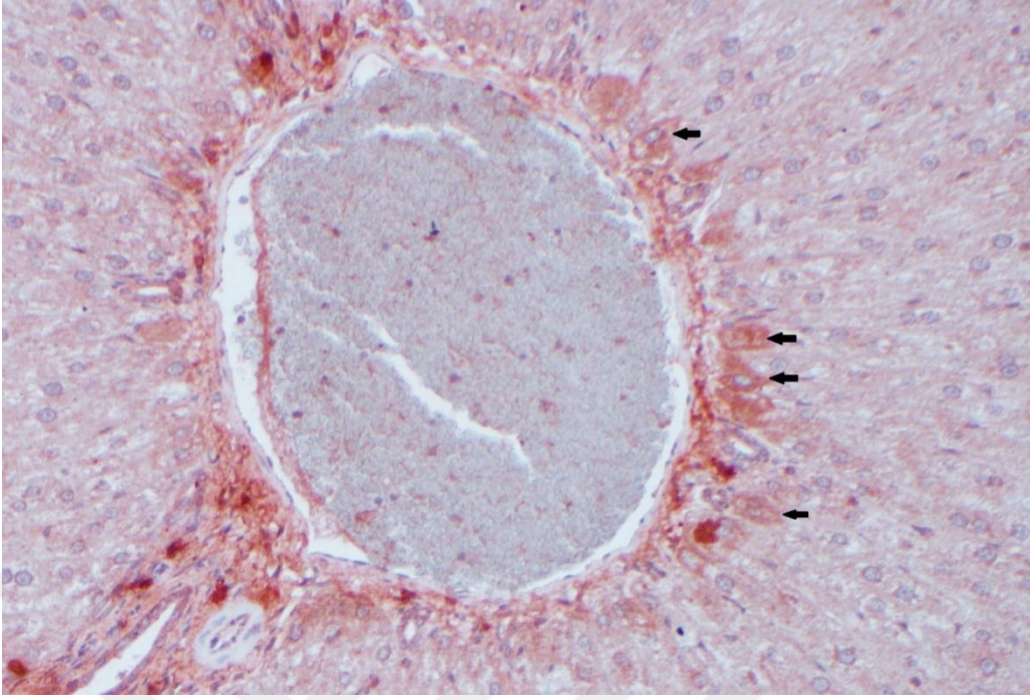


Şekil 3.6. Negatif kontrol dokusu (Mayer hematoxilen, Büyütme: X20 μ m)

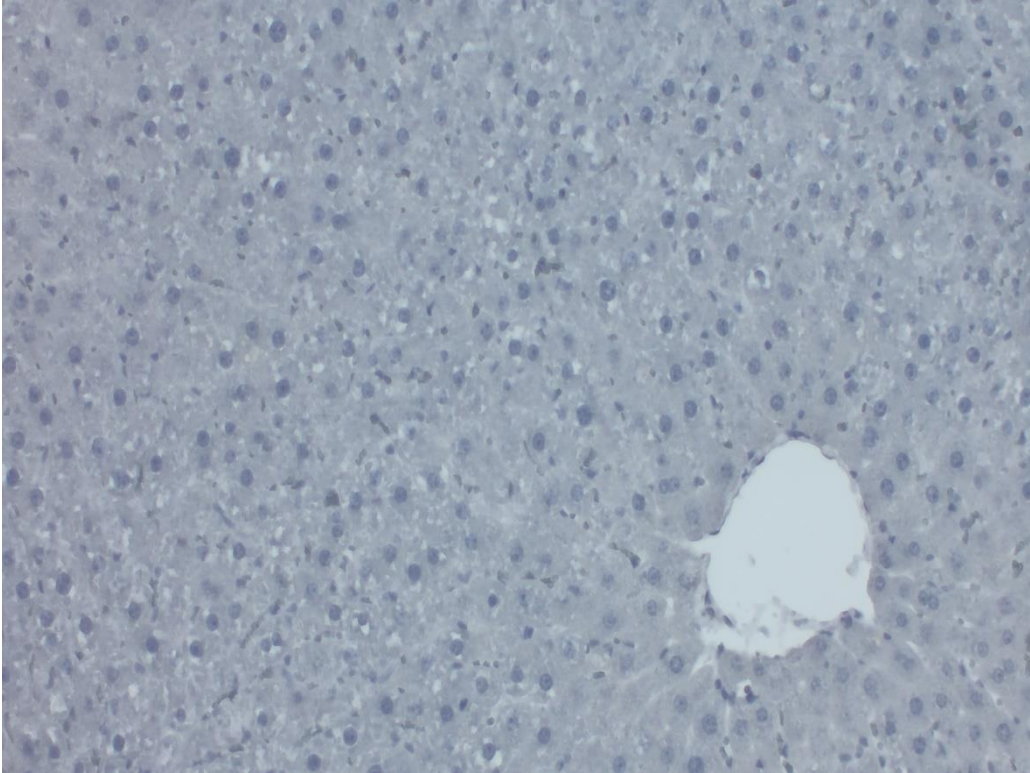
Karaciğer dokusunda hepatositlerde hafif şiddette PNX-14 immünoreaktivitesi gözlenirken (Şekil 3.7), NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesinin orta şiddette olduğu belirlendi (Şekil 3.8). Negatif kontrol dokusunda ise herhangi bir immünoreaktivite gözlenmedi (Şekil 3.9).



Şekil 3.7. Karaciğer dokusunda PNX-14 immünoreaktivitesi (oklar) (Mayer hematoksilin, Büyütme: X20 μ m)

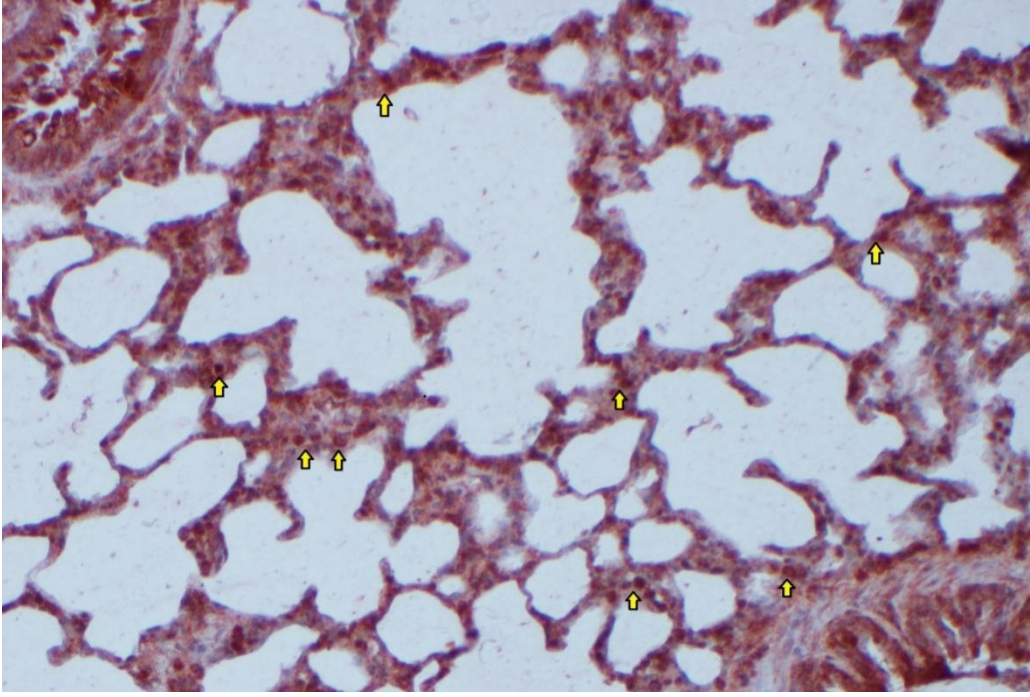


Şekil 3.8. Karaciğer dokusunda NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi (oklar) (Mayer hematoxylin, Büyütme: X20 μ m)

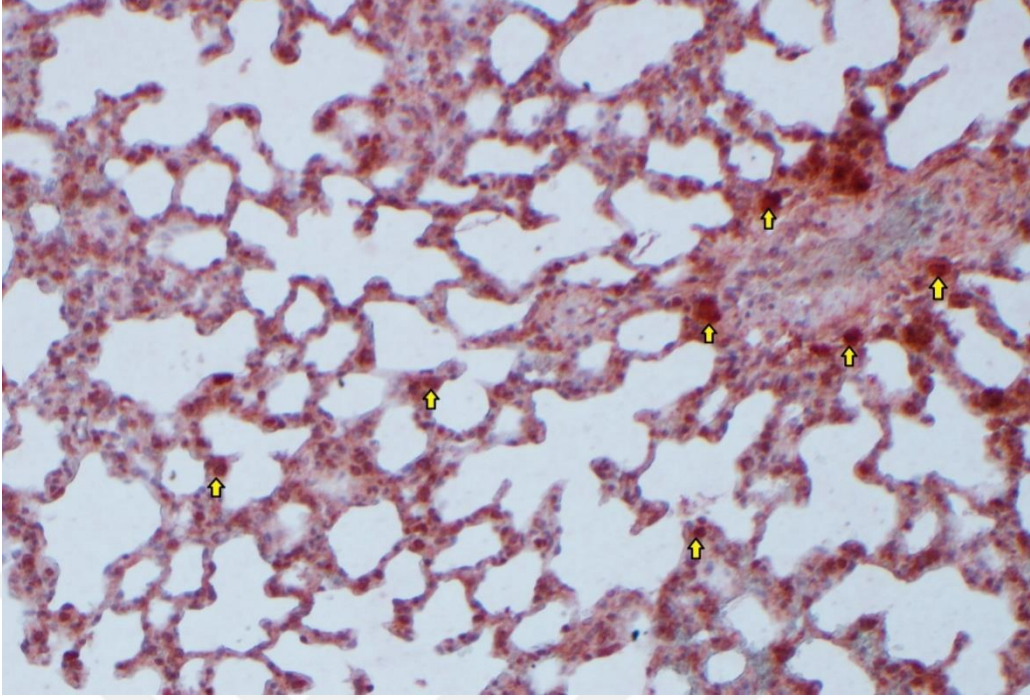


Şekil 3.9. Negatif kontrol dokusu (Mayer hematoxylin, Büyütme: X20 μ m)

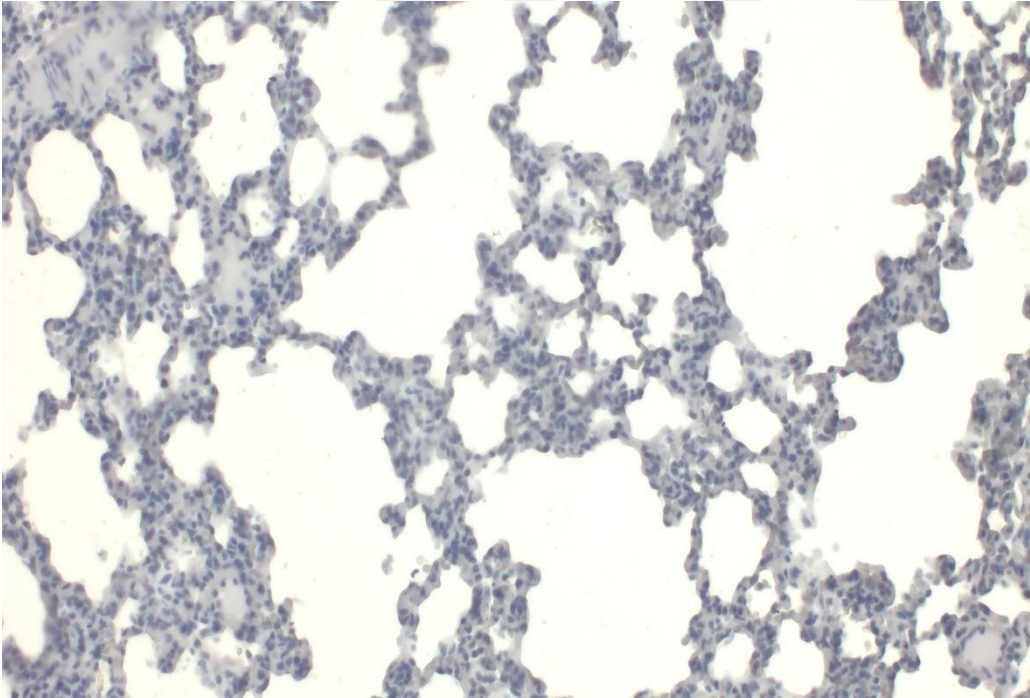
Akciğer dokusunda tip 2 pnömositlerde orta şiddette PNX-14 immünoreaktivitesi gözlenirken (Şekil 3.10), NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesinin yoğun şiddette olduğu belirlendi (Şekil 3.11). Negatif kontrol dokusunda ise herhangi bir immünoreaktivite gözlenmedi (Şekil 3.12).



Şekil 3.10. Akciğer dokusunda PNX-14 immünoreaktivitesi (oklar) (Mayer hematoksilen, Büyütme: X20 μ m)

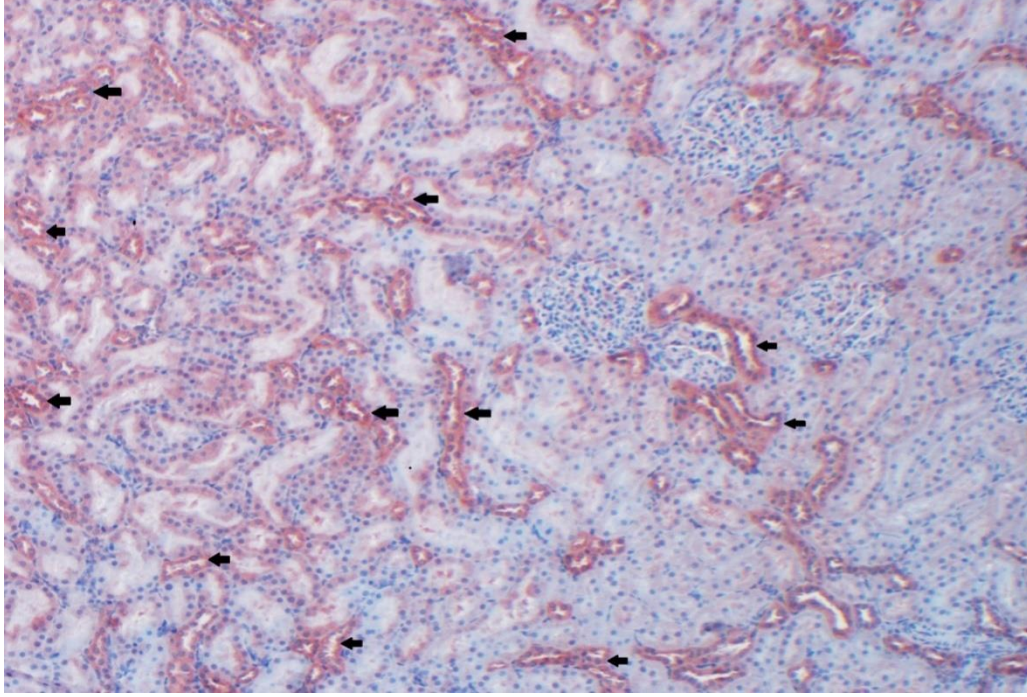


Şekil 3.11. Akciğer dokusunda NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi (oklar) (Mayer hematoksilen, Büyütme: X20 μ m)

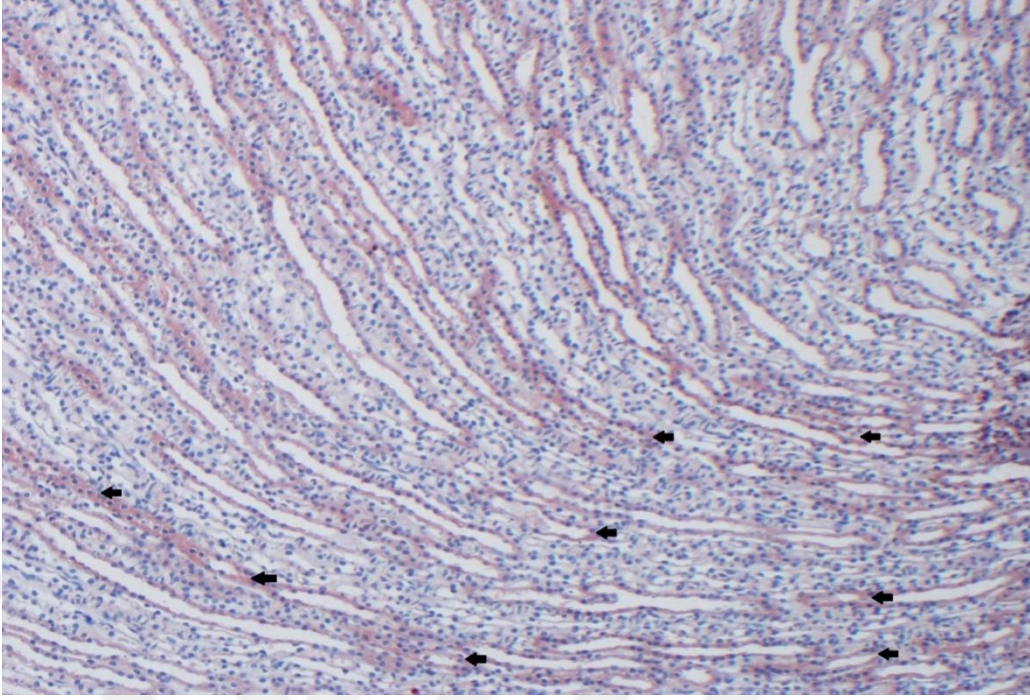


Şekil 3.12. Negatif kontrol dokusu (Mayer hematoksilen, Büyütme: X20 μ m)

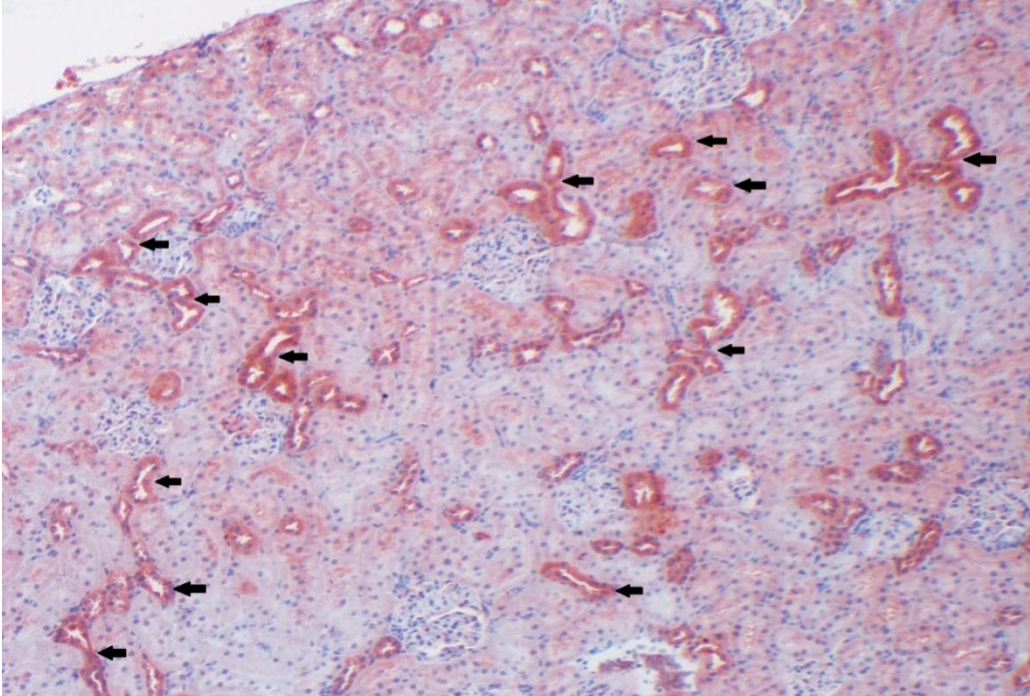
Böbrek dokusunun korteks bölgesindeki proksimal tubullerde (Şekil 3.13) ve medulla bölgesindeki toplayıcı tubullerde orta şiddette PNX-14 immünoreaktivitesi gözlenirken (Şekil 3.14), NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesinin böbrek dokusunun her iki bölgesinde de yoğun şiddette olduğu belirlendi (Şekil 3.15-3.16). Negatif kontrol dokusunda ise herhangi bir immünoreaktivite gözlenmedi (Şekil 3.17-3.18).



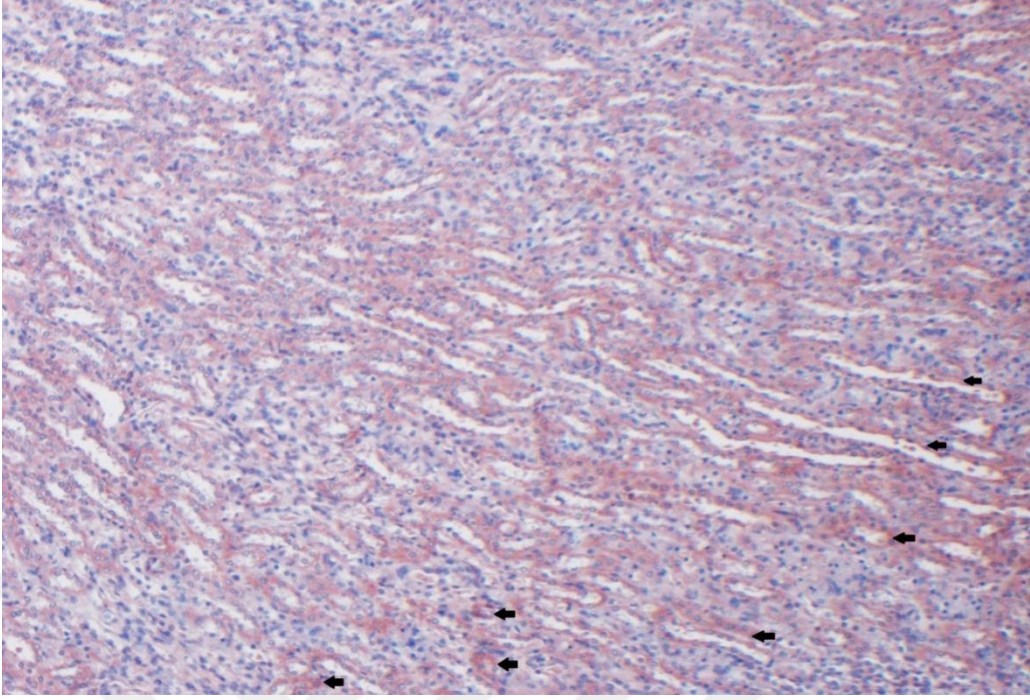
Şekil 3.13. Böbrek dokusunun korteks bölgesinde PNX-14 immünoreaktivitesi (oklar)
(Mayer hematoksilen, Büyütme: X10 μ m)



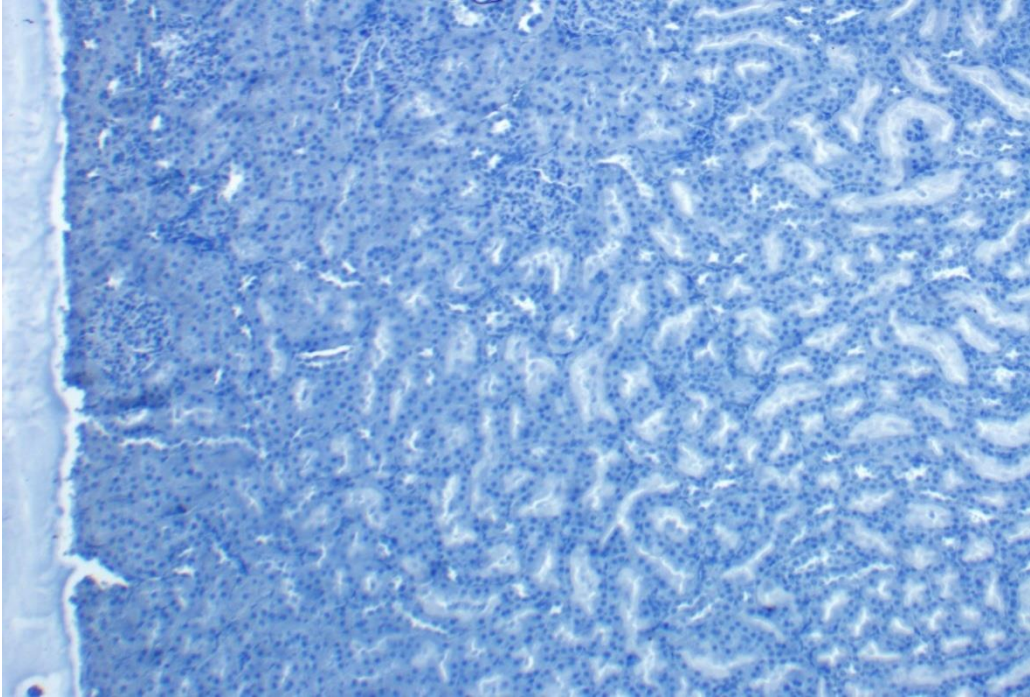
Şekil 3.14. Böbrek dokusunun medulla bölgesinde PNX-14 immünoreaktivitesi (oklar)
(Mayer hematoksilin, Büyütme: X10 μ m)



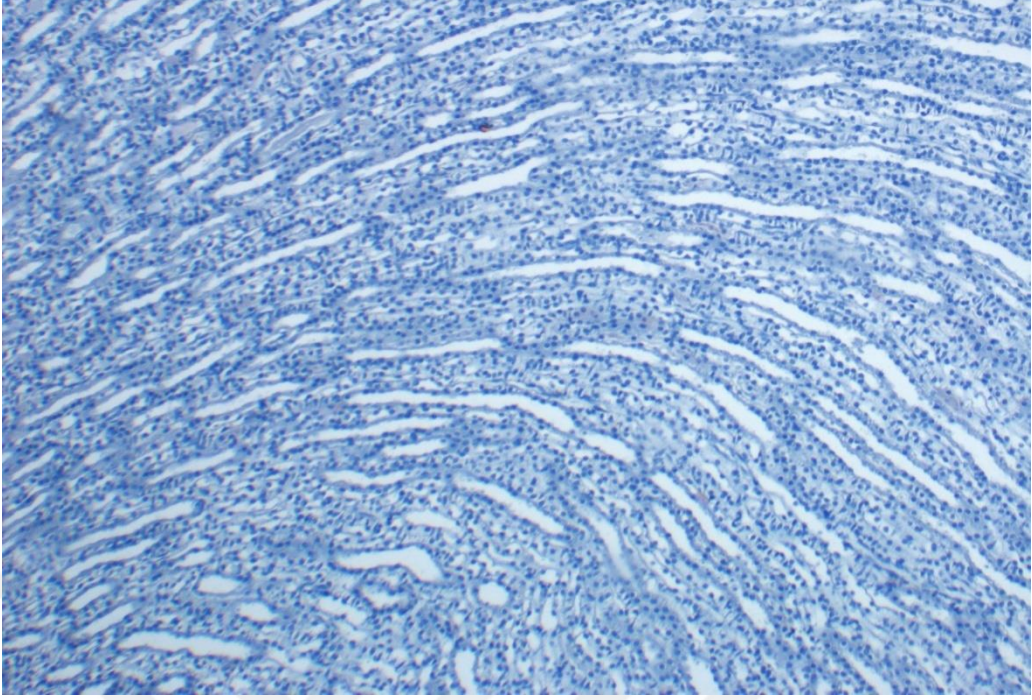
Şekil 3.15. Böbrek dokusunun korteks bölgesinde NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi
(oklar) (Mayer hematoksilin, Büyütme: X10 μ m)



Şekil 3.16. Böbrek dokusunun medulla bölgesinde NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi (oklar) (Mayer hematomksilen, Büyütme: X10 μ m)

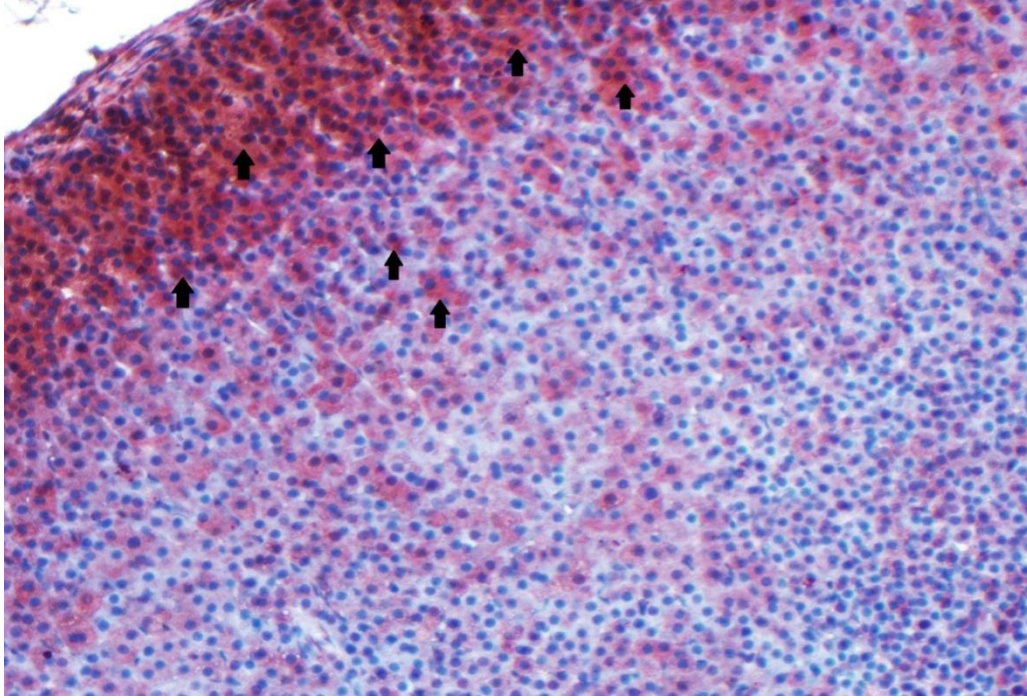


Şekil 3.17. Negatif kontrol dokusu (korteks) (Mayer hematomksilen, Büyütme: X10 μ m)

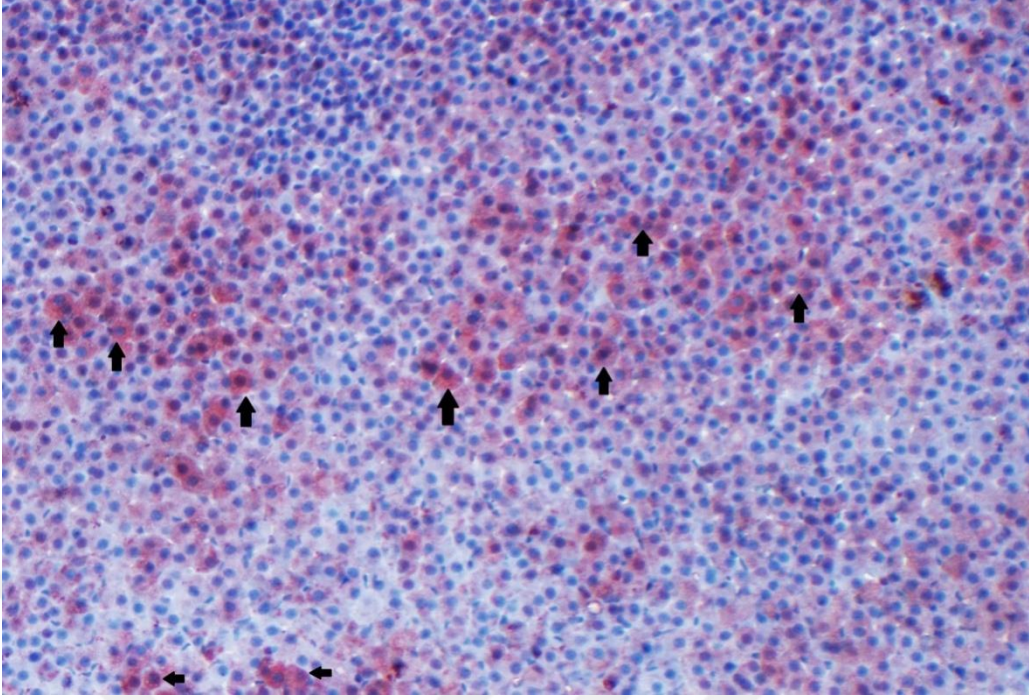


Şekil 3.18. Negatif kontrol dokusu (medulla) (Mayer hematoksislen, Büyütme: X10 μ m)

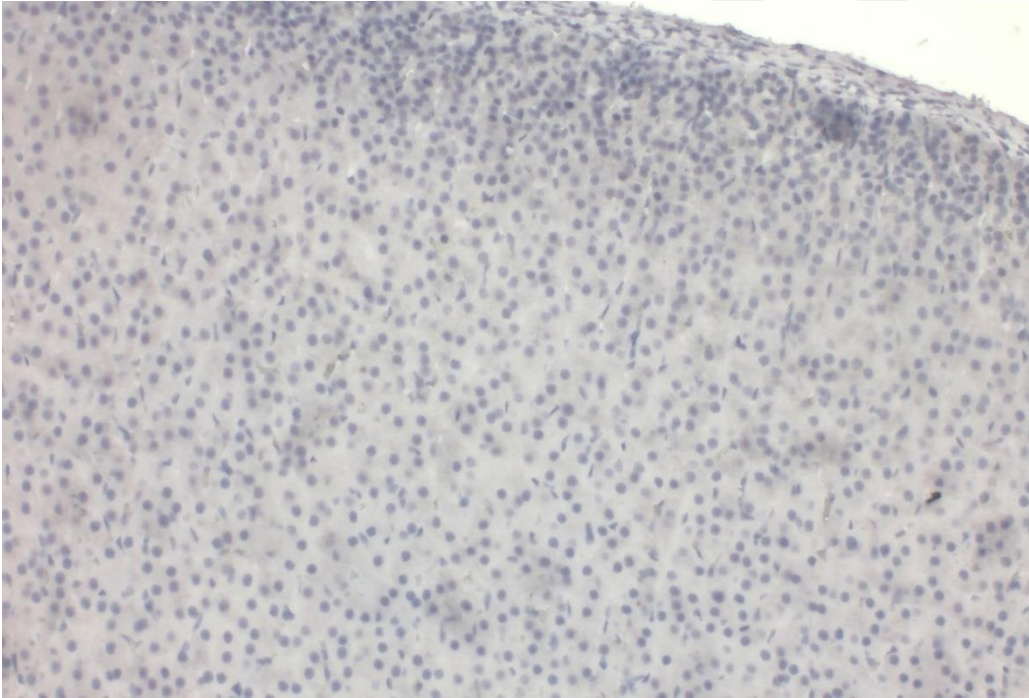
Böbrek üstü bezi dokusunun glomeruler ve fasiküler katmanlarındaki hücrelerde yoğun şiddette PNX-14 immünoreaktivitesi gözlenirken (Şekil 3.19), NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesinin fasiküler katmandaki hücrelerde orta şiddette olduğu belirlendi (Şekil 3.20). Negatif kontrol dokusunda ise herhangi bir immünoreaktivite gözlenmedi (Şekil 3.21).



Şekil 3.19. Böbrek üstü bezinde PNX-14 immünoreaktivitesi (oklar) (Mayer hematoksilin, Büyütme: X20 µm)

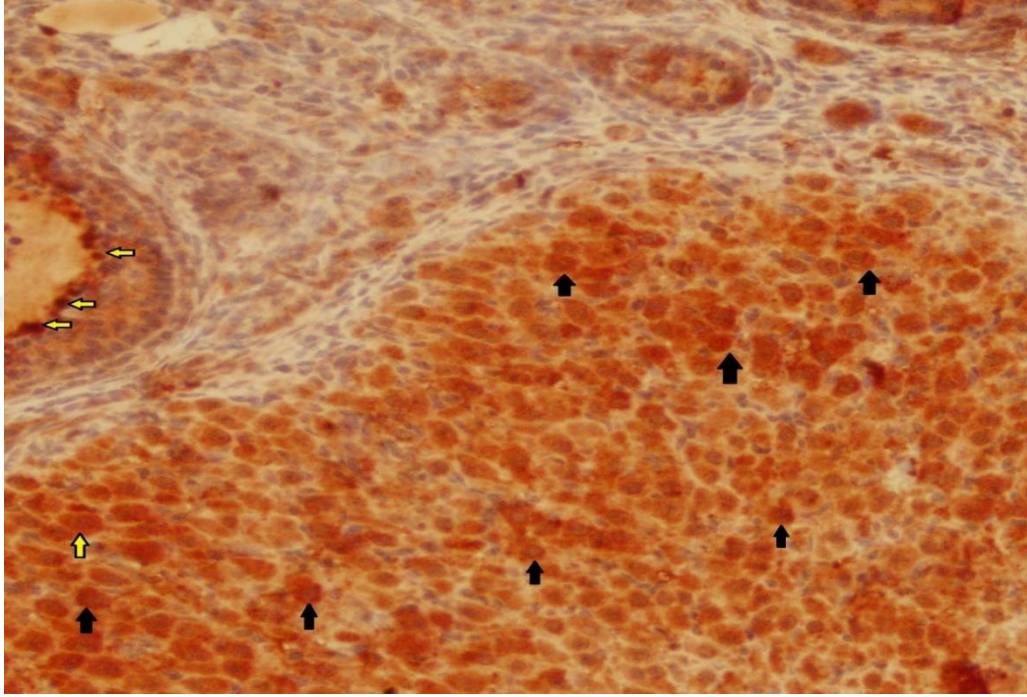


Şekil 3.20. Böbrek üstü bezinde NUCB2/nesfatin-1 immünoaktivitesi (oklar) (Mayer hematoksilen, Büyütme: X20 μ m)

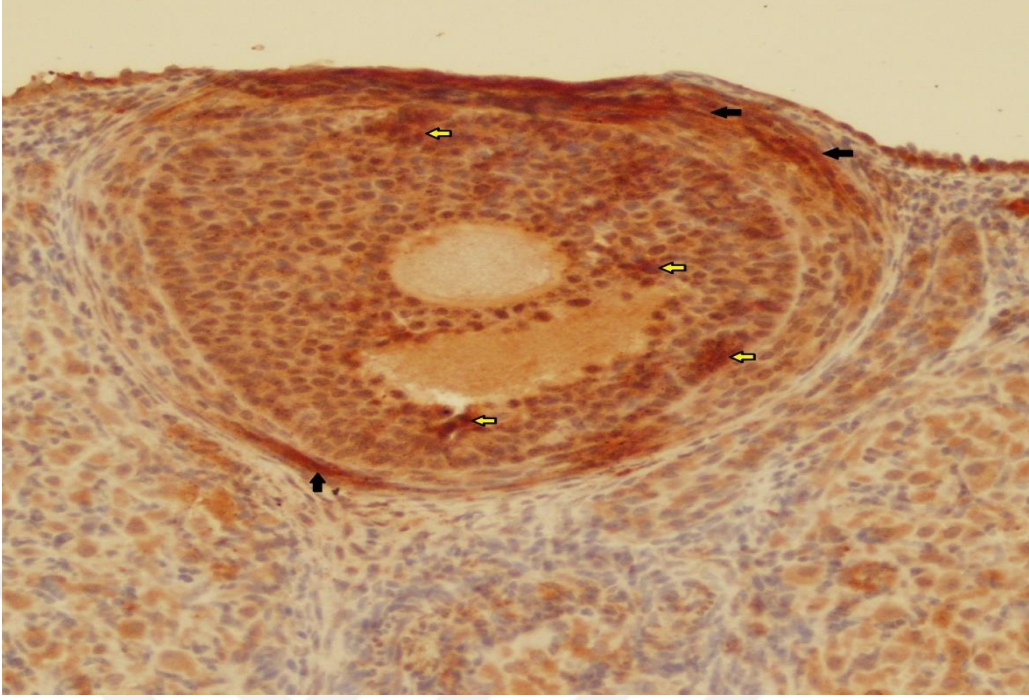


Şekil 3.21. Negatif kontrol dokusu (Mayer hematoksilen, Büyütme: X20 μ m)

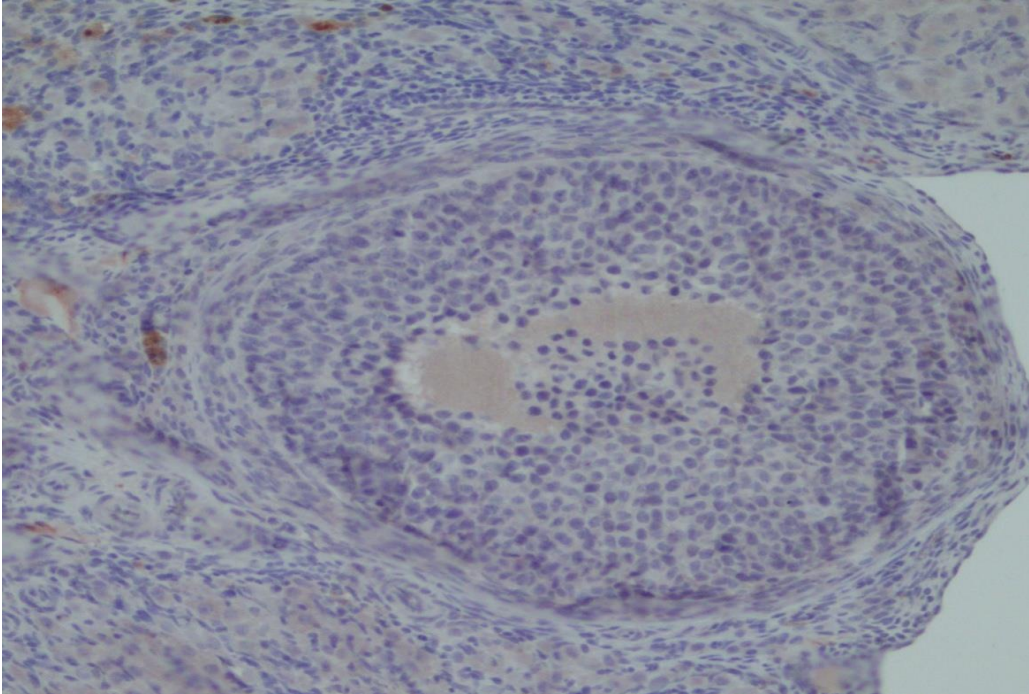
Ovaryum dokusunda luteal ve granuloza hücrelerinde yoğun şiddette PNX-14 immünoaktivitesi gözlenirken (Şekil 3.22), NUCB2/nesfatin-1 immünoaktivitesinin teka ve granuloza hücrelerinde orta şiddette olduğu belirlendi (Şekil 3.23). Negatif kontrol dokusunda ise herhangi bir immünoaktivite gözlenmedi (Şekil 3.24).



Şekil 3.22. Ovaryum dokusunda luteal (siyah ok) ve granuloza (sarı ok) hücrelerinde PNX-14 immünoaktivitesi (Mayer hematoksislen, Büyütme: X20 μ m)

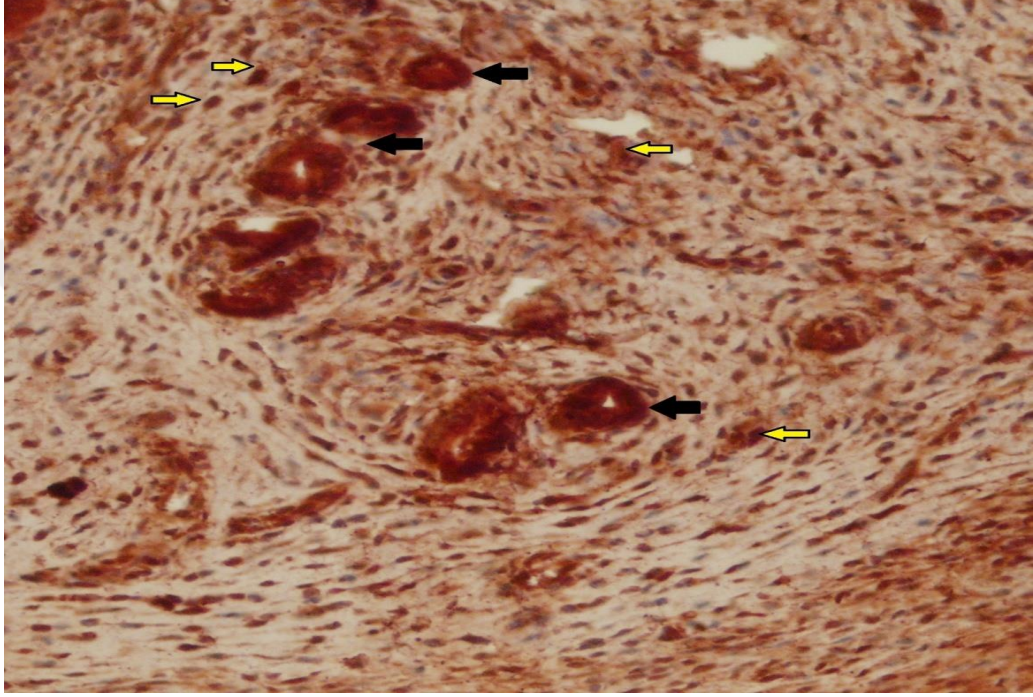


Şekil 3.23. Ovaryum dokusunda teka (siyah ok) ve granuloza (sarı ok) hücrelerinde NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi (Mayer hematoksislen, Büyütme: X20 μ m)

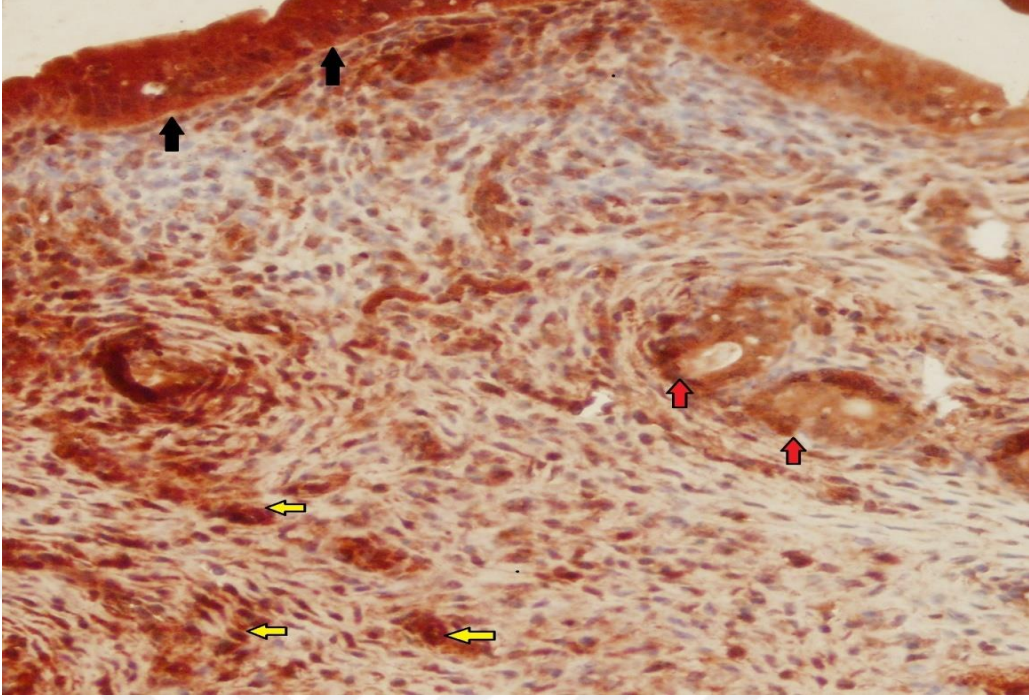


Şekil 3.24. Negatif kontrol dokusu (Mayer hematoksislen, Büyütme: X20 μ m)

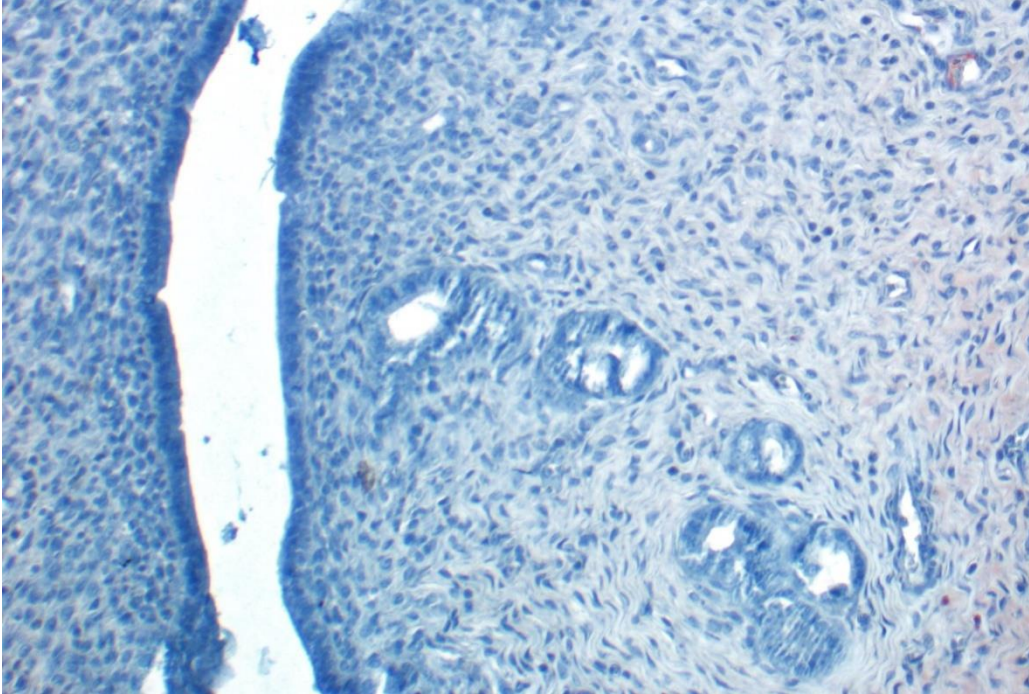
Uterus dokusunda glanduler epitel (siyah ok) ve stromal (sarı ok) hücrelerde yoğun şiddette PNX-14 immünoreaktivitesi gözlenirken (Şekil 3.25), NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesinin endometriyal epitelyal (siyah ok) hücrelerde yoğun, glanduler epitel (kırmızı ok) ve stromal (sarı ok) hücrelerde ise orta şiddette olduğu belirlendi (Şekil 3.26). Negatif kontrol dokusunda ise herhangi bir immünoreaktivite gözlenmedi (Şekil 3.27).



Şekil 3.25. Uterus dokusunda glanduler epitel (siyah ok) ve stromal (sarı ok) hücrelerde PNX-14 immünoreaktivitesi (Mayer hematomksilen, Büyütme: X20 µm)



Şekil 3.26. Uterus dokusunda endometriyal epitelyal (siyah ok), stromal (sarı ok) ve glanduler epitel (kırmızı ok) hücrelerinde NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi (Mayer hematoksisilen, Büyütme: X20 μ m)

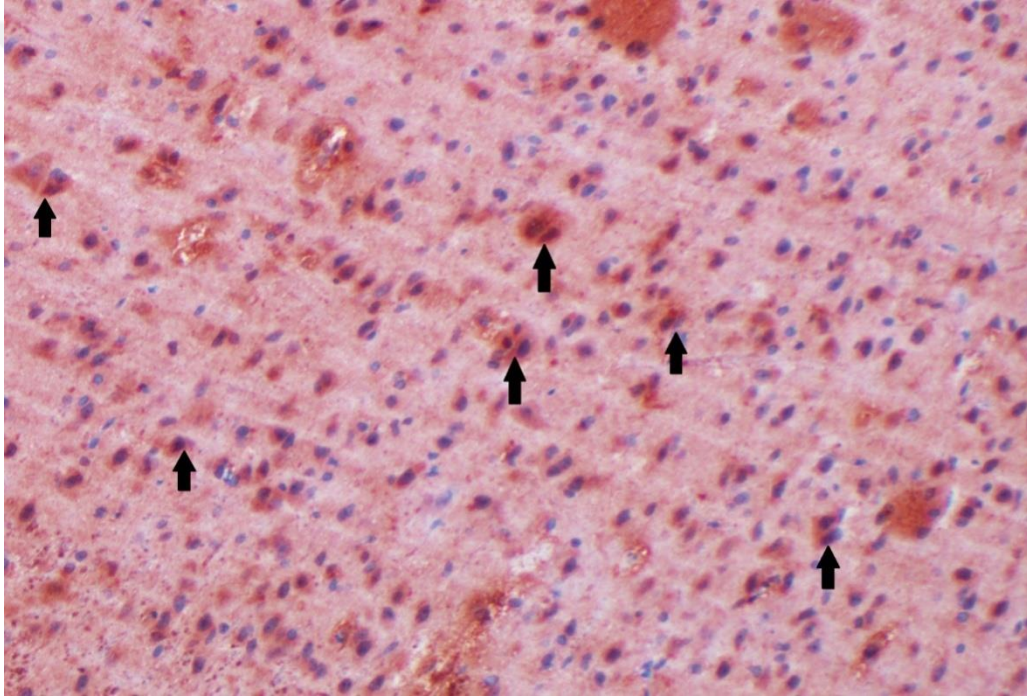


Şekil 3.27. Negatif kontrol dokusu (Mayer hematoksisilen, Büyütme: X20 μ m)

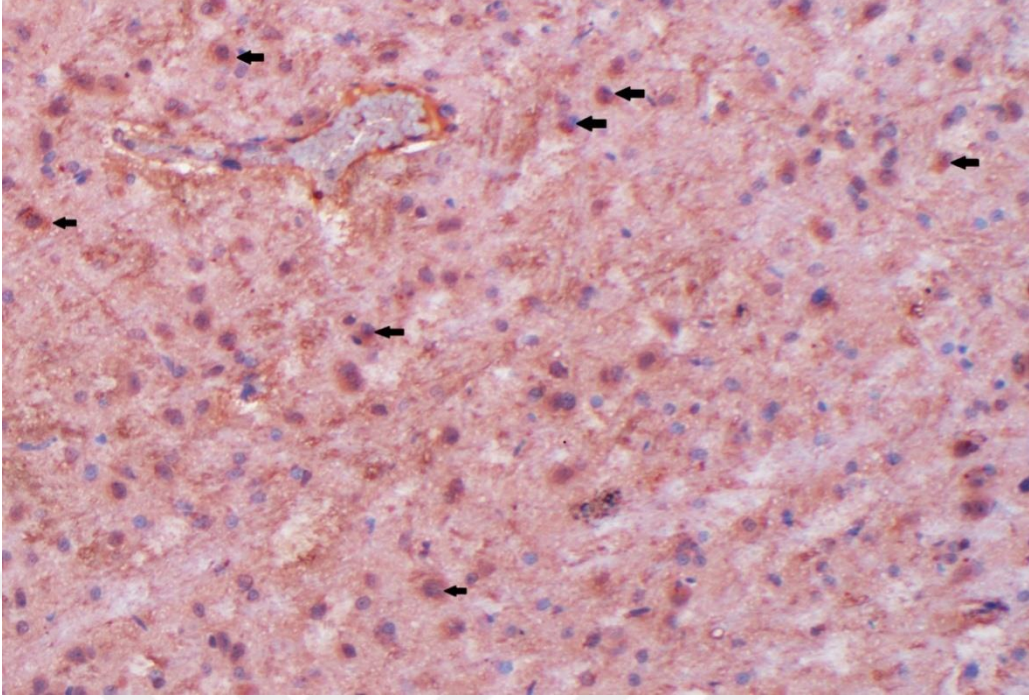
3.1.2. Erkek sıçanların dokularındaki immünohistokimyasal bulgular

Işık mikroskobu altında yapılan inceleme sonucunda, erkek sıçanların beyin, beyincik, karaciğer, akciğer, böbrek, böbrek üstü bezi ve testis dokularında PNX-14 ve NUCB2/nesfatin-1 immünoaktiviteleri belirlendi.

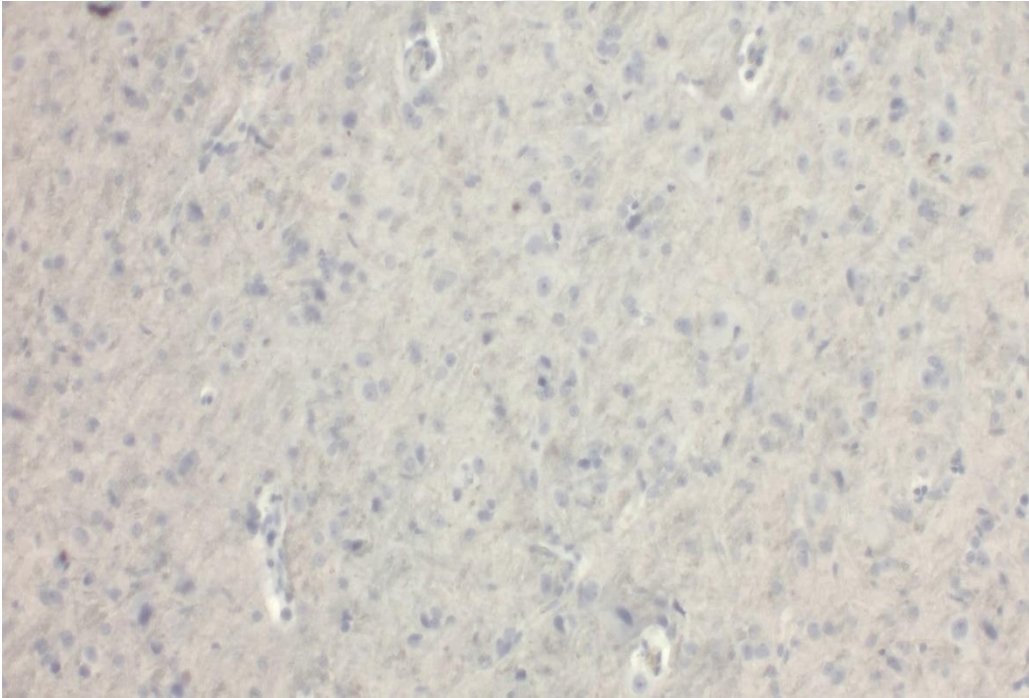
Beyin dokusunun moleküler katmanındaki nöronlarda yoğun şiddette PNX-14 immünoaktivitesi gözlenirken (Şekil 3.28), NUCB2/nesfatin-1 immünoaktivitesinin orta şiddette olduğu belirlendi (Şekil 3.29). Negatif kontrol dokusunda ise herhangi bir immünoaktivite gözlenmedi (Şekil 3.30).



Şekil 3.28. Beyin dokusunda PNX-14 immünoaktivitesi (oklar) (Mayer hematomaksilen, Büyütme: Büyütme: X20 μ m)

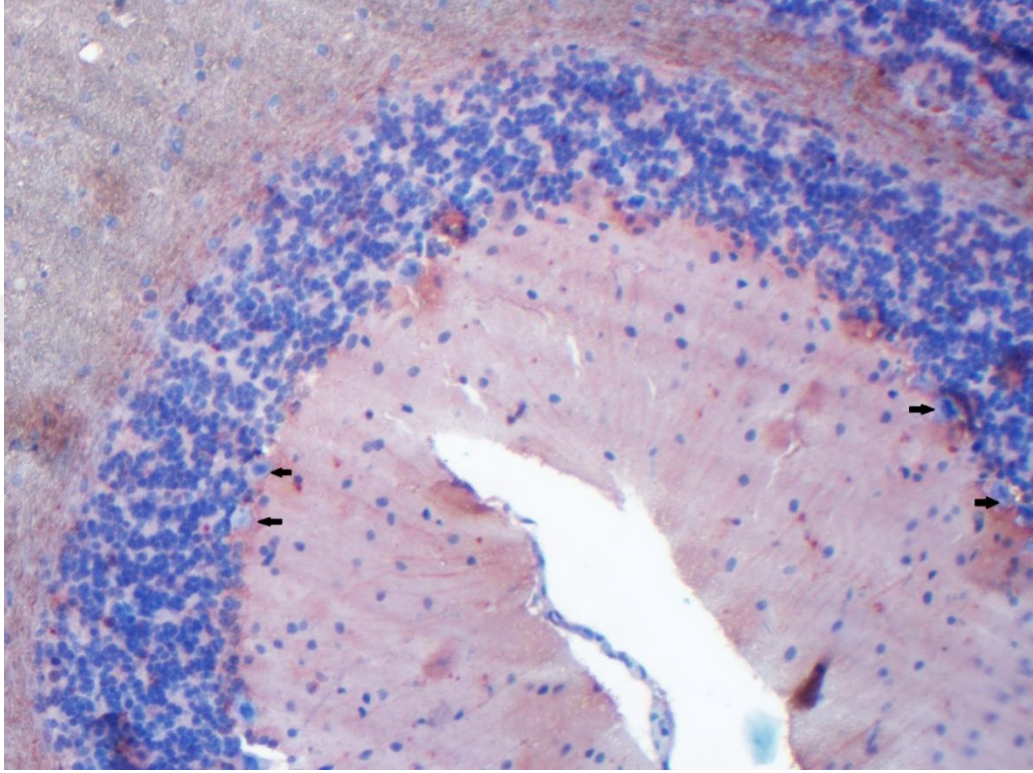


Şekil 3.29. Beyin dokusunda NUCB2/nesfatin-1 immünoaktivitesi (oklar) (Mayer hematoksilen, Büyütme: X20 μ m)

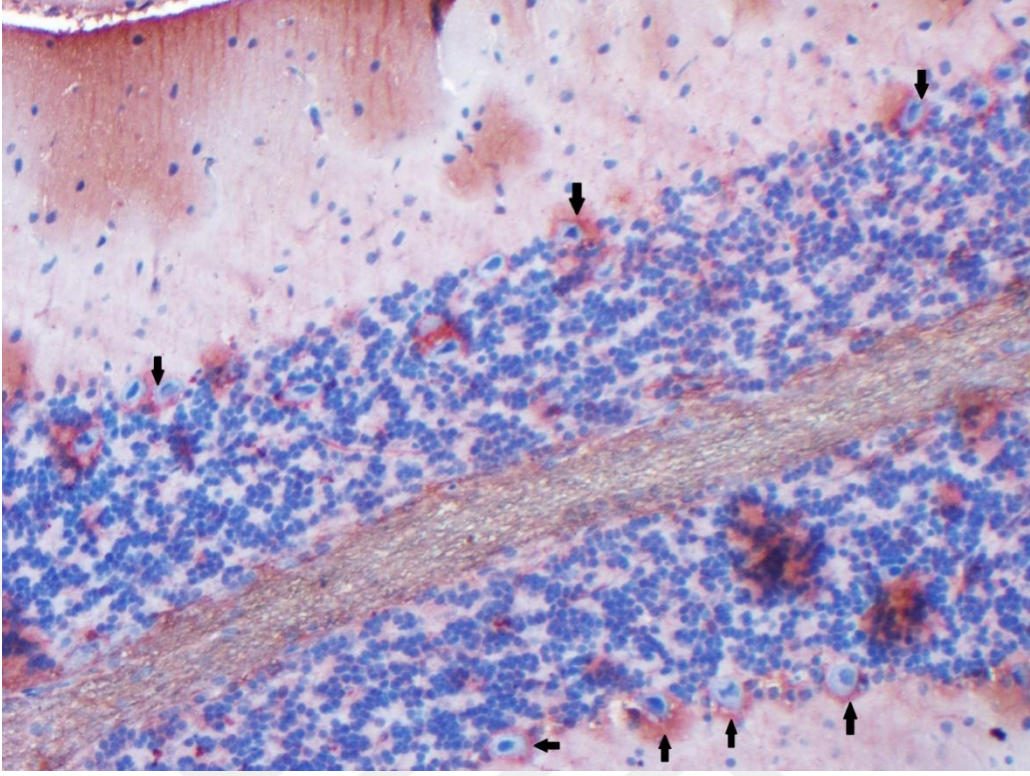


Şekil 3.30. Negatif kontrol dokusu (Mayer hematoksilen, Büyütme: X20 μ m)

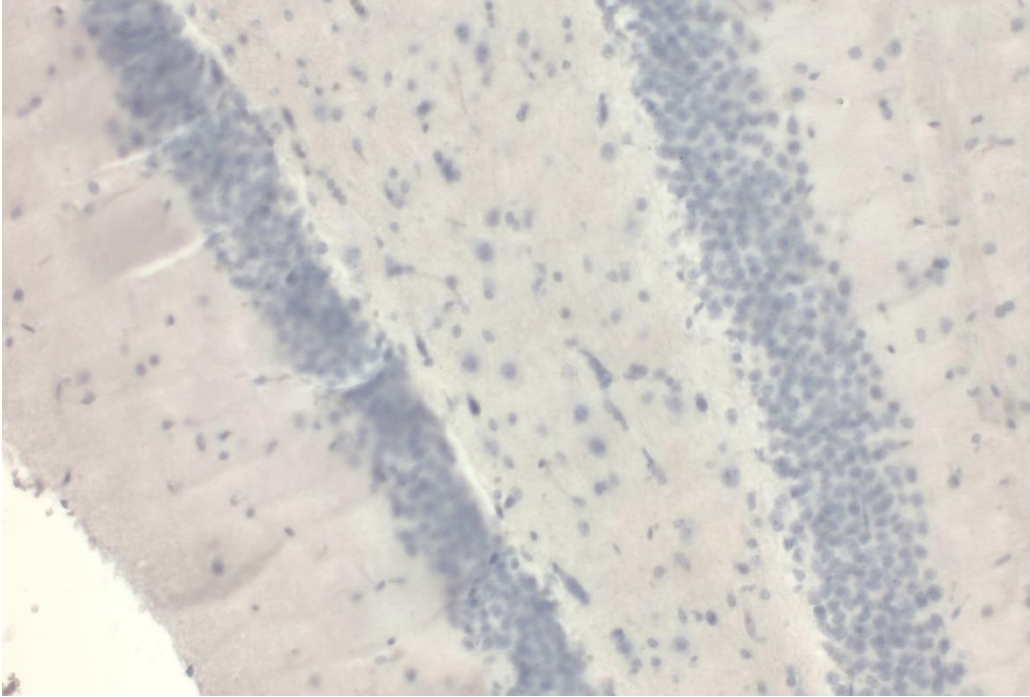
Beyincik dokusunun gangliyoner katmanındaki purkinje hücrelerinde hafif şiddette PNX-14 immünoreaktivitesi gözlenirken (Şekil 3.31), NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesinin orta şiddette olduğu belirlendi (Şekil 3.32). Negatif kontrol dokusunda ise herhangi bir immünoreaktivite gözlenmedi (Şekil 3.33).



Şekil 3.31. Beyincik dokusunda PNX-14 immünoreaktivitesi (oklar) (Mayer hematomaksilen, Büyütme: X20 μ m)

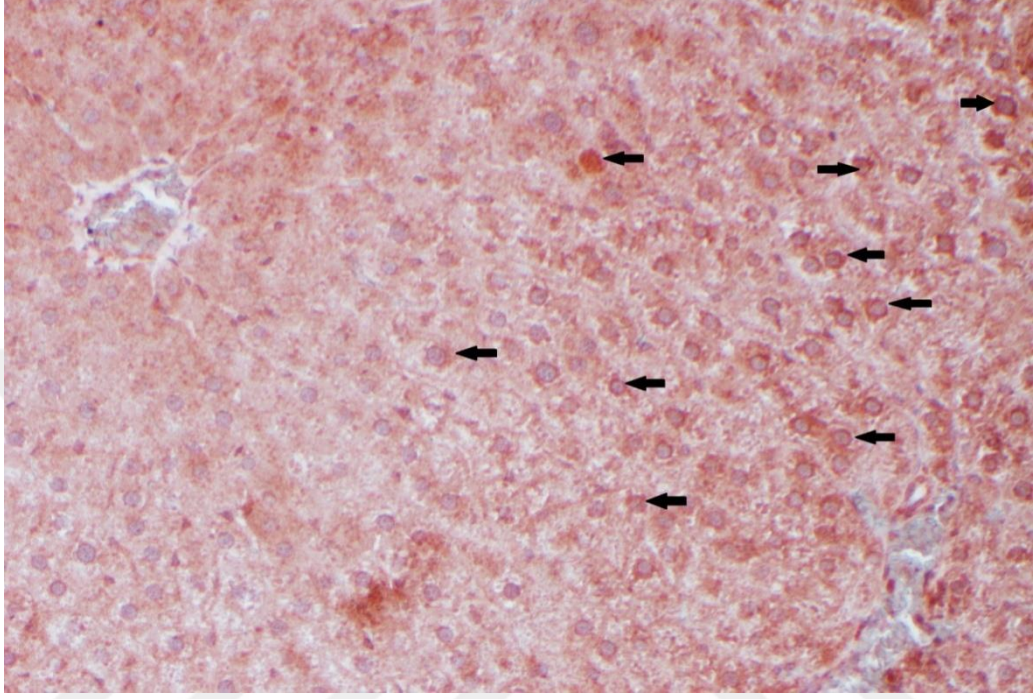


Şekil 3.32. Beyincik dokusunda NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi (oklar) (Mayer hematoksilen, Büyütme: X20  m)

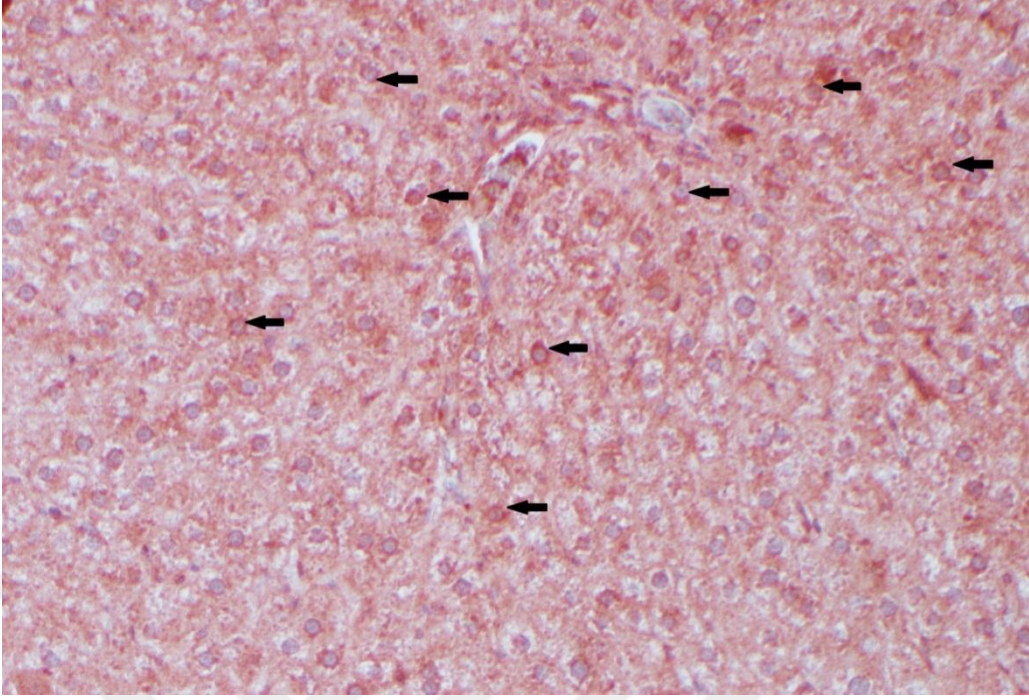


Şekil 3.33. Negatif kontrol dokusu (Mayer hematoksilen, Büyütme: X20  m)

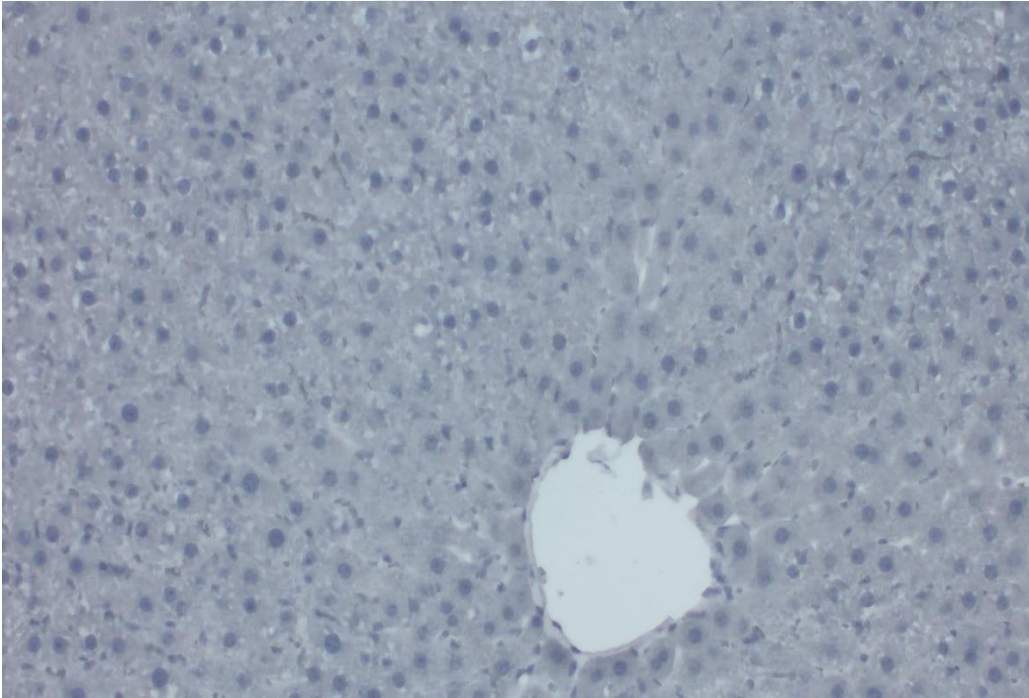
Karaciğer dokusunda hepatositlerde hem PNX-14 (Şekil 3.34) hem de NUCB2/nesfatin-1 (Şekil 3.35) immünoreaktivitesinin orta şiddette olduğu belirlendi. Negatif kontrol dokusunda ise herhangi bir immünoreaktivite gözlenmedi (Şekil 3.36).



Şekil 3.34. Karaciğer dokusunda PNX-14 immünoreaktivitesi (oklar) (Mayer hematoxilen, Büyütme: X20 μ m)

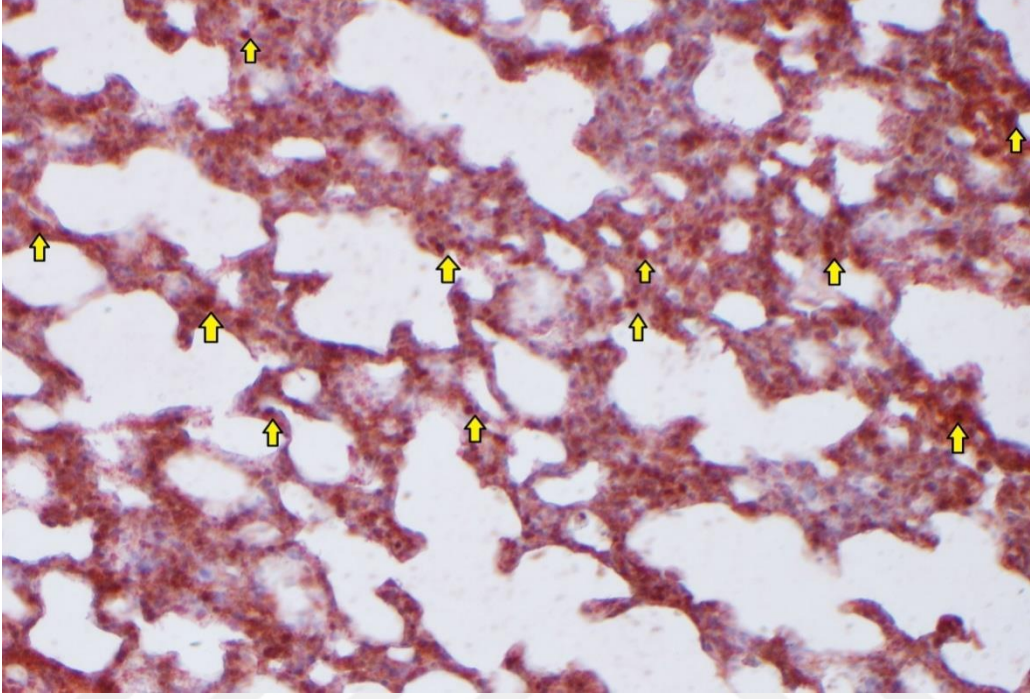


Şekil 3.35. Karaciğer dokusunda NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi (oklar) (Mayer hematoksilen, Büyütme: X20 μ m)

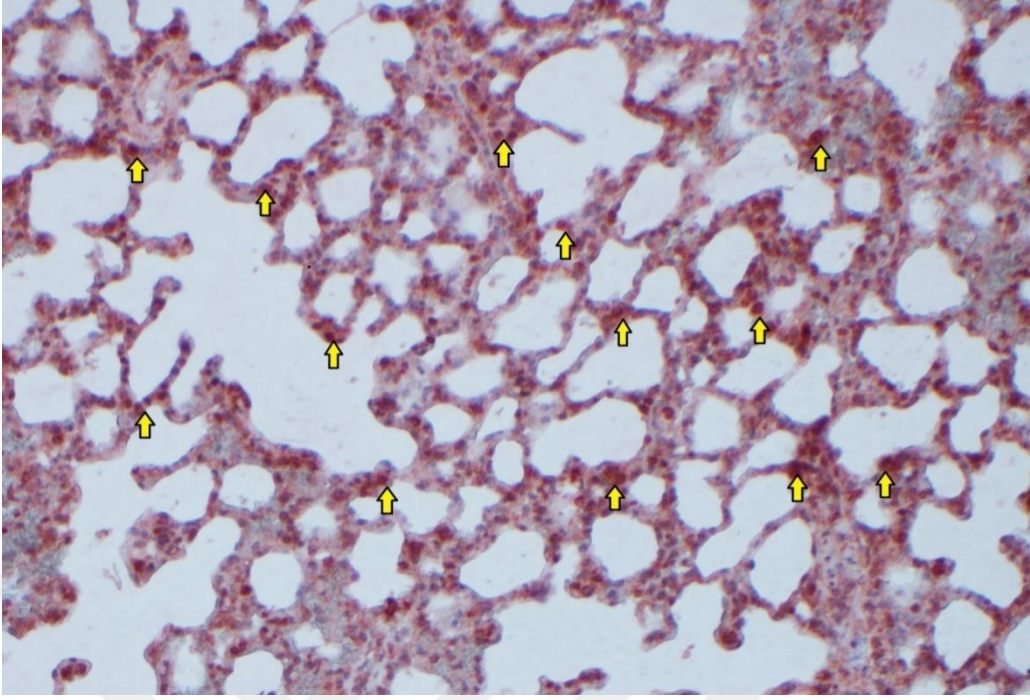


Şekil 3.36. Negatif kontrol dokusu (Mayer hematoksilen, Büyütme: X20 μ m)

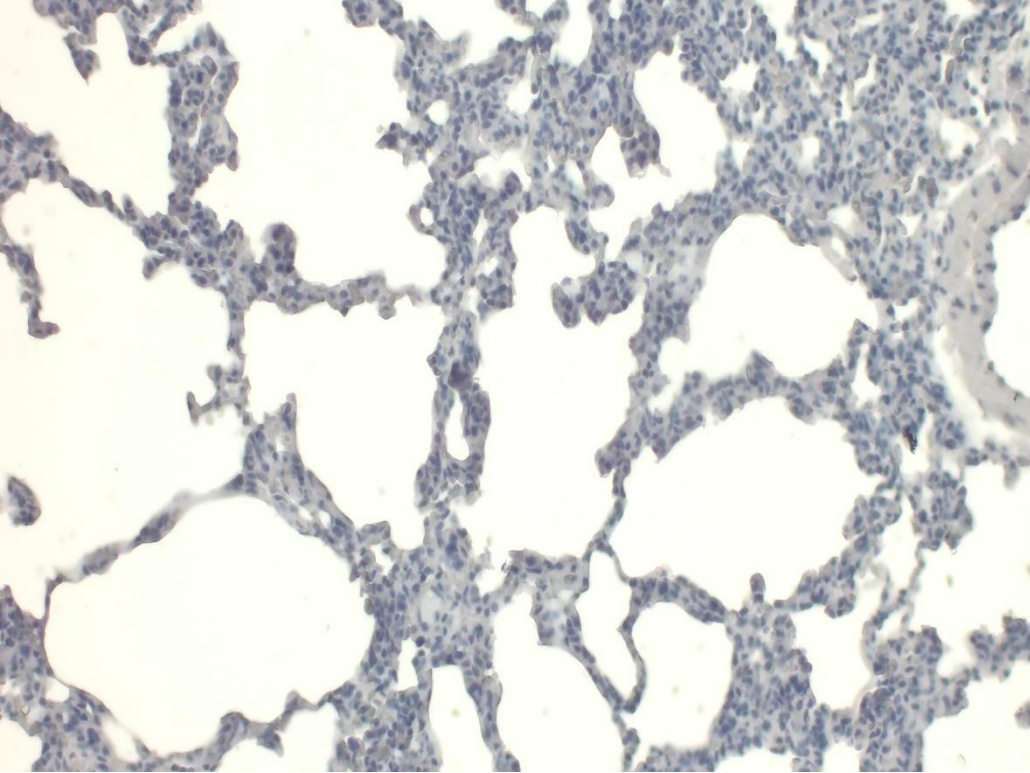
Akciğer dokusunda tip 2 pnömositlerde hem PNX-14 (Şekil 3.37) hem de NUCB2/nesfatin-1 (Şekil 3.38) immünoreaktivitesinin yoğun şiddette olduğu belirlendi. Negatif kontrol dokusunda ise herhangi bir immünoreaktivite gözlenmedi (Şekil 3.39).



Şekil 3.37. Akciğer dokusunda PNX-14 immünoreaktivitesi (oklar) (Mayer hematoksilen, Büyütme: X20 μ m)

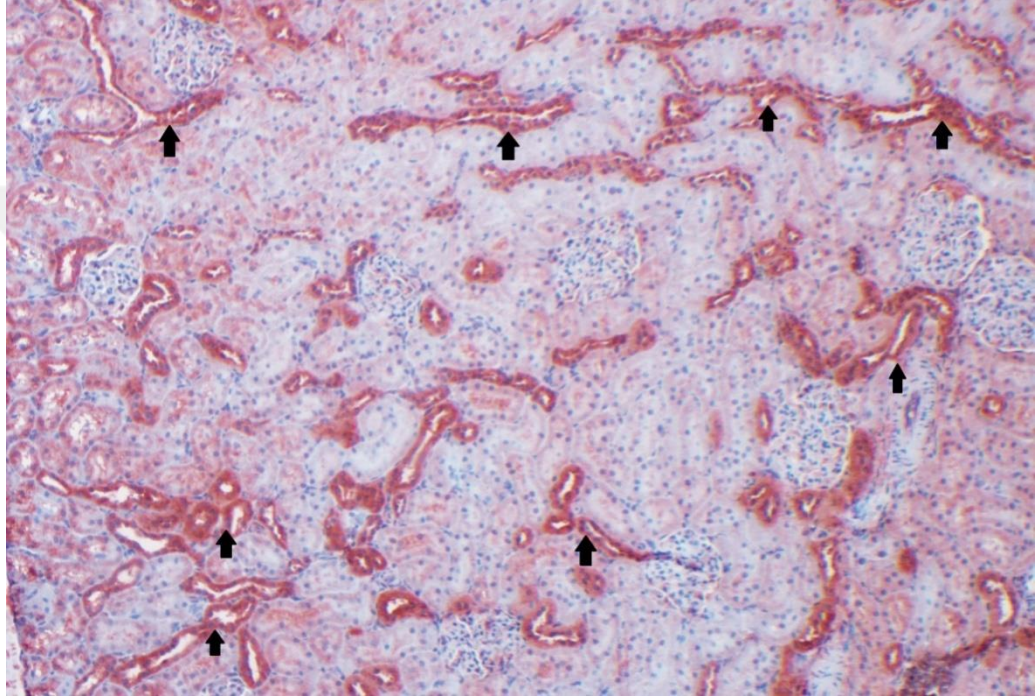


Şekil 3.38. Akciğer dokusunda NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi (oklar) (Mayer hematoksilen, Büyütme: X20 µm)

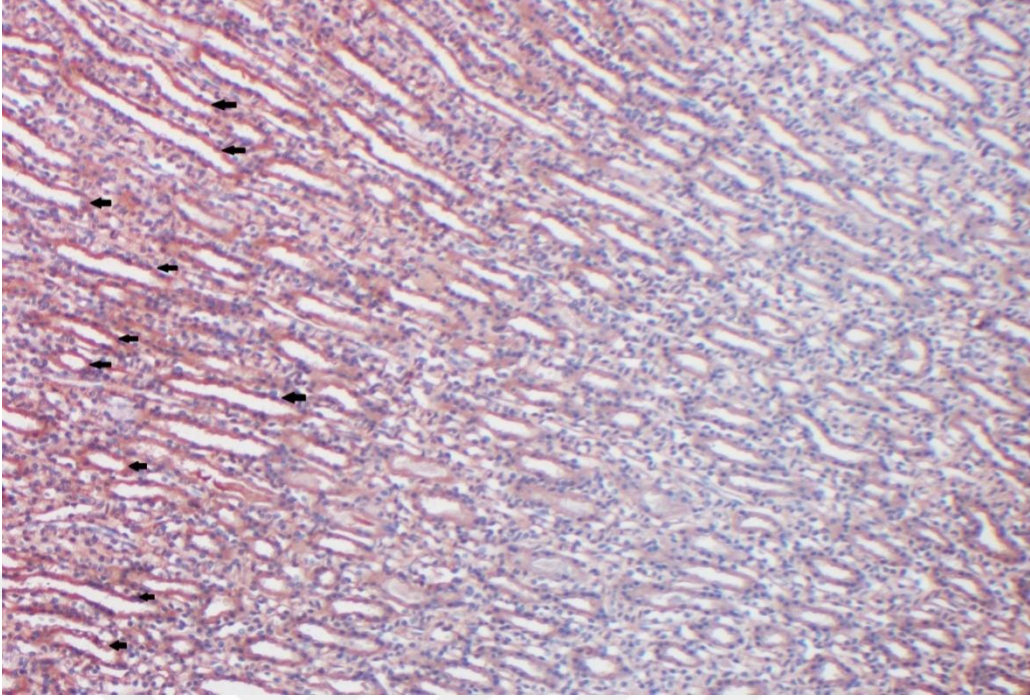


Şekil 3.39. Negatif kontrol dokusu (Mayer hematoksilen, Büyütme: X20 µm)

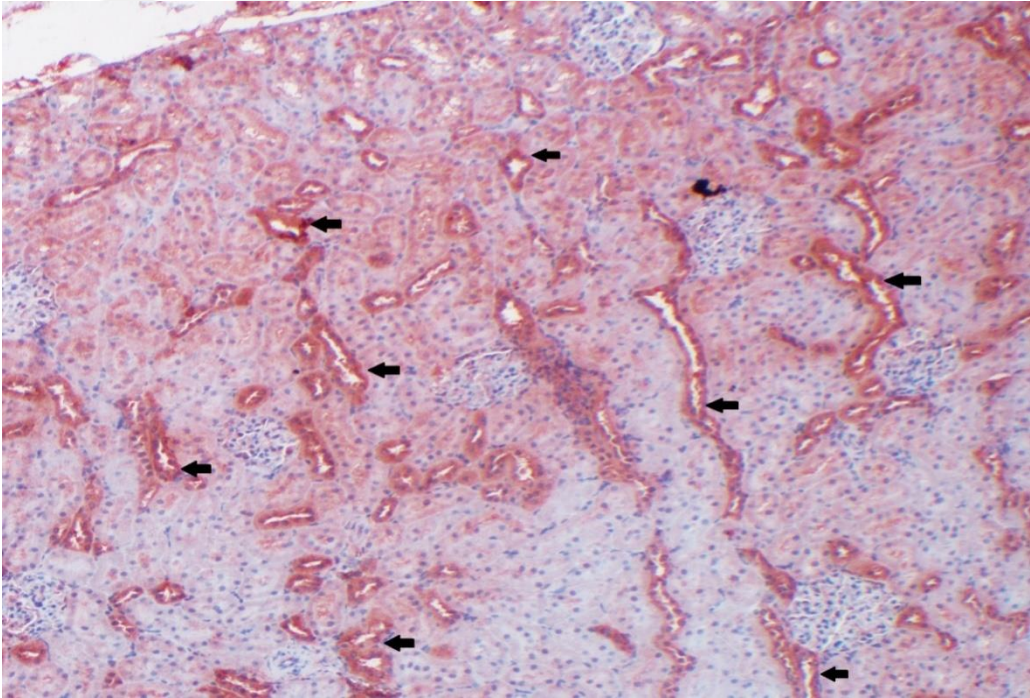
Böbrek dokusunun korteks bölgesindeki proksimal tubullerde (Şekil 3.40) ve medulla bölgesindeki toplayıcı tubullerde (Şekil 3.41) yoğun şiddette PNX-14 immünoreaktivitesi gözlenirken, NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesinin korteks bölgesindeki proksimal tubullerde yoğun şiddette (Şekil 3.42) ve medulla bölgesindeki toplayıcı tubullerde orta şiddette (Şekil 3.43) olduğu belirlendi. Negatif kontrol dokusunda ise herhangi bir immünoreaktivite gözlenmedi (Şekil 3.44.-3.45).



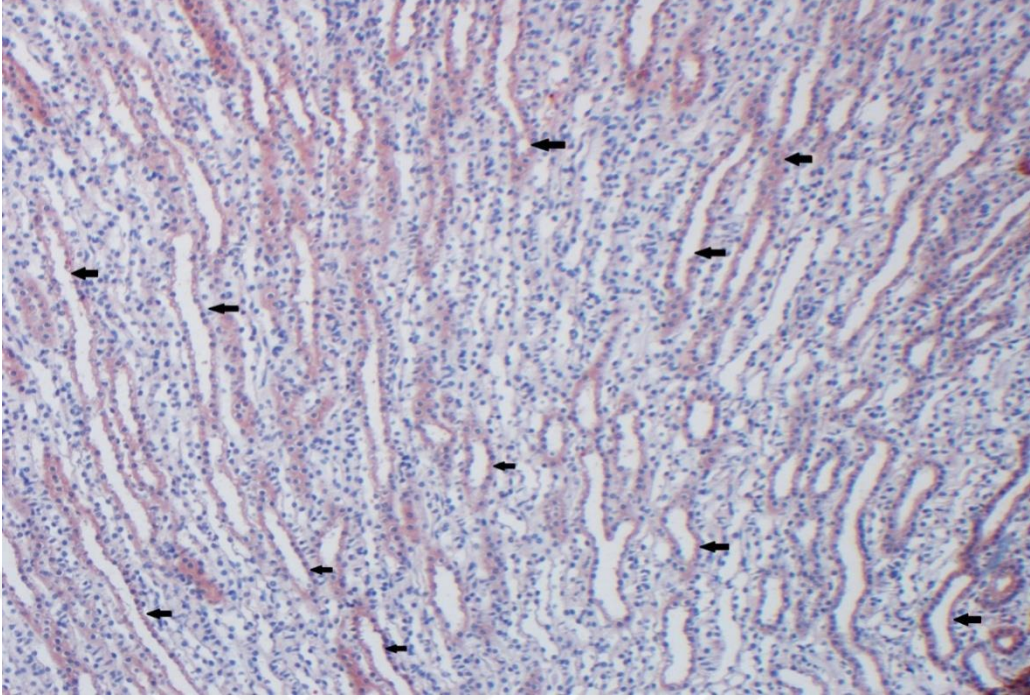
Şekil 3.40. Böbrek dokusunun korteks bölgesinde PNX-14 immünoreaktivitesi (oklar)
(Mayer hematoksilen, Büyütme: X10 μ m)



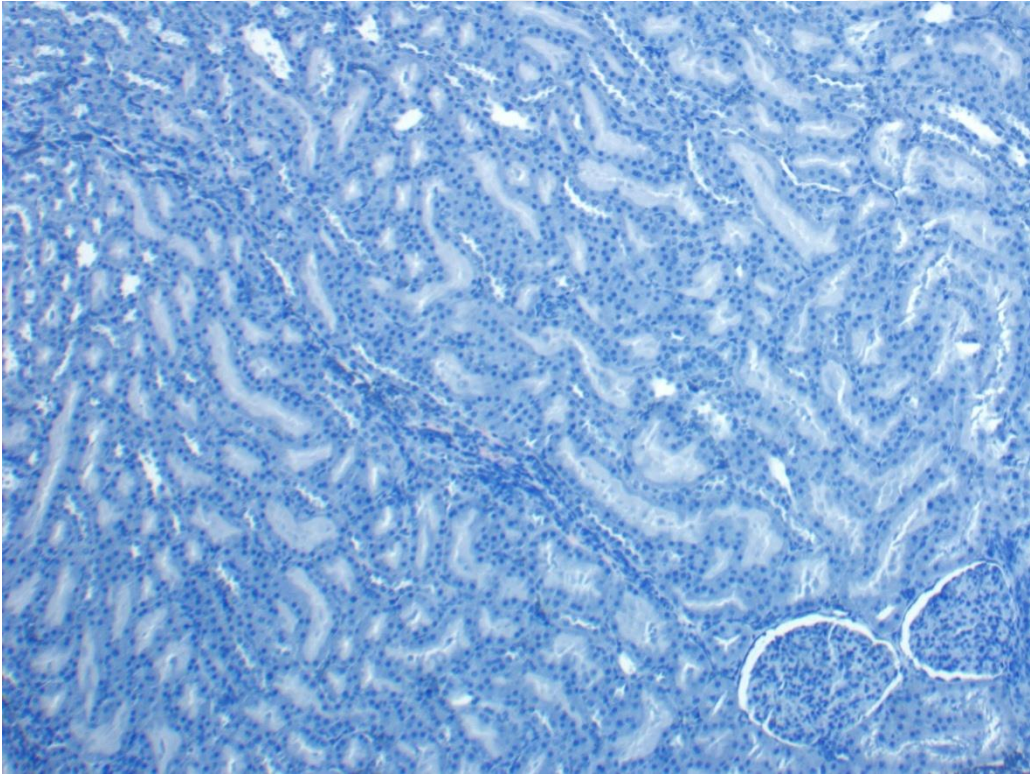
Şekil 3.41. Böbrek dokusunun medulla bölgesinde PNX-14 immünoaktivitesi (oklar) (Mayer hematoksilen, Büyütme: X10 μ m)



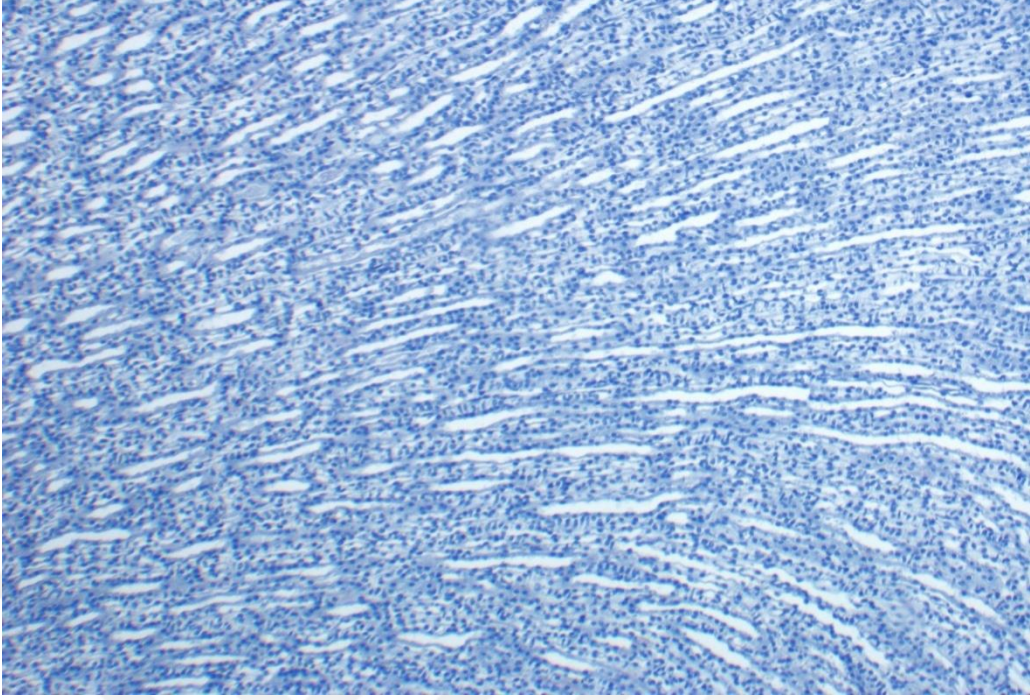
Şekil 3.42. Böbrek dokusunun korteks bölgesinde NUCB2/nesfatin-1 immünoaktivitesi (oklar) (Mayer hematoksilen, Büyütme: X10 μ m)



Şekil 3.43. Böbrek dokusunun medulla bölgesinde NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi (oklar) (Mayer hematoksilen, Büyütme: X10 μ m)

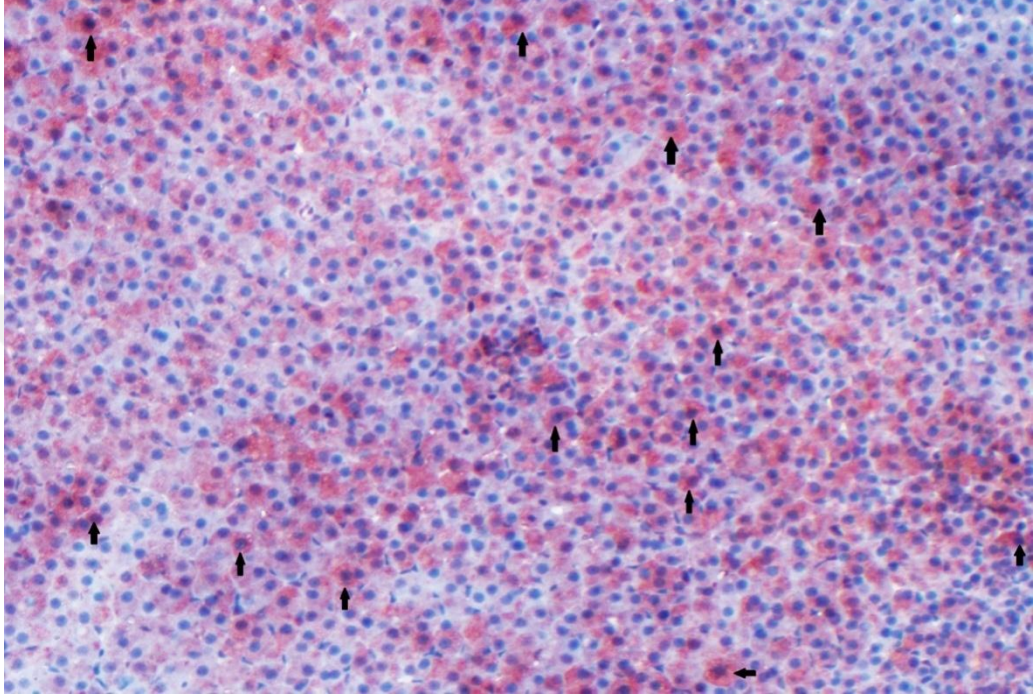


Şekil 3.44. Negatif kontrol dokusu (korteks) (Mayer hematoksilen, Büyütme: X10 μ m)

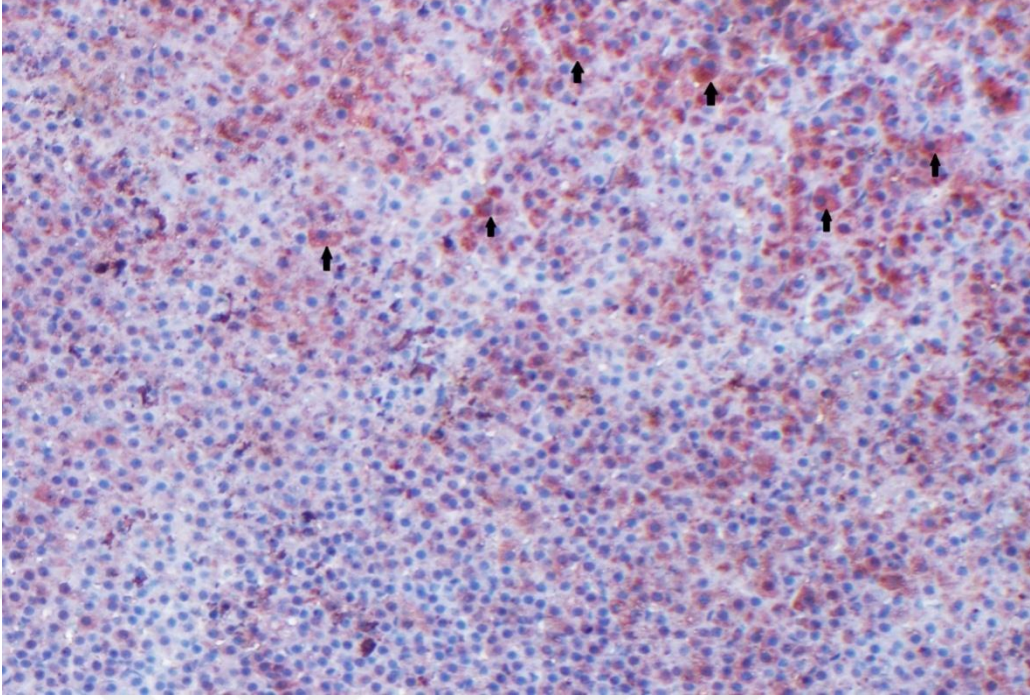


Şekil 3.45. Negatif kontrol dokusu (medulla) (Mayer hematoksislen, Büyütme: X10 μ m)

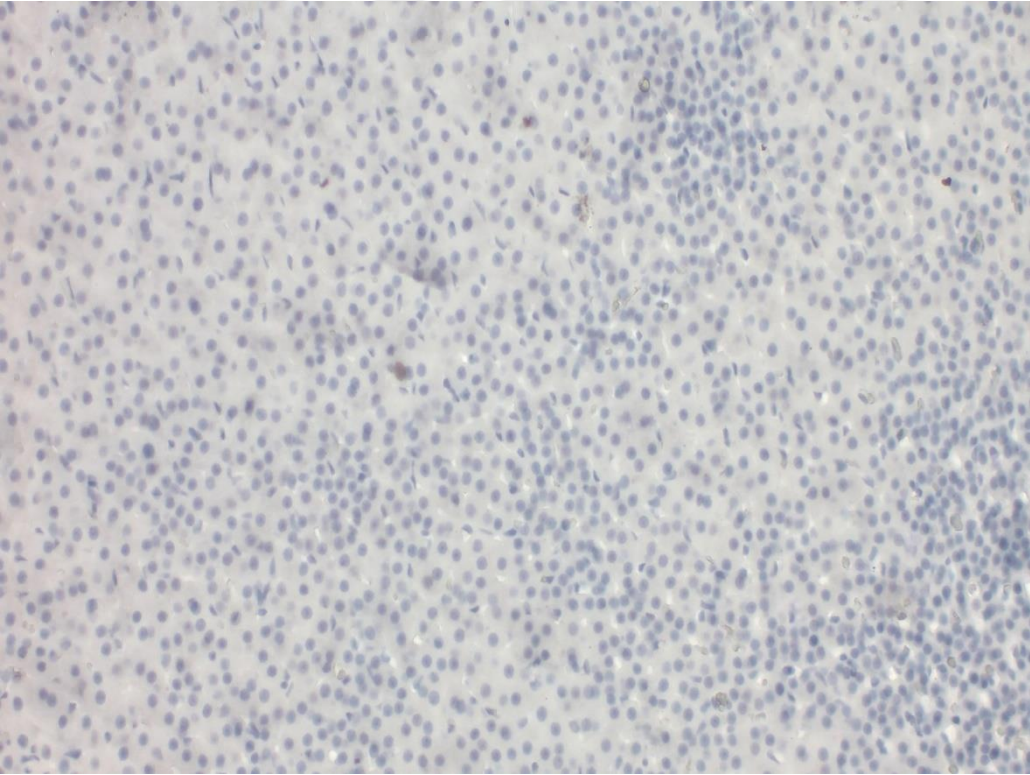
Böbrek üstü bezi dokusunun fasiküler katmanındaki hücrelerde yoğun şiddette PNX-14 immünoreaktivitesi gözlenirken (Şekil 3.46), NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesinin orta şiddette olduğu belirlendi (Şekil 3.47). Negatif kontrol dokusunda ise herhangi bir immünoreaktivite gözlenmedi (Şekil 3.48).



Şekil 3.46. Böbrek üstü bezinde PNX-14 immünoreaktivitesi (oklar) (Mayer hematoksisilen, Büyütme: X20 μ m)

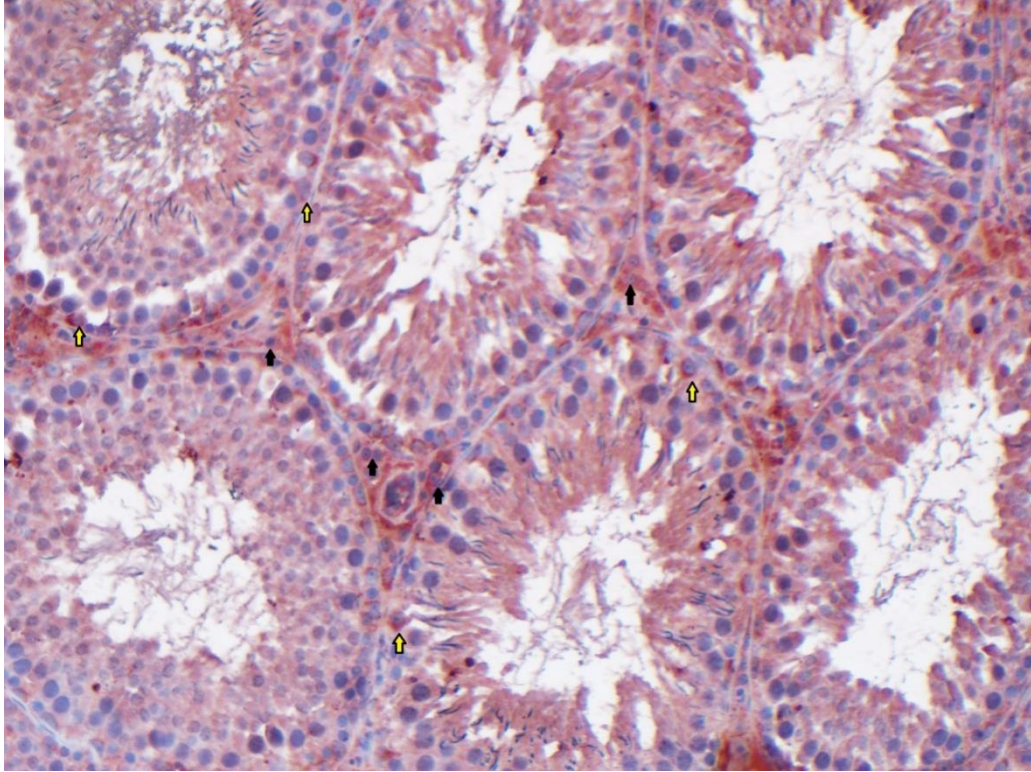


Şekil 3.47. Böbrek üstü bezinde NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi (oklar) (Mayer hematoksisilen, Büyütme: X20 μ m)

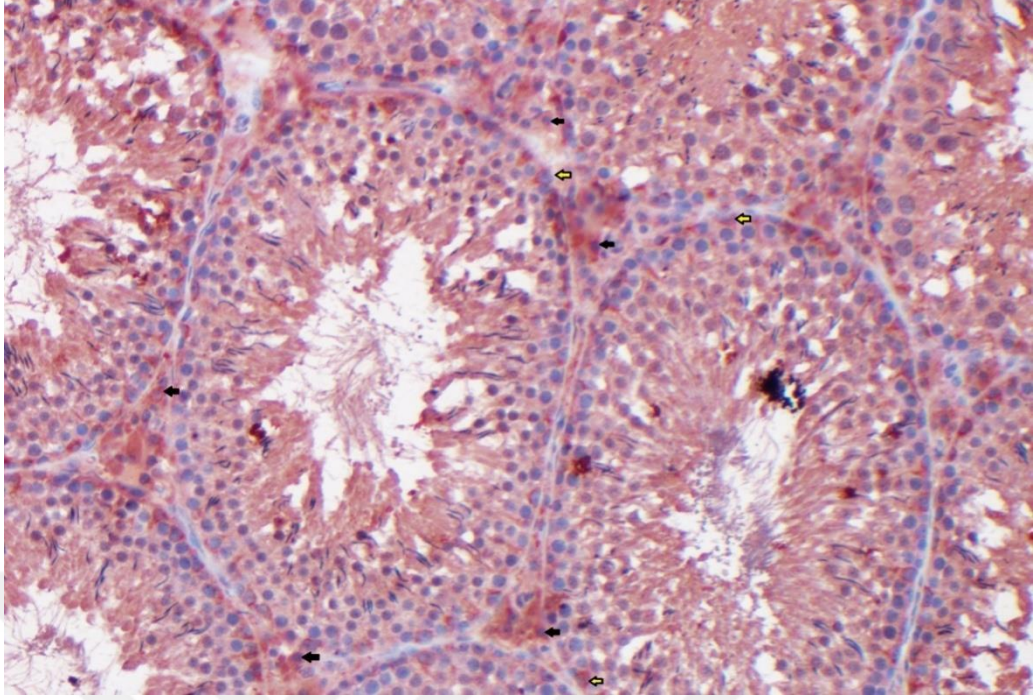


Şekil 3.48. Negatif kontrol dokusu (Mayer hematoksisilen, Büyütme: X20 μ m)

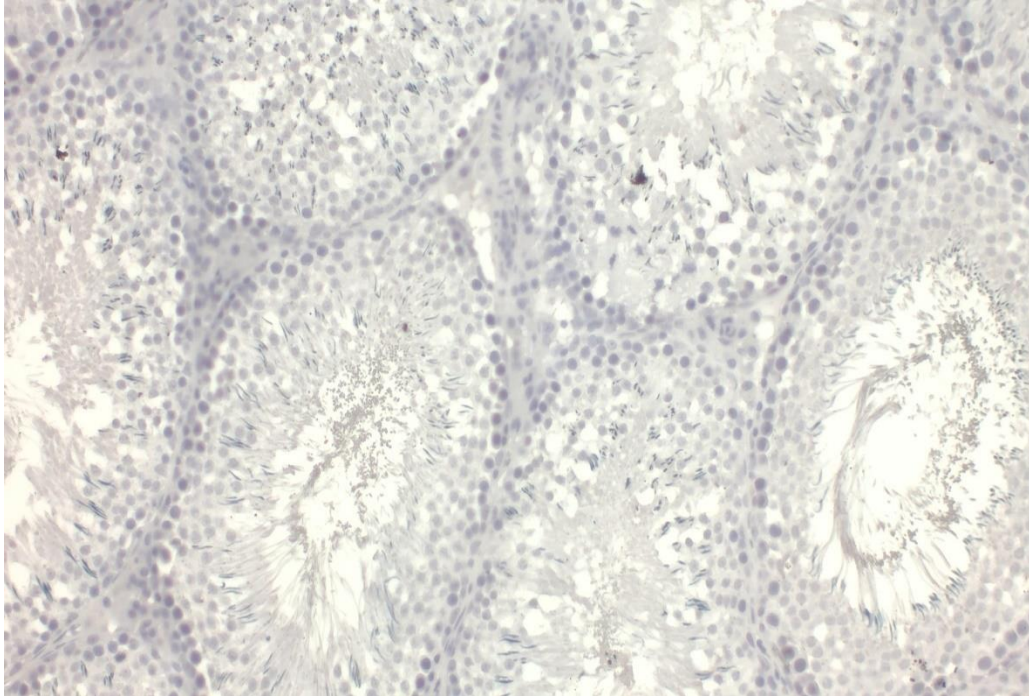
Testis dokusunda seminifer tubullerdeki Sertoli hücrelerinde (sarı ok) ve intersitisyel bölgedeki Leydig hücrelerinde (siyah ok) orta şiddette PNX-14 immünoreaktivitesi gözlenirken (Şekil 3.49), NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesinin Sertoli hücrelerinde (sarı ok) ve Leydig hücrelerinde (siyah ok) yoğun şiddette olduğu belirlendi (Şekil 3.50). Negatif kontrol dokusunda ise herhangi bir immünoreaktivite gözlenmedi (Şekil 3.51).



Şekil 3.49. Testis dokusunda sertoli hücrelerinde (sarı ok) ve intersitisyel hücrelerde (siyah ok) PNX-14 immünoreaktivitesi (Mayer hematoksilen, Büyütme: X20 μ m)



Şekil 3.50. Testis dokusunda sertoli hücrelerinde (sarı ok) ve intersitisyel hücrelerde (siyah ok) NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi (Mayer hematoksisilen, Büyütme: X20 μ m)



Şekil 3.51. Negatif kontrol dokusu (Mayer hematoksisilen, Büyütme: X20 μ m)

3.2. Histoskor Sonuçları

3.2.1. Dişi sıçanların dokularına ait histoskor sonuçları

Dokulardaki PNX-14 ve NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitelerine ait histoskor sonuçları Tablo 3.1.'de verildi.

Tablo 3.1. Dişi sıçanların dokularında PNX-14 ve NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitelerinin histoskoru

DOKU	Negatif Kontrol	PNX-14 (H-skor)	NUCB2/nesfatin-1 (H-skor)
Beyin	0.0±0.0	2.34±0.75 ^a	1.92±0.49 ^b
Beyincik	0.0±0.0	1.90±0.53 ^b	2.53±0.63 ^a
Karaciğer	0.0±0.0	0.95±0.46 ^b	1.89±0.57 ^a
Akciğer	0.0±0.0	1.93±0.58 ^b	2.34±0.51 ^a
Böbrek	0.0±0.0	1.90±0.49 ^b	2.35±0.60 ^a
Böbrek üstü bezi	0.0±0.0	2.52±0.59 ^a	1.98±0.55 ^b
Ovaryum	0.0±0.0	2.34±0.62 ^a	1.93±0.61 ^b
Uterus	0.0±0.0	2.53±0.63 ^a	1.92±0.50 ^b

^{a,b} ortalama ± standart sapma (p<0.05).

3.2.2. Erkek sıçanların dokularına ait histoskor sonuçları

Dokulardaki PNX-14 ve NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitelerine ait histoskor sonuçları Tablo 3.2.'de verildi.

Tablo 3.2. Erkek sıçanların dokularında PNX-14 ve NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitelerinin histoskoru

DOKU	Negatif Kontrol	PNX-14 (H-skor)	NUCB2/nesfatin-1 (H-skor)
Beyin	0.0±0.0	2.35±0.65 ^a	1.90±0.55 ^b
Beyincik	0.0±0.0	0.96±0.61 ^b	1.92±0.49 ^a
Karaciğer	0.0±0.0	1.96±0.58 ^a	1.95±0.46 ^a
Akciğer	0.0±0.0	2.53±0.48 ^a	2.54±0.51 ^a
Böbrek	0.0±0.0	2.52±0.37 ^a	2.50±0.48 ^a
Böbrek üstü bezi	0.0±0.0	2.53±0.50 ^a	1.91±0.51 ^b
Testis	0.0±0.0	1.92±0.75 ^b	2.52±0.40 ^a

^{a,b} ortalama ± standart sapma (p<0.05).

Çalışmada, PNX-14 ve NUCB2/nesfatin-1 nöropeptidlerinin erişkin dişi sıçanların beyin, beyincik, karaciğer, akciğer, böbrek, böbrek üstü bezi, ovaryum ile uterus dokularındaki, erkek sıçanların ise beyin, beyincik, karaciğer, akciğer, böbrek, böbrek üstü bezi ile testis dokularındaki dağılımları immünohistokimyasal olarak ortaya konuldu.

Son raporlar, çok boyutlu bir peptid olan PNX'in (McIlwraith ve ark., 2022), birçok fizyolojik ve patolojik işlevi düzenlemek üzere merkezi ve periferik dağılımını işaret etmektedir (Liang ve ark., 2022). PNX'in merkezi ve periferik dokularda, özellikle nöroendokrin fonksiyonlarla yakından ilişkili olan omurilikte ve HPG ekseninde yaygın olarak dağılım gösterdiği ortaya konulmuştur (Liang ve ark., 2022). Merkezi olarak, bu nöropeptidin sıçan beyin dokusunda özellikle hipotalamusta en yüksek ekspresyona sahip olduğu ve ARC, dorsal hipotalamus (DH), PVN, magnosellüler ve parvosellüler SON, VMH, LH, perifornikal alan, supraoptik retrokiazmatik çekirdek ve zona incerta (ZI) gibi çeşitli hipotalamik bölgelerde değişen yoğunlukta immünoreaktivite gösterdiği bildirilmiştir. Hipotalamusa ek olarak, substantia nigra, Edinger-Westphal çekirdeği, vagus sinirinin dorsal motor çekirdeği ve area postrema gibi diğer alanların ise orta yoğunlukta PNX immünoreaktivitesini sergilediği ifade edilmiştir (Yosten ve ark., 2013). İmmünohistokimyasal sonuçlar, sıçanlarda PNX immünoreaktivitesinin trigeminal omurilik, yüzeysel dorsal boynuz ve NTS'un yanı sıra omurilikte dorsal kök, trigeminal sinir ve nodüler gangliyonun hücre popülasyonunda da bulunduğunu göstermiştir (Lyu ve ark., 2013). Ayrıca medyan eminens ile ön ve arka hipofiz bölümlerinin de PNX immünoreaktivitesi gösterdiği ortaya konulmuştur (Yosten ve ark., 2013).

Merkezi ve periferik dokularda yaygın bir dağılıma sahip olan nesfatin-1'in glikoz ve lipid metabolizması, gastrointestinal fonksiyonlar, termojenez, depresyon, anksiyete, ayrıca kardiyovasküler ve üreme fonksiyonları dahil olmak üzere birçok fizyolojik ve patolojik süreçte yer aldığı bildirilmiştir (Luo ve ark., 2021). Sıçanlarda bu nöropeptidin ARC, PVN, SON, LH, NTS, dorsomedial hipotalamik çekirdek, tuberal hipotalamik alan, periventriküler çekirdek, Edinger-Westphal çekirdeği ve Vagus sinirinin dorsal motor çekirdeği gibi hipotalamus ile beyin sapı nükleuslarında bulunduğu tespit edilmiştir. Bu bölgelere ek olarak hipofizde de belirlenen NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesinin ayrıca ön beyin ile arka beyin çekirdeklerinde, merkezi amigdaloid çekirdekte, omuriliğin torasik, lomber ve sakral pregangliyonik sempatik ve parasempatik nöronlarında da bulunduğu gösterilmiştir (Stengel ve Taché, 2010). Hem fare hipotalamusunda hem de murin hipotalamik hücrelerinde yoğun bir şekilde eksprese edildiği bulunan bu peptidin

(Schalla ve Stengel, 2021) sıçan beyinde, PNX ile yüksek derecede ortak lokalizasyon gösterdiği açıklanmıştır (Liang ve ark., 2022). Nesfatin-1'in tüm nöronların %50'sinde gözlenen ekspresyonunun, sıçanlarda özellikle hipotalamik çekirdekte aynı bölgede meydana geldiği ve immünoreaktif PNX nöronlarının çoğunun, nesfatin-1 ile birlikte ekspresyon gösterdiği tespit edilmiştir (Palasz ve ark., 2015). Benzer şekilde, mevcut çalışmada hem dişi hem de erkek sıçanların beyin dokusunun moleküler katmanındaki nöronlarda yoğun şiddette PNX-14 immünoreaktivitesi ve orta şiddette NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesi belirlendi.

Yapılan çalışmalarda, rodentlerin merkezi sinir sisteminde spinoserebellar yolun dorsal ve ventral bölgelerinde PNX benzeri immünoreaktivite tespit edilmiştir (Samson ve ark., 2007; Hofmann ve ark., 2017). Prinz ve arkadaşları (2017), dişi ve erkek sıçanlarda yaptıkları bir çalışmada spinoserebellar yolun dorsal ve ventral bölgelerinde PNX-14'ün yüksek yoğunlukta immünoreaktivitesini belirlemiş ve pleiotropik fonksiyonlarına dikkati çekmiştir. Bunun yanı sıra Goebel ve arkadaşları (2009, 2011) sıçanlarda ve farelerde yaptıkları immünohistokimyasal çalışmalarda beyinciğin purkinje hücrelerinde NUCB2/nesfatin-1'in varlığını rapor etmiştir. Ayrıca merkezi olarak varsayılan reseptör ekspresyon bölgeleri arasında beyinciğin bulunmasıyla (Prinz ve ark., 2016), NUCB2/nesfatin-1'in geniş bir homeostatik işlevi olduğu belirtilmiştir (Friedrich ve Stengel, 2021). Benzer olarak, çalışmada dişi sıçanların beyincik dokusunun gangliyoner tabakasındaki purkinje hücrelerinde orta şiddette PNX-14 immünoreaktivitesi gözlenirken, NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesinin yoğun şiddette olduğu belirlendi. Erkek sıçanlarda ise aynı hücrelerde hafif şiddette PNX-14 immünoreaktivitesi gözlenirken, NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesinin orta şiddette görüldüğü tespit edildi.

Beyinde magnosellüler nörosekretör çekirdeklerde tespit edilen PNX'in, hipofiz portal sistemi yoluyla dolaşım sistemine salınabileceği ifade edilmiştir (Palasz ve ark., 2015). Liang ve arkadaşları (2022), bu nöropeptidin merkezi dokulardaki yaygın dağılımının yanı sıra periferik dokular tarafından da salgılanabileceğini belirtmiştir. Wang ve arkadaşları (2018), hipotalamus ve hipofizin yanı sıra karaciğerde de PNX varlığına dikkati çekerek gıda alımının ve büyümenin düzenlenmesinde bu peptidin rolü olduğunu ifade etmiştir. Öte yandan Rajeswari ve arkadaşları (2022), da zebrafish balıklarının gonadlarında ve karaciğer hücrelerinde PNX benzeri ve reseptörü GPR173 benzeri immünoreaktiviteyi tespit etmiştir. Reseptörü GPR173 aracılığıyla çeşitli biyolojik etkilerinin aracılık edildiği bilinen PNX (Billert ve ark., 2020) ile diğer peptid

hormonlarına benzer şekilde, NUCB2/nesfatin-1'in de MSS'deki ekspresyonlarının yanı sıra, periferik dokularda da eksprese edildiği ortaya konulmuştur (Stengel ve ark., 2009a). Gonzalez ve arkadaşları (2010), japonya balıklarının karaciğer dokusunda bu peptidin en yüksek ekspresyonu gösterdiğini bildirmiştir. Kim ve arkadaşları (2014), dişi ve erkek farelerin karaciğerinde NUCB2 mRNA ve nesfatin-1 protein ekspresyonlarının belirlendiğini açıklamıştır. Hatem ve arkadaşları (2015) da, zebrafish balıklarının bağırsak, karaciğer ve beyin dokularında NUCB2A ve NUCB2B mRNA'larını kodlayan nesfatin-1'in ekspresyonunu belirleyerek endojen nesfatin-1 için potansiyel anorektik ve metabolik roller olabileceğine dikkati çekmiştir. Benzer şekilde, mevcut çalışmada dişi sıçanların karaciğer dokusunda hepatositlerde hafif şiddette PNx-14 immünoaktivitesi gözlenirken, NUCB2/nesfatin-1 immünoaktivitesinin orta şiddette olduğu belirlendi. Erkek sıçanlarda ise hem PNx-14 hem de NUCB2/nesfatin-1 immünoaktivitesinin hepatositlerde orta şiddette olduğu gözlemlendi.

Yosten ve arkadaşları (2013), yetişkin sıçanların çeşitli periferik dokularındaki PNx peptidini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, akciğer dokusunda PNx immünoaktivitesinin var olduğunu ilk olarak açıklamıştır. Çalışmacıların, enzim bağlantılı immünosorbent assay (ELISA) tekniği aracılığıyla, bu peptid ekspresyonunu 179 pg/g düzeyinde bildirdikleri ifade edilmiştir (Schalla ve Stengel, 2018). Bununla birlikte, akciğer dokusunda varlığının gösterilmesiyle, nesfatin-1'in de periferde geniş bir dağılıma ve fizyolojik etkinliğe sahip olduğu ortaya konulmuştur (Chung ve ark., 2013; Prinz ve Stengel, 2016). Kim ve arkadaşları (2014), NUCB2 mRNA ekspresyonunun dişi ve erkek farelerin akciğer dokusundaki sinyallerle daha yaygın bir şekilde dağıldığını öne sürmüştür. Çok yakın zamanda yapılan bir çalışmada, Hui ve arkadaşları (2022) insan akciğer dokusunun bronşiyol epiteli, alveolar septa, vasküler endotel ve çeşitli bağışıklık hücrelerinde NUCB2/nesfatin-1 benzeri immünoaktivitenin lokalizasyonunu göstermiştir. Çalışmacılar, NUCB2/nesfatin-1'in nükleer lokalizasyonunun transkripsiyonel düzenlemedeki potansiyel rolünü ima ettiğini öne sürmüştür. Benzer olarak, çalışmada dişi sıçanların akciğer dokusundaki tip 2 pnömositlerde orta şiddette PNx-14 immünoaktivitesi gözlenirken, NUCB2/nesfatin-1 immünoaktivitesinin yoğun şiddette olduğu belirlendi. Erkek sıçanlarda ise akciğerdeki bu hücrelerde hem PNx-14 hem de NUCB2/nesfatin-1 immünoaktivitelerinin yoğun şiddette olduğu gözlemlendi.

PNx immünoaktivitesinin, yetişkin sıçanların böbrek dokusunda var olduğunu gösteren ilk çalışmada (Yosten ve ark., 2013), ELISA yönteminin kullanılmasıyla bu

nöropeptid ekspresyonunun 120 pg/g düzeyinde bulunduğu bildirilmiştir (Schalla ve Stengel, 2018). Ayrıca daha sonra Wang ve arkadaşları (2018) da, PNX'in karakterizasyonu ile doku dağılımlarını inceledikleri başka bir çalışmada, böbrek dokusundaki PNX varlığını ortaya koymuştur. Bununla beraber, böbrekte bir diğer nöropeptid olarak nesfatin-1'in de varlığı ortaya konulmuştur (Prinz ve Stengel, 2016; Friedrich ve Stengel, 2021). Chung ve arkadaşları (2013), yetişkin dişi ve erkek farelerin böbreklerinde fetüs ve yenidoğana kıyasla son derece yüksek nesfatin-1/NUCB2 mRNA ekspresyonlarının gözlemlendiğini ifade etmiştir. Çalışmacılar, buradan hareketle nesfatin-1/NUCB2'nin fare organlarında gelişimi ve fizyolojik işlevi düzenleyebileceğini belirtmiştir. Benzer şekilde, mevcut çalışmada dişi sıçanların böbrek dokusunun korteksindeki proksimal tubullerde ve medullasındaki toplayıcı tubullerde orta şiddette PNX-14 immünoreaktivitesi gözlenirken, NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesinin her iki bölgedeki tubullerde yoğun şiddette olduğu belirlendi. Erkek sıçanlarda ise proksimal ve toplayıcı tubullerde yoğun şiddette PNX-14 immünoreaktivitesi gözlenirken, NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesinin proksimal tubullerde yoğun, toplayıcı tubullerde ise orta şiddette olduğu tespit edildi.

PNX reseptörü GPR173'ün PNX'in araştırılmadığı böbrek üstü bezinde tespit edilmiş olması (Fagerberg ve ark., 2014), bahsedilen nöropeptidin bu dokuda spesifik işlevlere sahip olabileceğini düşündürmüştür (McIlwraith ve Belsham, 2018). Bununla birlikte, HPA ekseninde yer alan ön beyin bölgelerine bağlantılarından dolayı, stres devrelerine sıkı bir şekilde bağlı olan NTS nöronlarında (Ter Horst ve ark., 1989) yüksek oranda eksprese edildiği bilinen PNX'in (Yosten ve ark., 2013), çeşitli stres türlerine verilen fizyolojik yanıtta önemli roller oynayabileceği öne sürülmüştür (McIlwraith ve ark., 2022). PNX'e benzer şekilde, nesfatin-1'in de çeşitli stres reaksiyonlarında yer aldığı gösterilmiştir. Prinz ve arkadaşları (2016) yaptıkları bir çalışmada, otoradyografi yöntemini kullanarak erkek sıçanların adrenal bezinde nesfatin-1 reseptörünün lokalizasyonunu ortaya çıkarmıştır. Ayrıca nesfatin-1'in merkezi varsayılan reseptör ekspresyon bölgeleri arasında yer alan PVN'in (Prinz ve ark., 2016), strese karşı nöroendokrin ve kardiyovasküler reaksiyonlar ile aynı zamanda ACTH salınımını düzenleyen hipotalamustaki CRF nöronlarının ana bölgesi olan stres yanıtında çok önemli bir bölge olduğu belirtilmiştir (Vermetten ve Bremner, 2002). Benzer olarak çalışmada dişi sıçanların böbrek üstü bezinin glomeruler ve fasiküler katmanlarındaki hücrelerde yoğun şiddette PNX-14 immünoreaktivitesi gözlenirken, NUCB2/nesfatin-1

immünoreaktivitesinin fasiküler katmandaki hücrelerde orta şiddette olduğu belirlendi. Erkek sıçanlarda ise fasiküler katmandaki hücrelerde yoğun şiddette PNX-14 immünoreaktivitesi gözlenirken, NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesinin orta şiddette olduğu belirlendi.

PNX'in, reseptörü GPR173 aracılığıyla üreme sistemi üzerinde bir takım düzenleyici etkilere sahip olduğu açıklanmıştır (Stein ve ark., 2016; Lyu ve ark., 2018). Nguyen ve arkadaşları (2019), insan yumurtalığında eksprese edilen PNX ve GPR173'ün foliküler büyümeyi desteklemede potansiyel bir role sahip olduğunu ortaya koymuştur. Çalışmacılar, granuloza hücrelerinde PNX ve GPR173 ekspresyonunun ovarian folikülogenezisin ilerlemesi ile arttığını ve özellikle antral folikül, korpus luteum ve oositlerde yoğun immünoreaktivitenin gözlendiğini bildirmiştir (Nguyen ve ark., 2019). Bununla birlikte, NUCB2/nesfatin-1'in anorektik etki ile enerji depolarının ve gonadal fonksiyonların düzenlenmesinde önemli olduğu (Friedrich ve ark., 2019) ve bu nedenle üremenin merkezi kontrolünde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Palasz ve ark., 2012; Lyu ve ark., 2018). Kim ve arkadaşları (2014) farelerde yaptıkları bir çalışmada foliküler tekal, intersitisyel ve bazı luteal hücreler ve oositlerde NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesini göstermiştir. Çalışmacılar ayrıca farelerde yaptıkları bir başka çalışmada, in situ hibridizasyon tekniğiyle ovaryumun granuloza ve teka hücrelerinde NUCB2 mRNA ekspresyonunu saptamıştır (Kim ve ark., 2019). Benzer şekilde mevcut çalışmada, ovaryum dokusundaki luteal ve granuloza hücrelerinde yoğun şiddette PNX-14 immünoreaktivitesi gözlenirken, NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesinin teka ve granuloza hücrelerinde orta şiddette olduğu belirlendi.

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada PNX'in ovaryumdaki döngüsellik ve dolayısıyla endometriyal değişiklikler için gerekli olduğu ve bu nöropeptidin yokluğunda GnRH sekresyonunun bozulduğu belirtilmiştir. Çalışmada GPR173 ve PNX-14 prekürsör proteininin insan endometriyumunda eksprese edildiği de bildirilmiştir (Kulinska ve ark., 2021). Öte yandan Kim ve arkadaşları (2019) fare uterusunda NUCB2 mRNA ve NUCB2/nesfatin-1 protein ekspresyonlarının varlığını tespit etmiştir. Ayrıca çalışmacılar, bu lokalizasyonu glanduler ve epitelyal hücrelerde in situ hibridizasyon tekniğiyle belirlemiştir (Kim ve ark., 2019). Nesfatin-1 protein ekspresyonunun, uterus dokusunda bezlerde ve endometriyal epitelyal hücrelerde immünohistokimyasal olarak belirlendiği de ifade edilmiştir (Çatak ve ark., 2014; Kim ve ark., 2014). Benzer olarak çalışmada, uterus dokusunda glanduler epitel ve stromal hücrelerde yoğun şiddette PNX-14

immünoreaktivitesi gözlenirken, NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesinin endometriyal epitelyal hücrelerde yoğun, glanduler epitel ve stromal hücrelerde ise orta şiddette olduğu belirlendi.

PNX'in hipotalamus ve hipofiz üzerindeki etkileri ile LH ve GnRH salgılanması üzerindeki düzenleyici etkilerinin, bu nöropeptidin HPG ekseninde yer aldığını gösterdiği ifade edilmiştir (Billert ve ark., 2020). PNX'e benzer şekilde, reseptörü GPR173'ün de ağırlıklı olarak beyinde ve gonadal bölgelerde eksprese edildiği bildirilmiştir (Matsumoto ve ark., 2000). Rajeswari ve Unniappan (2020), zebrafish balıklarının gonadlarında, özellikle spermatositlerin destekleyici hücre katmanlarında PNX benzeri ve SREB3 benzeri immünoreaktiviteyi tespit etmiştir. Öte yandan, Stengel ve arkadaşları (2009a) sıçan testisinde seminifer tubullerin yanındaki intersitisyumda nesfatin-1-immünoreaktif hücreleri tespit etmiştir. Garcia-Galiano ve arkadaşları (2010a) da, nesfatin-1'in immünohistokimyasal olarak sıçan ve fare testislerinde Leydig hücreleri de dahil olmak üzere intersitisyel hücrelerde lokalize olduğunu ortaya koymuştur. Bununla beraber, sıçanlarda Leydig hücreleri ortadan kaldırıldığında, NUCB2/nesfatin-1 proteinin Sertoli hücrelerinde ve Leydig hücre progenitörlerinde bulunduğu dikkati çekmiştir (Garcia-Galiano ve ark., 2010b). Kim ve arkadaşları (2014), farelerde NUCB2/nesfatin-1 ekspresyonunun testis dokusunda dikkate değer bir şekilde yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca çalışmacılar, testisin Leydig hücrelerinde ve seminifer tubuller arasındaki intersitisyel hücrelerde nesfatin-1 protein ekspresyonunu saptamıştır (Kim ve ark., 2014). Ek olarak, NUCB2/nesfatin-1 protein ekspresyonu sıçanların intersitisyel olgun Leydig hücrelerinde de tespit edilmiştir (Gao ve ark., 2016). Benzer şekilde mevcut çalışmada, testis dokusunun seminifer tubullerindeki Sertoli hücrelerinde ve intersitisyel bölgedeki Leydig hücrelerinde orta şiddette PNX-14 immünoreaktivitesi gözlenirken, NUCB2/nesfatin-1 immünoreaktivitesinin her iki hücre tipinde yoğun şiddette olduğu belirlendi.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Çalışmamızda, PNx-14 ve NUCB2/nesfatin-1 nöropeptidlerinin erişkin dişi sıçanların beyin, beyincik, karaciğer, akciğer, böbrek, böbrek üstü bezi, ovaryum ile uterus dokularındaki, erkek sıçanların ise beyin, beyincik, karaciğer, akciğer, böbrek, böbrek üstü bezi ile testis dokularındaki dağılımları immünohistokimyasal olarak ortaya konuldu.
- Dişi sıçanların beyin dokusunda yoğun PNx-14 ve orta NUCB2/nesfatin-1 immünoaktivitesi belirlenirken beyincik dokusunda orta PNx-14 ve yoğun NUCB2/nesfatin-1 immünoaktivitesi tespit edildi. Karaciğer dokusunda hafif PNx-14 ve orta NUCB2/nesfatin-1 immünoaktivitesi belirlenirken akciğer dokusunda orta PNx-14 ve yoğun NUCB2/nesfatin-1 immünoaktivitesi görüldü. Böbrek dokusunda orta PNx-14 ve yoğun NUCB2/nesfatin-1 immünoaktivitesi belirlenirken böbrek üstü bezinde yoğun PNx-14 ve orta NUCB2/nesfatin-1 immünoaktivitesi tespit edildi. Ovaryum ve uterus dokularında ise yoğun PNx-14 ve orta-yoğun NUCB2/nesfatin-1 immünoaktiviteleri gözlemlendi.
- Erkek sıçanların beyin dokusunda yoğun PNx-14 ve orta NUCB2/nesfatin-1 immünoaktivitesi gözlenirken beyincik dokusunda hafif PNx-14 ve orta NUCB2/nesfatin-1 immünoaktivitesi belirlendi. Karaciğer dokusunda orta PNx-14 ve NUCB2/nesfatin-1 immünoaktivitesi tespit edilirken akciğer dokusunda yoğun PNx-14 ve NUCB2/nesfatin-1 immünoaktivitesi görüldü. Böbrek dokusunda yoğun PNx-14 ve orta-yoğun NUCB2/nesfatin-1 immünoaktivitesi belirlenirken böbrek üstü bezinde yoğun PNx-14 ve orta NUCB2/nesfatin-1 immünoaktivitesi gözlemlendi. Testis dokusunda ise orta PNx-14 ve yoğun NUCB2/nesfatin-1 immünoaktivitesi belirlendi.
- Pleiotropik fonksiyonlara sahip nöropeptidlerden olan PNx-14 ve NUCB2/nesfatin-1'in, hem dişi hem de erkek sıçanların merkezi ve periferik dağılımı sayesinde pek çok nöroendokrin ve fizyolojik aktivitenin düzenlenmesinde oldukça önemli roller aldıkları söylenebilir.
- Bu rollerin daha iyi anlaşılabilmesi ve çeşitli hastalık durumlarındaki güçlü terapotik potansiyellerinin değerlendirilebilmesi için daha kapsamlı gen knock-in/out hayvan modellerine ve klinik çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

5. KAYNAKLAR

- Acconcia, F., Pallottini, V., Marino, M., 2015. Molecular mechanisms of action of BPA. *Dose Response*, 13(4):1559325815610582.
- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., George, R.A., Lewis, S.E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S.N., Sutton, G.G., Wortman, J.R., Yandell, M.D., Zhang, Q., Chen, L.X., Brandon, R.C., Rogers, Y.-H.C., Blazej, R.G., Champe, M., Pfeiffer, B.D., Wan, K.H., Doyle, C., Baxter, E.G., Helt, G., Nelson, C.R., Miklos, G.L.G., Abril, J.F., Agbayani, A., An, H.-J., Andrews-Pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, R.M., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, E.M., Beeson, K.Y., Benos, P.V., Berman, B.P., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M.R., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, K.C., Busam, D.A., Butler, H., Cadieu, E., Center, A., Chandra, I., Cherry, J.M., Cawley, S., Dahlke, C., Davenport, L.B., Davies, P., de Pablos, B., Delcher, A., Deng, Z., Mays, A.D., Dew, I., Dietz, S.M., Dodson, K., Doup, L.E., Downes, M., Dugan-Rocha, S., Dunkov, B.C., Dunn, P., Durbin, K.J., Evangelista, C.C., Ferraz, C., Ferriera, S., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, A.E., Garg, N.S., Gelbart, W.M., Glasser, K., Glodek, A., Gong, F., Gorrell, J.H., Gu, Z., Guan, P., Harris, M., Harris, N.L., Harvey, D.A., Heiman, T.J., Hernandez, J.R., Houck, J., Hostin, D., Houston, K.A., Howland, T.J., Wei, M.-H., Ibegwam, C., Jalali, M., Kalush, F., Karpen, G.H., Ke, Z., Kennison, J.A., Ketchum, K.A., Kimmel, B.E., Kodira, C.D., Kraft, C.L., Kravitz, S., Kulp, D., Lai, Z., Lasko, P., Lei, Y., Levitsky, A.A., Li, J.H., Li, Z., Liang, Y., Lin, X., Liu, X., Mattei, B., McIntosh, T.C., McLeod, M.P., McPherson, D., Merkulov, G., Milshina, N.V., Mobarry, C., Morris, J., Moshrefi, A., Mount, S.M., Moy, M., Murphy, B., Murphy, L., Muzny, D.M., Nelson, D.L., Nelson, D.R., Nelson, K.A., Nixon, K., Nusskern, D.R., Paclebb, J.M., Palazzolo, M., Pittman, G.S., Pan, S., Pollard, J., Puri, V., Reese, M.G., Reinert, K., Remington, K., Saunders, R.D.C., Scheeler, F., Shen, H., Shue, B.C., Siden-Kiamos, I., Simpson, M., Skupski, M.P., Smith, T.J., Spier, E., Spradling, A.C., Stapleton, M., Strong, R., Sun, E., Svirskas, R., Tector, C., Turner, R., Venter, E., Wang, A.H., Wang, X., Wang, Z.-Y., Wassarman, D.A., Weinstock, G.M., Weissenbach, J., Williams, S.M., Woodage, T., Worley, K.C., Wu, D., Yang, S., Yao, Q.A., Ye, J., Yeh, R.-F., Zaveri, J.S., Zhan, M., Zhang, G., Zhao, Q., Zheng, L., Zheng, X.H., Zhong, F.N., Zhong, W., Zhou, X., Zhu, S.C., Zhu, X., Smith, H.O., Gibbs, R.A., Myers, E.W., Rubin, G.M., Venter, J.C., 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287(5461):2185–2195.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2009. *Essential Cell Biology*, 3rd ed. New York, USA: Garland.
- Atsuchi, K., Asakawa, A., Ushikai, M., Ataka, K., Tsai, M., Koyama, K., Sato, Y., Kato, I., Fujimiya, M., Inui, A., 2010. Centrally administered nesfatin-1 inhibits feeding behaviour and gastroduodenal motility in mice. *Neuroreport*, 21(15):1008–1011.

- Aydın, S.**, 2013. Role of NUCB2/nesfatin-1 as a possible biomarker. *Current Pharmaceutical Design*, 19(39):6986–6992.
- Aydın, S., Kuloglu, T., Ozercan, M.R., Albayrak, S., Aydın, S., Bakal, U., Yilmaz, M., Kalayci, M., Yardim, M., Sarac, M., Kazez, A., Kocdor, H., Kanat, B., Ozercan, İ.H., Gonen, M., Bilgen, M., Balgetir, F.**, 2016. Irisin immunohistochemistry in gastrointestinal system cancers. *Biotechnic & Histochemistry*, 91(4):242–250.
- Baraban, S.C., Tallent, M.K.**, 2004. Interneuron diversity series: interneuronal neuropeptides–endogenous regulators of neuronal excitability. *Trends in Neurosciences*, 27(3):135–142.
- Billert, M., Wojciechowicz, T., Jasaszwilli, M., Szczepankiewicz, D., Wasko, J., Kazmierczak, S., Strowski, M.Z., Nowak, K.W., Skrzypski, M.**, 2018. Phoenixin-14 stimulates differentiation of 3T3-L1 preadipocytes via cAMP/Epac-dependent mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1863(12):1449–1457.
- Billert, M., Rak, A., Nowak, K.W., Skrzypski, M.**, 2020. Phoenixin: More than Reproductive Peptide. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21):8378.
- Boer, H.H., Schot, L.P., Veenstra, J.A., Reichelt, D.**, 1980. Immunocytochemical identification of neural elements in the central nervous systems of a snail, some insects, a fish, and a mammal with an antiserum to the molluscan cardio-excitatory tetrapeptide FMRF-amide. *Cell Tissue Research*, 213(1):21–27.
- Brailoiu, G.C., Dun, S.L., Brailoiu, E., Inan, S., Yang, J., Chang, J.K., Dun, N.J.**, 2007. Nesfatin-1: distribution and interaction with a G protein-coupled receptor in the rat brain. *Endocrinology*, 148(10):5088–5094.
- Brown, B.E.**, 1975. Proctolin: a peptide transmitter candidate in insects. *Life Sciences*, 17(8):1241–1252.
- Buck, L., Axel, R.**, 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65(1):175–187.
- Burbach, J.P.H.**, 2011. What are neuropeptides? *Methods Molecular Biology*, 789:1–36.
- Çatak, Z., Aydın, S., Sahin, I., Kuloglu, T., Aksoy, A., Dagli, A.F.**, 2014. Regulatory neuropeptides (ghrelin, obestatin and nesfatin-1) levels in serum and reproductive tissues of female and male rats with fructose-induced metabolic syndrome. *Neuropeptides*, 48(3):167–177.
- C. Elegans Sequencing Consortium**, 1998. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*, 282(5396):2012–2018.
- Ceriani, R., Calfun, C., Whitlock, K.E.**, 2021. Phoenixin (smim20), a gene coding for a novel reproductive ligand, is expressed in the brain of adult zebrafish. *Gene Expression Patterns*, 39:119164.

- Charbogne, P., Kieffer, B.L., Befort, K.,** 2014. 15 years of genetic approaches in vivo for addiction research: Opioid receptor and peptide gene knockout in mouse models of drug abuse. *Neuropharmacology*, 76(2014):204–217.
- Chung, Y., Jung, E., Kim, H., Kim, J., Yang, H.,** 2013. Expression of Nesfatin-1/NUCB2 in Fetal, Neonatal and Adult Mice. *Development and Reproduction*, 17(4):461–477.
- Clynen, E., Reumer, A., Baggerman, G., Mertens, I., Schoofs, L.** 2010. Neuropeptide biology in Drosophila. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 692:192–210.
- Counts, S.E., Perez, S.E., Kahl, U., Bartfai, T., Bowser, R.P., Deecher, D.C., Mash, D.C., Crawley, J.N., Mufson, E.J.,** 2011. Galanin: neurobiologic mechanisms and therapeutic potential for Alzheimer's disease. *CNS Drug Reviews*, 7(4):445–370.
- Cowley, M.A., Grove, K.L.,** 2006. To be or NUCB2, is nesfatin the answer? *Cell Metabolism*, 4(6):421–422.
- Cruz, L.J., de Santos, V., Zafaralla, G.C., Ramilo, C.A., Zeikus, R., Gray, W.R., Olivera, B.M.,** 1987. Invertebrate vasopressin/oxytocin homologs. Characterization of peptides from *Conus geographus* and *Conus straitus* venoms. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(33):15821–15824.
- Çiftçi, K., Güvenç, G., Kaşıkçı, E., Yalçın, M.,** 2019. Centrally and peripherally injected nesfatin-1-evoked respiratory responses. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 267:6–11.
- de Avila, E.D., de Molon, R.S., de Godoi Gonçalves, D.A., Camparis, C.M.,** 2014 Relationship between levels of neuropeptide Substance P in periodontal disease and chronic pain: a literature review. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 5(2):91–97.
- Degen, L., Matzinger, D., Drewe, J., Beglinger, C.,** 2001. The effect of cholecystokinin in controlling appetite and food intake in humans. *Peptides*, 22(8):1265–1269.
- De Loof, A., Schoofs, L.,** 1990. Homologies between the amino acid sequences of some vertebrate peptide hormones and peptides isolated from invertebrate sources. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 95(3):459–468.
- De Paoli-Roach, A.,** 2010. Protein Phosphatase 1 Binding Proteins. In *From Handbook of Cell Signaling*, pp. 699–704, eds. Bradshaw, A.R., Dennis, E.A., MacMillan Publishing.
- Deutch, A.Y., Giuffrida, A., Roberts, J.L.,** 2014. Nonclassic signaling in the brain. In *From Molecules to Networks*, pp. 239–255, eds. Byrne, J.H., Heidelberger, R., Waxham, M.N.

- Diaz-Garrido, N., Cordero, C., Olivo-Martinez, Y., Badia, J., Baldomà, L., 2021.** Cell-to-cell communication by host-released extracellular vesicles in the gut: implications in health and disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4):2213.
- Donaldson, Z.R., Young, L.J., 2008.** Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality. *Science*, 322(5903):900–904.
- Dong, J., Xu, H., Xu, H., Wang, P.F., Cai, G.J., Song, H.F., Wang, C.C., Dong, Z.T., Ju, Y.J., Jiang, Z.Y., 2013.** Nesfatin-1 stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase in STZ-induced type 2 diabetic mice. *PloS One*, 8(12):e83397.
- Dore, R., Levata, L., Gachkar, S., Jöhren, O., Mittag, J., Lehnert, H., Schulz, C., 2017a.** The thermogenic effect of nesfatin-1 requires recruitment of the melanocortin system. *The Journal of Endocrinology*, 235(2):111–122.
- Dore, R., Levata, L., Lehnert, H., Schulz, C., 2017b.** Nesfatin-1: functions and physiology of a novel regulatory peptide. *The Journal of Endocrinology*, 232(1):R45–R65.
- Duve, H., Thorpe, A., 1979.** Immunofluorescent localization of insulin-like material in the median neurosecretory cells of the blowfly, *Calliphora vomitoria* (Diptera). *Cell and Tissue Research*, 200(2):187–191.
- Elphick, M.R., Mirabeau, O., Larhammar, D., 2018.** Evolution of neuropeptide signalling systems. *Journal of Experimental Biology*, 221(3):jeb151092.
- Fagerberg, L., Hallström, B.M., Oksvold, P., Kampf, C., Djureinovic, D., Odeberg, J., Habuka, M., Tahmasebpour, S., Danielsson, A., Edlund, K., Asplund, A., Sjöstedt, E., Lundberg, E., Szigartyo, C.A., Skogs, M., Takanen, J.O., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., Nilsson, P., Schwenk, J.M., Lindskog, C., Danielsson, F., Mardinoglu, A., Sivertsson, A., von Feilitzen, K., Forsberg, M., Zwahlen, M., Olsson, I., Navani, S., Huss, M., Nielsen, J., Ponten, F., Uhlén, M., 2014.** Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Molecular Cell Proteomics*, 13(2):397–406.
- Feijoo-Bandin, S., Rodriguez-Penas, D., Garcia-Rua, V., Mosquera-Leal, A., González-Juanatey, J.R., Lago, F., 2016.** Nesfatin-1: a new energy-regulating peptide with pleiotropic functions. Implications at cardiovascular level. *Endocrine*, 52(1):11–29.
- Felig, P., Baxter, J.D., Frohman, L. A., 1981.** *Endocrinology and Metabolism*. McGraw–Hill, Inc, New York.
- Folgueira, C., Barja-Fernandez, S., Prado, L., Al-Massadi, O., Castela, C., Pena-Leon, V., Gonzalez-Saenz, P., Baltar, J., Baamonde, I., Leis, R., Dieguez, C., Pagotto, U., Casanueva, F.F., Tovar, S.A., Nogueiras, R., Seoane, L.M., 2017.** Pharmacological inhibition of cannabinoid receptor 1 stimulates gastric release of

nesfatin-1 via the mTOR pathway. *World Journal of Gastroenterology*, 23(35):6403–6411.

- Foo, K.S., Brauner, H., Ostenson, C. G., Broberger, C.,** 2010. Nucleobindin-2/nesfatin in the endocrine pancreas: distribution and relationship to glycaemic state. *The Journal of Endocrinology*, 204(3):255–263.
- Friedrich, T., Schalla, M. A., Scharner, S., Kuehne, S. G., Goebel-Stengel, M., Kobelt, P., Rose, M., Stengel, A.,** 2019. Intracerebroventricular injection of phoenixin alters feeding behavior and activates nesfatin-1 immunoreactive neurons in rats. *Brain Research*, 1715:188–195.
- Friedrich, T., Stengel, A.,** 2021. Role of the novel peptide phoenixin in stress response and possible interactions with nesfatin-1. *International Journal of Molecular Science*, 22(17):9156.
- Fritsch, H.A.R., Van Noorden, S., Pearse, A.G.E.,** 1979. Localization of somatostatin-substance P- and calcitonin-like immunoreactivity in the neural ganglion of *Ciona intestinalis* L. (Ascididae). *Cell and Tissue Research*, 202:263–274.
- Gao, X., Zhang, K., Song, M., Li, X., Luo, L., Tian, Y., Zhang, Y., Li, Y., Zhang, X., Ling, Y., Fang, F., Liu, Y.,** 2016. Role of nesfatin-1 in the reproductive axis of male rat. *Scientific Reports*, 6:32877.
- Gao, S., Guo, F., Sun, X., Zhang, N., Gong, Y., Xu, L.,** 2017. The inhibitory effects of nesfatin-1 in ventromedial hypothalamus on gastric function and its regulation by nucleus accumbens. *Frontiers in Physiology*, 7:634.
- Garcia-Galiano, D., Navarro, V.M., Gaytan, F., Tena-Sempere, M.,** 2010a. Expanding roles of NUCB2/nesfatin-1 in neuroendocrine regulation. *Journal of Molecular Endocrinology*, 45(5):281–290.
- Garcia-Galiano, D., Navarro, V.M., Roa, J., Ruiz-Pino, F., Sánchez-Garrido, M.A., Pineda, R., Castellano, J.M., Romero, M., Aguilar, E., Gaytán, F., Diéguez, C., Pinilla, L., Tena-Sempere, M.,** 2010b. The anorexigenic neuropeptide, nesfatin-1, is indispensable for normal puberty onset in the female rat. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(23):7783–7792.
- Garcia-Galiano, D., Pineda, R., Ilhan, T., Castellano, J.M., Ruiz-Pino, F., Sánchez-Garrido, M.A., Vazquez, M.J., Sangiao-Alvarellos, S., Romero-Ruiz, A., Pinilla, L., Diéguez, C., Gaytán, F., Tena-Sempere, M.,** 2012. Cellular distribution, regulated expression, and functional role of the anorexigenic peptide, NUCB2/nesfatin-1, in the testis. *Endocrinology*, 153(4):1959–1971.
- Gasparini, S., Stein, L. M., Loewen, S. P., Haddock, C. J., Soo, J., Ferguson, A. V., Kolar, G.R., Yosten, G.L.C., Samson, W.K.,** 2018. Novel regulator of vasopressin secretion: Phoenixin. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 314(4):R623–R628.

- Ge, J.F., Xu, Y.Y., Qin, G., Pan, X.Y., Cheng, J.Q., Chen, F.H., 2015.** Nesfatin-1, a potent anorexic agent, decreases exploration and induces anxiety-like behavior in rats without altering learning or memory. *Brain Research*, 1629:171–181.
- Goebel, M., Stengel, A., Wang, L., Lambrecht, N.W., Taché, Y., 2009.** Nesfatin-1 immunoreactivity in rat brain and spinal cord autonomic nuclei. *Neuroscience Letter*, 452(3):241–246.
- Goebel, M., Stengel, A., Wang, L., Taché, Y., 2011.** Central nesfatin-1 reduces the nocturnal food intake in mice by reducing meal size and increasing inter-meal intervals. *Peptides*, 32(1):36–43.
- Goebel-Stengel, M., Wang, L., Stengel, A., Taché, Y., 2011.** Localization of nesfatin-1 neurons in the mouse brain and functional implication. *Brain Research*, 1396:20–34.
- Golyszny, M., Obuchowicz, E., Zielinski, M., 2022.** Neuropeptides as regulators of the hypothalamus-pituitary-gonadal (HPG) axis activity and their putative roles in stress-induced fertility disorders. *Neuropeptides*, 91:102216.
- Gonzalez, R., Kerbel, B., Chun, A., Unniappan, S., 2010.** Molecular, cellular and physiological evidences for the anorexigenic actions of nesfatin-1 in goldfish. *PLoS one*, 5(12):e15201.
- Gonzalez, R., Perry, R.L., Gao, X., Gaidhu, M.P., Tsushima, R.G., Ceddia, R.B., Unniappan, S., 2011b.** Nutrient responsive nesfatin-1 regulates energy balance and induces glucose-stimulated insulin secretion in rats. *Endocrinology*, 152(10):3628–3637.
- Gonzalez, R., Reingold, B.K., Gao, X., Gaidhu, M.P., Tsushima, R.G., Unniappan, S., 2011a.** Nesfatin-1 exerts a direct, glucose-dependent insulinotropic action on mouse islet beta- and MIN6 cells. *The Journal of Endocrinology*, 208(3):R9–R16.
- Gonzalez-Suarez, A.D., Nitabach, M.N., 2018.** Peptide-Mediated neurotransmission takes center stage. *Trends in Neurosciences*, 41(6):325–327.
- Grimmelikhuijzen, C.J., Hauser, F., 2012.** Mini-review: the evolution of neuropeptide signaling. *Regulatory Peptides*, 177:S6–S9.
- Greenberg, M.J., Price, D.A., 1983.** Invertebrate neuropeptides: native and naturalized. *Annual Review of Physiology*, 45:271–288.
- Guo, F.F., Xu, L., Gao, S.L., Sun, X.R., Li, Z.L., Gong, Y.L., 2015.** The effects of nesfatin-1 in the paraventricular nucleus on gastric motility and its potential regulation by the lateral hypothalamic area in rats. *Journal of Neurochemistry*, 132(3):266–275.

- Güvenç, G., Altınbaş, A., Kaşıkçı, E., Özyurt, E., Bas, A., Udum, D., Niaz, N., Yalçın, M.,** 2019. Contingent role of phoenixin and nesfatin-1 on secretions of the male reproductive hormones. *Andrologia*, 51(11):e13410.
- Haddock, C.J., Almeida-Pereira, G., Stein, L.M., Yosten, G.L.C., Samson, W.K.,** 2020. A novel regulator of thirst behavior: phoenixin. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 318(6):R1027–R1035.
- Hatef, A., Shajan, S., Unniappan, S.,** 2015. Nutrient status modulates the expression of nesfatin-1 encoding nucleobindin 2A and 2B mRNAs in zebrafish gut, liver and brain. *General and Comparative Endocrinology*, 215:51–60.
- Hatef, A., Unniappan, S.,** 2017. Gonadotropin-releasing hormone, kisspeptin, and gonadal steroids directly modulate nucleobindin-2/nesfatin-1 in murine hypothalamic gonadotropin-releasing hormone neurons and gonadotropes. *Biology of Reproduction*, 96(3):635–651.
- Hayashida, K., Bartlett, A.H., Chen, Y., Park, P.W.,** 2010. Molecular and cellular mechanisms of ectodomain shedding. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 293(6):925–937.
- Heidarzadeh, H., Zendehdel, M., Babapour, V., Gilanpour, H.,** 2018. The effect of nesfatin-1 on food intake in neonatal chicks: role of CRF1/CRF2 and H1/ H3 receptors. *Veterinary Research Communications*, 42(1):39–47.
- Hewes, R.S., Taghert, P.H.,** 2001. Neuropeptides and neuropeptide receptors in the *Drosophila melanogaster* genome. *Genome Research*, 11(6):1126–1142.
- Hofmann, T., Weibert, E., Ahnis, A., Elbelt, U., Rose, M., Klapp, B.F., Stengel, A.,** 2017. Phoenixin is negatively associated with anxiety in obese men. *Peptides*, 88:32–36.
- Holden-Dye, L., Walker, R. J.,** 2013. The roles of neuropeptides in *Caenorhabditis elegans* including their importance in the regulation of feeding and metabolism. *Protein and Peptide Letters*, 20(6):636–646.
- Hook, V., Lietz, C., Podvin, S., Cajka, T., Fiehn, O.,** 2018. Diversity of Neuropeptide Cell-Cell Signaling Molecules Generated by Proteolytic Processing Revealed by Neuropeptidomics Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 29(5):807–816.
- Hökfelt, T., Broberger, C., Xu, Z.Q.D., Sergeev, V., Ubink, R., Diez, M.,** 2000. Neuropeptides - an overview. *Neuropharmacology*, 39(8):1337–1356.
- Hökfelt, T., Bartfai, T., Bloom, F.,** 2003. Neuropeptides: opportunities for drug discovery. *Lancet Neurology*, 2(8):463–472.

- Hui, J., Aulakh, G.K., Unniappan, S., Singh, B., 2022.** Localization of nucleobindin2/nesfatin-1-like immunoreactivity in human lungs and neutrophils. *Annals of anatomy*, 239(2022):151774.
- Husson, S.J., Mertens, I., Janssen, T., Lindemans, M., Schoofs, L., 2007.** Neuropeptidergic signaling in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Progress in Neurobiology*, 82(1):33–55.
- Hsu, S.M., Raine, L., Fanger, H., 1981.** Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 29(4):577–580.
- Inturrisi, C.E., 2002.** Clinical pharmacology of opioids for pain. *The Clinical Journal of Pain*, 18(4):3–13.
- Ishida, E., Hashimoto, K., Shimizu, H., Okada, S., Satoh, T., Kato, I., Yamada, M., Mori, M., 2012.** Nesfatin-1 induces the phosphorylation levels of cAMP response element-binding protein for intracellular signaling in a neural cell line. *PLoS One*, 7(12):e50918.
- Iwasaki, Y., Nakabayashi, H., Kakei, M., Shimizu, H., Mori, M., Yada, T., 2009.** Nesfatin-1 evokes Ca^{2+} signaling in isolated vagal afferent neurons via Ca^{2+} influx through N-type channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 390(3):958–962.
- Jékely, G., 2013.** Global view of the evolution and diversity of metazoan neuropeptide signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(21):8702–8707.
- Jiang, J.H., He, Z., Peng, Y.L., Jin, W.D., Mu, J., Xue, H.X., Wang, Z., Chang, M., Wang, R., 2015a.** Effects of Phoenixin-14 on anxiolytic-like behavior in mice. *Behavioural Brain Research*, 286:39–48.
- Jiang, J.H., He, Z., Peng, Y.L., Jin, W.D., Wang, Z., Mu, L.Y., Chang, M., Wang, R., 2015b.** Phoenixin-14 enhances memory and mitigates memory impairment induced by A β 1-42 and scopolamine in mice. *Brain Research*, 1629:298–308.
- Kageyama, H., Takenoya, F., Hirako, S., Wada, N., Kintaka, Y., Inoue, S., Ota, E., Ogawa, T., Shioda, S., 2012.** Neuronal circuits involving neuropeptide Y in hypothalamic arcuate nucleus-mediated feeding regulation. *Neuropeptides*, 46(6):285–289.
- Katz, P.S., Lillvis, J.L., 2014.** Reconciling the deep homology of neuromodulation with the evolution of behavior. *Current Opinion in Neurobiology*, 29:39–47.
- Kim, J., Chung, Y., Kim, H., Im, E., Lee, H., Yang, H., 2014.** The tissue distribution of nesfatin-1/NUCB2 in mouse. *Development & Reproduction*, 18(4):301–309.

- Kim, J., Sun, S., Lee, D., Youk, H., Yang, H., 2019. Gonadotropin regulates NUCB2/nesfatin-1 expression in the mouse ovary and uterus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 513(3):602–607.
- Könczöl, K., Bodnar, I., Zelena, D., Pintér, O., Papp, R.S., Palkovits, M., Nagy, G.M., Tóth, Z.E., 2010. Nesfatin-1/NUCB2 may participate in the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats. *Neurochemistry International*, 57(3):189–197.
- Könczöl, K., Pinter, O., Ferenczi, S., Varga, J., Kovács, K., Palkovits, M., Zelena, D., Tóth, Z.E., 2012. Nesfatin-1 exerts long-term effect on food intake and body temperature. *International journal of obesity: Journal of The International Association for the Study of Obesity*, 36(12):1514–1521.
- Kuksis, M., Ferguson, A.V., 2014. Cellular actions of nesfatin-1 in the subfornical organ. *Journal of Neuroendocrinology*, 26(4):237–246.
- Kulinska, K.I., Andrusiewicz, M., Dera-Szymanowska, A., Billert, M., Skrzypski, M., Szymanowski, K., 2021. Phoenixin as a new target in the development of strategies for endometriosis diagnosis and treatment. *Biomedicines*, 9(10):1427.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J.P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, Y., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J. C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R.H., Wilson, R.K., Hillier, L.W., McPherson, J.D., Marra, M.A., Mardis, E. R., Fulton, L. A., Chinwalla, A. T., Pepin, K. H., Gish, W. R., Chissole, S.L., Wendl, M.C., Delehaunty, K.D., Miner, T.L., Delehaunty, A., Kramer, J.B., Cook, L. L., Fulton, R.S., Johnson, D.L., Minx, P.J., Clifton, S.W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J.F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R.A., Muzny, D.M., Scherer, S.E., Bouck, J.B., Sodergren, E.J., Worley, K.C., Rives, C.M., Gorrell, J.H., Metzker, M.L., Naylor, S.L., Kucherlapati, R.S., Nelson, D.L., Weinstock, G.M., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D.R., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H.M., Dubois, J., Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R.W., Federspiel, N.A., Abola, A.P., Proctor, M.J., Myers, R.M., Schmutz, J., Dickson, M.,

- Grimwood, J., Cox, D.R., Olson, M.V., Kaul, R., Raymond, C., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G.A., Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B.A., Chen, F., Pan, H., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W.R., de la Bastide, M., Dedhia, N., Blöcker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J.A., Bateman, A., Batzoglu, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D.G., Burge, C.B., Cerutti, L., Chen, H.C., Church, D., Clamp, M., Copley, R.R., Doerks, T., Eddy, S.R., Eichler, E.E., Furey, T.S., Galagan, J., Gilbert, J.G., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L.S., Jones, T.A., Kasif, S., Kasprzyk, A., Kennedy, S., Kent, W.J., Kitts, P., Koonin, E.V., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T.M., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J.V., Mulder, N., Pollara, V.J., Ponting, C.P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A.F., Stupka, E., Szustakowki, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y.I., Wolfe, K.H., Yang, S.P., Yeh, R.F., Collins, F., Guyer, M.S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K.A., Patrinos, A., Morgan, M.J., de Jong, P., Catanese, J.J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S., Chen, Y.J., Szustakowki, J., (International Human Genome Sequencing Consortium), 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822):860–921.
- Lents, C.A., Barb, C.R., Hausman, G.J., Nonneman, D., Heidorn, N.L., Cisse, R.S., Azain, M.J., 2013. Effects of nesfatin-1 on food intake and LH secretion in prepubertal gilts and genomic association of the porcine NUCB2 gene with growth traits. *Domestic Animal Endocrinology*, 45(2):89–97.
- Li, Z.L., Xu, L., Sun, X.R., Guo, F.F., Gong, Y.L., Gao, S.L., 2013a. Central nesfatin-1 influences the excitability of ghrelin-responsive gastric distension neurons in the arcuate nucleus and reduces gastric motility in rats. *The European Journal of Neuroscience*, 38(11):3636–3643.
- Li, Z., Gao, L., Tang, H., Yin, Y., Xiang, X., Li, Y., Zhao, J., Mulholland, M., Zhang, W., 2013b. Peripheral effects of nesfatin-1 on glucose homeostasis. *PLoS One*, 8(8):e71513.
- Liang, H., Zhao, Q., Lv, S., Ji, X., 2022. Regulation and physiological functions of phoenixin. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9:956500.
- Lindemans, M., Liu, F., Janssen, T., Husson, S. J., Mertens, I., Gade, G., Schoofs, L., 2009. Adipokinetic hormone signaling through the gonadotropin-releasing hormone receptor modulates egg-laying in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(5):1642–1647.
- Lindemans, M., Janssen, T., Beets, I., Temmerman, L., Meelkop, E., Schoofs, L., 2011. Gonadotropin-releasing hormone and adipokinetic hormone signaling systems share a common evolutionary origin. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 2:16.
- Ludwig, M., Leng, G., 2006. Dendritic peptide release and peptide-dependent behaviours. *Nature Reviews Neuroscience*, 7:126–136.

- Luo, J.J., Wen, F.J., Qiu, D., Wang, S.Z.,** 2021. Nesfatin-1 in lipid metabolism and lipid-related diseases. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 522:23–30.
- Lyu, R.M., Huang, X.F., Zhang, Y., Dun, S.L., Luo, J.J., Chang, J. K., Dun, N.J.,** 2013. Phoenixin: a novel peptide in rodent sensory ganglia. *Neuroscience*, 250:622–631.
- Lyu, R.M., Cowan, A., Zhang, Y., Chen, Y.H., Dun, S.L., Chang, J.K., Dun, N.J., Luo, J.J.,** 2018. Phoenixin: a novel brain-gut-skin peptide with multiple bioactivity. *Acta Pharmacologica Sinica*, 39(5):770–773.
- Ma, H., Su, D., Wang, Q., Chong, Z., Zhu, Q., He, W., Wang, W.,** 2020. Phoenixin 14 inhibits ischemia/reperfusion-induced cytotoxicity in microglia. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 689:108411.
- Marder, E., Goeritz, M.L., Otopalik, A.G.,** 2015. Robust circuit rhythms in small circuits arise from variable circuit components and mechanisms. *Current Opinion in Neurobiology*, 31:156–163.
- Nusbaum, M.P., Blitz, D.M., Marder, E.,** 2017. Functional consequences of neuropeptide and small-molecule co-transmission. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(7):389–403.
- Matsumoto, M., Saito, T., Takasaki, J., Kamohara, M., Sugimoto, T., Kobayashi, M., Tadokoro, M., Matsumoto, S.I., Ohishi, T., Furuichi, K.,** 2000. An evolutionarily conserved G-protein coupled receptor family, SREB, expressed in the central nervous system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 272(2):576–582.
- McIlwraith, E.K., Belsham, D.D.,** 2018. Phoenixin: uncovering its receptor, signaling and functions. *Acta Pharmacologica Sinica*. 39(5):774–778.
- McIlwraith, E.K., Loganathan, N., Belsham, D.D.,** 2018. Phoenixin expression is regulated by the fatty acids palmitate, docosahexaenoic acid and oleate, and the endocrine disrupting chemical bisphenol a in immortalized hypothalamic neurons. *Frontiers in Neuroscience*, 12:838.
- McIlwraith, E.K., Loganathan, N., Belsham, D.D.,** 2019. Regulation of Gpr173 expression, a putative phoenixin receptor, by saturated fatty acid palmitate and endocrine-disrupting chemical bisphenol a through a p38-mediated mechanism in immortalized hypothalamic neurons. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 485:54–60.
- McIlwraith, E.K., Zhang, N., Belsham, D.D.,** 2022. The regulation of phoenixin: a fascinating multidimensional peptide. *Journal of the Endocrine Society*, 6:1–7.

- Meeusen, T., Mertens, I., De Loof, A., Schoofs, L.,** 2003. G protein-coupled receptors in invertebrates: a state of the art. *International Review of Cytology*, 230:189–261.
- Meleine, M., Melchior, C., Prinz, P., Penfornis, A., Coffin, B., Stengel, A., Ducrotté, P., Gourcerol, G.,** 2017. Gastrointestinal peptides during chronic gastric electrical stimulation in patients with intractable vomiting. *Neuromodulation*, 20(8):774–782.
- Merali, Z., Cayer, C., Kent, P., Anisman, H.,** 2008. Nesfatin-1 increases anxiety- and fear-related behaviors in the rat. *Psychopharmacology*, 201(1):115–123.
- Meriney, S.D., Fanselow, E.E.,** 2019. Neuropeptide transmitters. In *Synaptic Transmission*, pp. 421-434, eds. Meriney, S.D., Fanselow, E.E., Academic Press.
- Millar, R.P., Newton, C.L.,** 2013. Current and future applications of GnRH, kisspeptin and neurokinin B analogues. *Nature Reviews Endocrinology*, 9(8):451–466.
- Mohan, H., Unniappan, S.,** 2012. Ontogenic pattern of nucleobindin-2/nesfatin-1 expression in the gastroenteropancreatic tissues and serum of sprague dawley rats. *Regulatory Peptides*, 175(1-3):61–69.
- Mortazavi, S., Gonzalez, R., Ceddia, R., Unniappan, S.,** 2015. Long-term infusion of nesfatin-1 causes a sustained regulation of whole-body energy homeostasis of male Fischer 344 rats. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 3:22.
- Morton, K.A., Hargreaves, L., Mortazavi, S., Weber, L.P., Blanco, A.M., Unniappan, S.,** 2018. Tissue-specific expression and circulating concentrations of nesfatin-1 in domestic animals. *Domestic Animal Endocrinology*, 65:56–66.
- Mukherjee, K., Unniappan, S.,** 2021. Mouse gastric mucosal endocrine cells are sources and sites of action of phoenixin-20. *Peptides*, 141:170551.
- Nachman, R.J., Holman, G.M., Haddon, W.F., Ling, N.,** 1986. Leucosulfakinin, a sulfated insect neuropeptide with homology to gastrin and cholecystokinin. *Science*, 234(4772):71–73.
- Nadim, F., Bucher, D.,** 2014. Neuromodulation of neurons and synapses. *Current Opinion in Neurobiology*, 29:48–56.
- Nassel, D.R.,** 2009. Neuropeptide signaling near and far: how localized and timed is the action of neuropeptides in brain circuits? *Invertebrate Neuroscience*, 9(2):57–75.
- Nguyen, X.P., Nakamura, T., Osuka, S., Bayasula, B., Nakanishi, N., Kasahara, Y., Muraoka, A., Hayashi, S., Nagai, T., Murase, T., Goto, M., Iwase, A., Kikkawa, F.,** 2019. Effect of the neuropeptide phoenixin and its receptor GPR173 during folliculogenesis. *Reproduction*, 158(1):25–34.
- Oh-I, S., Shimizu, H., Satoh, T., Okada, S., Adachi, S., Inoue, K., Eguchi, H., Yamamoto, M., Imaki, T., Hashimoto, K., Tsuchiya, T., Monden, T., Horiguchi,**

- K., Yamada, M., Mori, M.,** 2006. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature*, 443(7112):709–712.
- Palasz, A., Krzystanek, M., Worthington, J., Czajkowska, B., Kostro, K., Wiaderkiewicz, R., Bajor, G.,** 2012. Nesfatin-1, a unique regulatory neuropeptide of the brain. *Neuropeptides*, 46(3):105–112.
- Palasz, A., Rojczyk, E., Bogus, K., Worthington, J.J., Wiaderkiewicz, R.,** 2015. The novel neuropeptide phoenixin is highly co-expressed with nesfatin-1 in the rat hypothalamus, an immunohistochemical study. *Neuroscience Letters*, 592:17–21.
- Palasz, A., Janas-Kozik, M., Borrow, A., Arias-Carrion, O., Worthington, J.J.,** 2018. The potential role of the novel hypothalamic neuropeptides nesfatin-1, phoenixin, spexin and kisspeptin in the pathogenesis of anxiety and anorexia nervosa. *Neurochemistry International*, 113:120–136.
- Park, Y., Kim, Y.-J., Adams, M.E.,** 2002. Identification of G protein-coupled receptors for Drosophila PRXamide peptides, CCAP, corazonin, and AKH supports a theory of ligand-receptor coevolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(17):11423–11428.
- Podvin, S., Yaksh, T., Hook, V.,** 2016. The emerging role of spinal dynorphin in chronic pain: a therapeutic perspective. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 56:511–533.
- Price, D.A., Greenberg, M.J.,** 1977. Structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide. *Science*, 197(4304):670–671.
- Prinz, P., Goebel-Stengel, M., Teuffel, P., Rose, M., Klapp, B.F., Stengel, A.,** 2016. Peripheral and central localization of the nesfatin-1 receptor using autoradiography in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 470(3):521–527.
- Prinz, P., Stengel, A.,** 2016. Expression and regulation of peripheral NUCB2/nesfatin1. *Current Opinion in Pharmacology*, 31:25–30.
- Prinz, P., Scharner, S., Friedrich, T., Schalla, M., Goebel-Stengel, M., Rose, M., Stengel, A.,** 2017. Central and peripheral expression sites of phoenixin-14 immunoreactivity in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 493(1):195–201.
- Prinz, P., Stengel, A.,** 2017. Control of food intake by gastrointestinal peptides: mechanisms of action and possible modulation in the treatment of obesity. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 23(2):180–196.
- Proux, J.P., Miller, C.A., Li, J.P., Carney, R.L., Girardie, A., Delaage, M., Schooley, D.A.,** 1987. Identification of an arginine vasopressin-like diuretic hormone from *Locusta migratoria*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 149(1):180–186.

- Raddant, A.C., Russo A.F.,** 2011. Calcitonin gene-related peptide in migraine: intersection of peripheral inflammation and central modulation. *Expert Reviews in Molecular Medicine*,13:e36.
- Rajeswari, J.J., Vélez, E.J., Unniappan, S.,** 2022. Liver and muscle-specific effects of phoenixin-20 on the insulin-like growth factor system mRNAs in zebrafish. *Growth hormone & IGF research :official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society*, 63:101456.
- Rajeswari, J.J., Unniappan, S.,** 2020. Phoenixin-20 Stimulates mRNAs Encoding Hypothalamo-Pituitary-Gonadal Hormones, is Pro-Vitellogenic, and Promotes Oocyte Maturation in Zebrafish. *Scientific Reports*, 10:6264.
- Riva, M., Nitert, M.D., Voss, U., Sathanoori, R., Lindqvist, A., Ling, C., Wierup, N.,** 2011. Nesfatin-1 stimulates glucagon and insulin secretion and beta cell NUCB2 is reduced in human type 2 diabetic subjects. *Cell and Tissue Research*, 346(3):393–405.
- Russo, A.F.,** 2017. Overview of neuropeptides: awakening the senses? *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 57(2):37–46.
- Rybska, M., Billert, M., Skrzypski, M., Kubiak, M., Woźna-Wysocka, M., Łukomska, A., Nowak, T., Błaszczuk-Cichoszewska, J., Pomorska-Mól, M., Wąsowska, B.,** 2022. Canine cystic endometrial hyperplasia and pyometra may downregulate neuropeptide phoenixin and GPR173 receptor expression. *Animal Reproduction Science*, 238:106931.
- Şahin, I., Aydın, S.,** 2013. Serum concentration and kidney expression of salusin- α and salusin- β in rats with metabolic syndrome induced by fructose. *Biotechnic & Histochemistry: Official Publication of The Biological Stain Commission*, 88(3-4):153–160.
- Samson, W.K., White, M.M., Price, C., Ferguson, A.V.,** 2007. Obestatin acts in brain to inhibit thirst. *AJP Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 292(1):R637–R643.
- Schalla, M., Prinz, P., Friedrich, T., Scharner, S., Kobelt, P., Goebel-Stengel, M., Rose, M., Stengel, A.,** 2017. Phoenixin-14 injected intracerebroventricularly but not intraperitoneally stimulates food intake in rats. *Peptides*, 96:53–60.
- Schalla, M.A., Stengel, A.,** 2018. Phoenixin-a pleiotropic gut-brain peptide. *International Journal of Molecular Science*, 19:1726.
- Schalla, M.A., Goebel-Stengel, M., Friedrich, T., Kühne, S. G., Kobelt, P., Rose, M., Stengel, A.,** 2020. Restraint stress affects circulating NUCB2/nesfatin-1 and phoenixin levels in male rats. *Psychoneuroendocrinology*, 122:104906.
- Schalla, M.A., Stengel, A.,** 2021. The role of the gastric hormones ghrelin and nesfatin-1 in reproduction. *International Journal of Molecular Science*, 22(20):11059.

- Schoofs, L., Loof, A.D., Hiel, M.B.V., 2017.** Neuropeptides as regulators of behavior in insects. *Annual Review of Entomology*, 62:35–52.
- Sedbazar, U., Ayush, E.A., Maejima, Y., Yada, T., 2014.** Neuropeptide Y and α -melanocyte-stimulating hormone reciprocally regulate nesfatin-1 neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Neuroreport*, 25(18):1453–1458.
- Shimizu, H., Oh-I, S., Hashimoto, K., Nakata, M., Yamamoto, S., Yoshida, N., Eguchi, H., Kato, I., Inoue, K., Satoh, T., Okada, S., Yamada, M., Yada, T., Mori, M., 2009.** Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: the leptin-independent mechanism. *Endocrinology*, 150(2): 662–671.
- Smith, S.J., Sümbül, U., Graybuck, L.T., Collman, F., Seshamani, S., Gala, R., Gliko, O., Elabbady, L., Miller, J.A., Bakken, T.E., Rossier, J., Yao, Z., Lein, E., Zeng, H., Tasic, B., Hawrylycz, M., 2019.** Single-cell transcriptomic evidence for dense intracortical neuropeptide networks. *eLife*, 8:e47889.
- Smith, S.J., Hawrylycz, M., Rossier, J., Sümbül, U., 2020.** New light on cortical neuropeptides and synaptic network plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, 63:176–188.
- Staubli, F., Jørgensen, T.J.D., Cazzamali, G., Williamson, M., Lenz, C., Søndergaard, L., Roepstorff, P., Grimmlikhuijzen, C.J.P., 2002.** Molecular identification of the insect adipokinetic hormone receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(6):3446–3451.
- Stein, L.M., Tullock, C.W., Mathews, S.K., Garcia-Galiano, D., Elias, C.F., Samson, W.K., Yosten, G.L., 2016.** Hypothalamic action of phoenixin to control reproductive hormone secretion in females: importance of the orphan G protein-coupled receptor Gpr173. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 311(3):R489–R496.
- Steiner, R.A., Hohmann, J.G., Holmes, A., Wrenn, C.C., Cadd, G., Juréus, A., Clifton, D.K., Luo, M., Gutshall, M., Ma, S.Y., Mufson, E.J., Crawley, J.N., 2001.** Galanin transgenic mice display cognitive and neurochemical deficits characteristic of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(7):4184–4189.
- Stengel, A., 2015.** Nesfatin-1-More than a food intake regulatory peptide. *Peptides*, 72:175–183.
- Stengel, A., Goebel, M., Yakubov, I., Wang, L., Witcher, D., Coskun, T., Taché, Y., Sachs, G., Lambrecht, N.W., 2009a.** Identification and characterization of nesfatin-1 immunoreactivity in endocrine cell types of the rat gastric oxyntic mucosa. *Endocrinology*, 150(1): 232–238.
- Stengel, A., Goebel, M., Wang, L., Rivier, J., Kobelt, P., Mönnikes, H., Lambrecht, N.W., Taché, Y., 2009b.** Central nesfatin-1 reduces dark-phase food intake and

gastric emptying in rats: differential role of corticotropin-releasing factor2 receptor. *Endocrinology*, 150(11):4911–4919.

- Stengel, A., Hofmann, T., Goebel-Stengel, M., Lembke, V., Ahnis, A., Elbelt, U., Lambrecht, N.W., Ordemann, J., Klapp, B.F., Kobelt, P.,** 2013. Ghrelin and NUCB2/nesfatin-1 are expressed in the same gastric cell and differentially correlated with body mass index in obese subjects. *Histochemistry and Cell Biology*, 139(6):909–918.
- Stengel A., Taché Y.,** 2010. Nesfatin-1 role as possible new potent regulator of food intake. *Regulatory Peptides*, 163(1-3):18–23.
- Stone, J. V., Mordue, W., Batley, K. E., Morris, H. R.,** 1976. Structure of locust adipokinetic hormone, a neurohormone that regulates lipid utilisation during flight. *Nature*, 263(5574):207–211.
- Sun, G., Ren, Q., Bai, L., Zhang, L.,** 2020. Phoenixin-20 suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation in dental pulp cells. *Chemico-Biological Interactions*, 318:108971.
- Syrovatkina, V., Alegre, K.O., Dey, R., Huang, X.Y.,** 2016. Regulation, signaling, and physiological functions of G-proteins. *Journal of Molecular Biology*, 428(19):3850–3868.
- Suvarna, K., Layton, C., Bancroft, J.,** 2018. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. 8th Edition, Amsterdam, Elsevier Health Sciences.
- Taghert, P.H., Nitabach, M.N.,** 2012. Peptide neuromodulation in invertebrate model systems. *Neuron*, 76(1):82–97.
- Telegdy, G., Tanaka, M., Schally, A. V.,** 2009. Effects of the LHRH antagonist Cetrorelix on the brain function in mice. *Neuropeptides*, 43(3):229–234.
- Ter Horst, G.J., de Boer, P., Luiten, P.G., van Willigen, J.D.,** 1989. Ascending projections from the solitary tract nucleus to the hypothalamus. A Phaseolus vulgaris lectin tracing study in the rat. *Neuroscience*, 31(3):785–797.
- Tordoff, M.G.,** 2001. Calcium: taste, intake, and appetite. *Physiological Review*, 81(4):1567–1597.
- Treen, A.K., Luo, V., Belsham, D.D.,** 2016. Phoenixin activates immortalized GnRH and kisspeptin neurons through the novel receptor GPR173. *Molecular Endocrinology*, 30(8):872–888.
- Umathe, S.N., Bhutada, P.S., Jain, N.S., Shukla, N.R., Mundhada, Y.R., Dixit, P.V.,** 2008. Gonadotropin-releasing hormone agonist blocks anxiogenic-like and depressant-like effect of corticotrophin-releasing hormone in mice. *Neuropeptides*, 42(4):399–410.

- Valsamakis, G., Arapaki, A., Balafoutas, D., Charmandari, E., Vlahos, N.F., 2021.** Diet-induced hypothalamic inflammation, phoenixin, and subsequent precocious puberty. *Nutrients*, 13(10):3460.
- Vanden Broeck, J., 2001.** Neuropeptides and their precursors in the fruitfly, *Drosophila melanogaster*. *Peptides*, 22(2):241–254.
- van den Pol, A.N., 2012.** Neuropeptide transmission in brain circuits. *Neuron*, 76(1):98–115.
- Varoqueaux, F., Fasshauer, D., 2017.** Getting nervous: an evolutionary overhaul for communication. *Annual Review of Genetics*, 51:455–476.
- Vassilatis, D.K., Hohmann, J.G., Zeng, H., Li, F., Ranchalis, J.E., Mortrud, M.T., Brown, A., Rodriguez, S.S., Weller, J.R., Wright, A.C. Bergmann, J.E., Gaitanaris, G.A., 2003.** The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(8):4903–4908.
- Vermetten, E., Bremner, J.D., 2002.** Circuits and systems in stress. I. Preclinical studies. *Depress. Anxiety*, 15(3):126–147.
- Vesce, S., Rossi, D., Brambilla, L., Volterra, A., 2007.** Glutamate release from astrocytes in physiological conditions and in neurodegenerative disorders characterized by neuroinflammation. *International Review of Neurobiology*, 82:57–71.
- Wang, Q., Guo, F., Sun, X., Gao, S., Li, Z., Gong, Y., Xu, L., 2014.** Effects of exogenous nesfatin-1 on gastric distensionsensitive neurons in the central nucleus of the amygdala and gastric motility in rats. *Neuroscience Letters*, 582:65–70.
- Wang, Y., Wang, M., Yin, S., Jang, R., Wang, J., Xue, Z., Xu, T., 2015.** NeuroPep: a comprehensive resource of neuropeptides. *Database*, 2015:bav038.
- Wang, Y., Li, Z., Zhang, X., Xiang, X., Li, Y., Mulholland, M.W., Zhang, W., 2016.** Nesfatin-1 promotes brown adipocyte phenotype. *Scientific Reports*, 6:34747.
- Wang, M., Deng, S.P., Chen, H.P., Jiang, D.N., Tian, C.X., Yang, W., Wu, T.L., Zhu, C.H., Zhang, Y., Li, G.L., 2018.** Phoenixin participated in regulation of food intake and growth in spotted scat, *Scatophagus argus*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 226:36–44.
- Wang, J., Zheng, B., Yang, S., Tang, X., Wang, J., Wei, D., 2020.** The protective effects of phoenixin-14 against lipopolysaccharide-induced inflammation and inflammasome activation in astrocytes. *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society*, 69(8):779–787.
- Watanabe, A., Mochiki, E., Kimura, A., Kogure, N., Yanai, M., Ogawa, A., Toyomasu, Y., Ogata, K., Ohno, T., Suzuki, H., Kuwano, H., 2015.** Nesfatin-1

suppresses gastric contractions and inhibits interdigestive migrating contractions in conscious dogs. *Digestive Diseases and Sciences*, 60(6):1595–1602.

Weis, W.I., Kobilka, B.K., 2018. The molecular basis of G protein-coupled receptor activation. *Annual Review of Biochemistry*, 87:897–919.

Xavier da Silveira Dos Santos, A., Liberali, P., 2019. From single cells to tissue self-organization. *Federation of European Biochemical Societies*, 286(8):1495–1513.

Xia, Z.F., Fritze, D.M., Li, J.Y., Chai, B., Zhang, C., Zhang, W., Mulholland, M.W., 2012. Nesfatin-1 inhibits gastric acid secretion via a central vagal mechanism in rats. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 303(5):G570–G577.

Xu, L., Wang, Q., Guo, F., Pang, M., Sun, X., Gao, S., Gong, Y., 2015. Nesfatin-1 signaling in the basomedial amygdala modulates the gastric distension-sensitive neurons discharge and decreases gastric motility via melanocortin 3/4 receptors and modified by the arcuate nucleus. *European Journal of Pharmacology*, 764: 164–172.

Xu, L., Wang, H., Gong, Y., Pang, M., Sun, X., Guo, F., Gao, S., 2017. Nesfatin-1 regulates the lateral hypothalamic area melanin-concentrating hormone-responsive gastric distension-sensitive neurons and gastric function via arcuate nucleus innervation. *Metabolism*, 67:14–25.

Yamada, M., Horiguchi, K., Umezawa, R., Hashimoto, K., Satoh, T., Ozawa, A., Shibusawa, N., Monden, T., Okada, S., Shimizu, H., Mori, M., 2010. Troglitazone, a ligand of peroxisome proliferator-activated receptor, stabilizes NUCB2 (Nesfatin) mRNA by activating the ERK1/2 pathway: isolation and characterization of the human NUCB2 gene. *Endocrinology*, 151(6):2494–2503.

Yang, F., Huang, P., Shi, L., Liu, F., Tang, A., Xu, S., 2020. Phoenixin 14 inhibits high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in experimental mice. *Drug Design, Development and Therapy*, 14:3865–3874.

Yao, B., Lv, J., Du, L., Zhang, H., Xu, Z., 2021. Phoenixin-14 protects cardiac damages in a streptozotocin-induced diabetes mice model through SIRT3. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 1–9.

Yin, Y., Li, Z., Gao, L., Li, Y., Zhao, J., Zhang, W., 2015. AMPK-dependent modulation of hepatic lipid metabolism by nesfatin-1. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 417: 20–26.

Yoshida, N., Maejima, Y., Sedbazar, U., Ando, A., Kurita, H., Damdindorj, B., Takano, E., Gantulga, D., Iwasaki, Y., Kurashina, T., Onaka, T., Dezaki, K., Nakata, M., Mori, M., Yada, T., 2010. Stressor-responsive central nesfatin-1 activates corticotropin-releasing hormone, noradrenaline and serotonin neurons and evokes hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Aging (Albany NY)*, 2(11):775–784.

- Yoshimura, M., Matsuura, T., Ohkubo, J., Maruyama, T., Ishikura, T., Hashimoto, H., Kakuma, T., Mori, M., Ueta, Y.,** 2014. A role of nesfatin-1/ NucB2 in dehydration-induced anorexia. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 307(2):R225–R236.
- Yosten, G.L., Samson, W.K.,** 2009. Nesfatin-1 exerts cardiovascular actions in brain: possible interaction with the central melanocortin system. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 297(2):R330–R336.
- Yosten, G.L., Redlinger, L., Samson, W.K.,** 2012. Evidence for a role of endogenous nesfatin-1 in the control of water drinking. *Journal of Neuroendocrinology*, 24(7):1078–1084.
- Yosten, G.L.C., Lyu, R.M., Hsueh, A.J.W., Avsian-Kretchmer, O., Chang, J.K., Tullock, C.W., Dun, S.L., Dun, N., Samson, W.K.,** 2013. A novel reproductive peptide, phoenixin. *Journal of Neuroendocrinology*, 25(2):206–215.
- Young, K.A., Gobrogge, K.L., Liu, Y., Wang, Z.,** 2011. The neurobiology of pair bonding: insights from a socially monogamous rodent. *Frontiers of Neuroendocrinology*, 32(1):53–69.
- Yürüyen, M., Gültekin, G., Batun, G.C., Yavuzer, H., Akcan, F.E., Döventaş, A., Emul, M.,** 2017. Does plasma phoenixin level associate with cognition? Comparison between subjective memory complaint, mild cognitive impairment, and mild Alzheimer's disease. *International Psychogeriatrics*, 29:1543–1550.
- Zandeh-Rahimi, Y., Panahi, N., Hesaraki, S., and Shirazi-Beheshtiha, S.H.,** 2022. Protective effects of phoenixin-14 peptide in the indomethacin-induced duodenal ulcer: An experimental study. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 28(1):43.
- Zhang, X., Firestein, S.,** 2002. The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. *Nature Neuroscience*, 5(2):124–133.
- Zhang, B., Li, J.,** 2020. Phoenixin-14 protects human brain vascular endothelial cells against oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R)-induced inflammation and permeability. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 682:108275.