

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

STRESE BAĞLI BOZULAN MİDE MOTİLİTESİNDE
SANTRAL OREKSİN-A’NIN ROLÜ

Osman SİNEN

YÜKSEK LİSANS

2016-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

STRESE BAĞLI BOZULAN MİDE MOTİLİTESİNDE
SANTRAL OREKSİN-A’NIN ROLÜ

Osman SİNEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Mehmet BÜLBÜL

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2015-637 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2016-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Fizyoloji Anabilim Dalı, Fizyoloji programında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 23/12/2016

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Mehmet Bülbül
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Aysel AĞAR
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Nimet UYSAL
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Ümit Kemal ŞENTÜRK
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Vural Küçükataş
Pamukkale Üniversitesi

İmza

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun 05/01/2017 tarih ve 1/12 sayılı kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Narin DERİN
Akdeniz Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Öğrenci

Osman SİNEN

İmza



Tez Danışmanı

Doç. Dr. Mehmet Bülbül

İmza

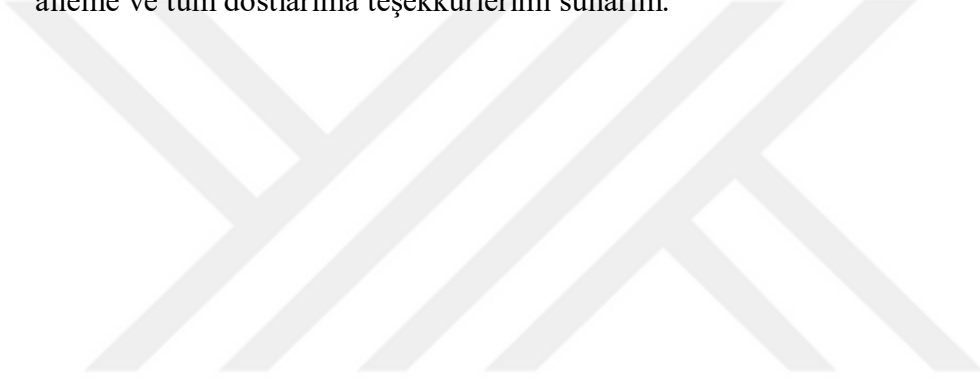


TEŐEKKÖR

Yüksek lisans eğitimin boyunca benden hiçbir yardım ve desteği esirgemeyen, sürekli bana destek olan, birlikte çalışmaktan onur ve gurur duyduğum, çalışmanın esas mimari olan saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. Mehmet Bülbül'e;

Enstitümüzün değerli yönetici ve personeline;

Bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan, maddi manevi hiçbir desteği esirgemeyen aileme ve tüm dostlarıma teşekkürlerimi sunarım.



ÖZET

Amaç: Stresin fonksiyonel gastrointestinal bozukluklarda rol aldığı bilinmektedir. Sıçanlarda akut hareket kısıtlama stresinin (HKS), CRF ve periferik otonomik yollar aracılığıyla mide dismotilitesine neden olduğu gösterilmiştir. Hipotalamik ekstraktlardan izole edilen oreksinler G-protein bağlı reseptörleri aracılığı ile etki gösteren nöropeptidler olarak tanımlanmışlardır. Oreksin-A'nın (OXA) santral sinir sisteminde stres durumunda üretiminin arttığı gösterilmiş olup, OXA'nın midenin motor fonksiyonları üzerine N.vagus'un dorsal motor nükleusunda üretilen oreksin tip-1 reseptörü (OX1R) aracılığıyla etki ettiğini gösteren bulgular mevcuttur. Ayrıca lateral hipotalamik alan (LHA)'daki oreksinerjik hücrelerden köken alan sinir liflerinin paraventriküler nükleus (PVN)'da yoğun projeksiyon gösterdiği ve CRF reseptörlerinin LHA'daki oreksinerjik nöronlar üzerinde bulunduğu bilinmektedir. Çalışmamız, strese bağlı bozulan mide motilitesinde santral endojen OXA rolünü araştırmak üzere planlanmıştır. **Yöntem:** Stres ve normal şartlar altındaki hipotalamik OXA ve CRF üretimi mikrodializ çalışması ile belirlenmiştir. Katı mide boşalımı ve gastrik postprandial motilite kaydı stres öncesi verilen OXA ve CRF reseptör antagonistleri ile değerlendirilmiştir. OXA ve CRF immünoaktiviteleri immünohistokimyal yöntemle tespit edilmiştir. **Bulgular:** Bazal seviyelere göre HKS uygulanmış sıçanlarda OXA ve CRF konsantrasyonları artarken, CRF ve OXA reseptör antagonistleri bu değişiklikleri anlamlı olarak azaltmıştır. SB-334867 ve α -helikal CRF_{9,41} uygulaması HKS'ye bağlı yavaşlayan mide boşalımını ve bozulan antro-pilorik postprandial kontraksiyonları anlamlı olarak düzeltirken, antagonistler birlikte uygulandığında ise bu etkinin tamamen ortadan kalktığı tespit edilmiştir. Strese maruziyet LHA ve PVN'deki OXA ve CRF immünoaktivitelerini arttırırken, OXA ve CRF reseptör antagonistlerinin ön uygulamaları strese bağlı bu değişiklikleri anlamlı olarak zayıflatmıştır. **Sonuç:** Akut strese maruziyet sonucu artan endojen OXA, gastrik motor fonksiyonun CRF-aracılı bozulmasına katkıda bulunmaktadır. OXA ve CRF arasındaki etkileşim fonksiyonel gastrointestinal bozuklukların etyopatogenezinin daha iyi anlaşılabilmesine olanak sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: oreksin-A, CRF, stres, mide motilitesi, mikrodializ

ABSTRACT

Objective: Stress plays a major role in the development of functional gastrointestinal disorders. In rats, acute restraint stress (ARS) was shown to induce gastric dysmotility via CRF and peripheral autonomic pathways. Orexins were originally isolated from hypothalamic extracts that have been defined as neuropeptides by acting through their G protein-coupled receptors. The expression of orexin-A (OXA) is increased under stress conditions in central nervous system. Accumulating findings indicate that OXA alters gastric motor functions through its receptor type-1 receptor (OX1R) expressed in dorsal motor nucleus of N.vagus. In addition, it is known that orexinergic cells that reside in lateral hypothalamic area (LHA) have dense projections on paraventricular nucleus (PVN), in addition, CRF receptors are expressed in orexin-producing neurons within LHA. The present study was designed to investigate the role of endogenous central OXA in stress-induced gastric motor dysfunction. **Method:** Microdialysis was performed to determine the hypothalamic production of OXA and CRF (in LHA and PVN, respectively) both under non-stressed and stressed conditions. Solid gastric emptying (GE) and gastric postprandial motility were monitored in rats pretreated with OXA and CRF receptor antagonists prior to the stress. The immunoreactivities for OXA and CRF were detected using immunohistochemistry. **Results:** Compared to their basal levels, OXA and CRF concentrations were increased in ARS-loaded rats, whereas they were significantly attenuated by pretreatment of their receptor antagonists. The administration of SB-334867 and α -helical CRF_{9,41} significantly ameliorated the ARS-induced delayed GE and disturbed antro-pyloric postprandial contractions, however, these changes were completely restored when both antagonists administered together. Stress exposure remarkably increased the immunoreactivity for OXA and CRF in LHA and PVN which were significantly attenuated by the preadministrations of antagonists. **Conclusion:** Following exposure to an acute stressor, central endogenous OXA appears to contribute to the CRF-induced impairment of gastric motor function within hypothalamic neurocircuitry. The interaction between OXA and CRF may lead to better understanding of the etiopathogenesis of functional gastrointestinal disorders.

Key words: orexin-A, CRF, stress, gastric motility, microdialysis

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Oreksin Nöropeptit Ailesi	3
2.2. Oreksinlerin Yapısı	3
2.3. Oreksin Reseptörleri	4
2.4. Oreksin Reseptörlerinin Merkezi Sinir Sistemindeki Dağılımı	6
2.5. Oreksinerjik Sinir Liflerinin Projeksiyonları	7
2.6. Oreksinlerin Fizyolojik Etkileri	8
2.7. Oreksinlerin Gastrointestinal Motor Fonksiyonlara Etkisi	9
2.8. Otonom Sinir Sistemi	10
2.9. Gastrointestinal Sistemin İnnervasyonu	11
2.9.1. Gastrointestinal Sistemin Otonomik İnnervasyonu	13
2.9.2. Gastrointestinal Sistemin Duysal İnnervasyonu	13
2.10. Santral Stres Devresi	14
2.10.1. Stres Yanıtı	15
2.10.2. Strese Karşı Gelişen Endokrin Yanıt	16
2.11. Stres Yanıtı ve Oreksinler	18
2.12. Gastrointestinal Motor Fonksiyonlarda Strese Bağlı Değişiklikler	20
2.13. Strese Bağlı Gastrointestinal Motor Değişikliklerde Oreksinlerin Rolü	23
2.14. Hipotez	23
3. GEREÇ ve YÖNTEM	24
3.1. Deney Grupları	24
3.1.1. Mikrodiyaliz Çalışması	24
3.1.2. Mide Boşalımı Ölçümleri	24

3.1.3. Mide Motilite Çalışması	25
3.1.4. Histolojik Çalışmalar	25
3.2. Mikrodializ Çalışması	26
3.2.1. Cerrahi	26
3.2.2. Mikrodializatların Toplanması	27
3.3. Mide Boşalım Ölçümü	28
3.4. Mide Motilitesi Kaydı	28
3.4.1. Transdüser Hazırlanması	28
3.4.2. Transdüser Yerleştirilmesi	29
3.4.3. Motilite Kaydı	29
3.5. Santral İlaç Uygulamaları	30
3.5.1. İntraserebroventriküler (icv) Kanülasyon	30
3.5.2. İntraserebroventriküler İlaç Uygulamaları	31
3.6. Plazma Kortikosteron Ölçümleri	31
3.7. Mikrodializ Örneklerinde OXA ve CRF Ölçümü	31
3.8. Kan Basıncı Ölçümü	32
3.9. İmmünohistokimya	32
3.9.1. İmmünohistokimya Tekniği İçin Doku Hazırlanması	32
3.9.2. İmmünohistokimya Protokolü	33
3.10. İstatistiksel Analiz	34
4. BULGULAR	35
4.1. Mikrodializ ve İcv Kanülasyon İçin Giriş Koordinatlarının Tespiti	35
4.2. Mikrodializ	36
4.3. Plazma Kortikosteron Seviyeleri	39
4.4. Mide Boşalım	40
4.5. Kan Basıncı Ölçümleri	41
4.6. Mide Motilitesi	42
4.6.1. Bazal Koşullarda Postprandial Mide Motilitesi	42
4.6.2. Stres Koşullarında Postprandial Mide Motilitesi	43
4.6.3. Motilite Kayıtlarının Kantitatif Analizi	46
4.7. İmmünohistokimyasal Değerlendirmeler	48

4.7.1. OXA İmmunoreaktivitesi	48
4.7.2. CRF İmmunoreaktivitesi	50
5. TARTIŞMA	53
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	62
KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ	73



SİMGELER ve KISALTMALAR

ACTH:	Adrenokortikotropik hormon
BN:	Barrington nükleusu
CRF:	Kortikotropin salgılatıcı faktör
DMV:	Vagusun dorsal motor nükleusu
DV:	Dorso-ventral
EMS:	Emosyonel motor sistemi
EPAN:	Ekstrinsik afferent duysal nöronlar
ESS:	Enterik sinir sistemi
FD:	Fonksiyonel dispepsi
FEP:	Florinli etilin propilen
FGID:	Fonksiyonel gastrointestinal hastalıklar
Gİ:	Gastrointestinal
GİS:	Gastrointestinal sistem
HKS:	Hareket kısıtlama stresi
HPA:	Hipotalamik-hipofizer-adrenal
IBS:	İrritabl barsak sendromu
İcv:	İntraserebroventriküler
ML:	Mediyo-lateral
LC:	locus coeruleus
LHA:	Lateral hipotalamik alan
NTS:	Nükleus traktus solitarius
OSS:	Otonom sinir sistemi
OXA:	Oreksin-A
OXB:	Oreksin-B
PVN:	Paraventriküler nükleus
IPAN:	Primer afferent nöronlar
PKC:	Protein kinaz-C
PLC:	Fosfolipaz-C
RK:	Rostro-kaudal
RVLM:	Rostral ventrolateral medulla
SPN:	Sakral parasempatik nükleus

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. OXA ve OXB'nin amino asit dizilimi.	4
Şekil 2.2. Oreksin reseptörlerinin beyindeki dağılımı.	6
Şekil 2.3. Oreksinerjik sinir liflerinin beyindeki projeksiyonları.	7
Şekil 2.4. Oreksin nöronlarının otonomik merkezlere projeksiyonları.	8
Şekil 2.5. Gastrointestinal sistemin innervasyonu.	12
Şekil 2.6. Hipotalamik-hipofizer-adrenal (HPA) eksen.	17
Şekil 2.7. Mide ve kolonik motor fonksiyonların sinirsel kontrolü.	21
Şekil 2.8. Sıçanlarda hareket kısıtlama stresi ve intra-sisternal CRF uygulamasının postprandial antro-pilorik kasılmalara etkisi.	23
Şekil 3.1. Sıçanların 90 dakika boyunca düz bir platforma sabitlenmesi ile oluşturulan hareket kısıtlama stresi (HKS).	26
Şekil 3.2. Mikrodiyaliz için gerçekleştirilen stereotaksik cerrahi.	27
Şekil 3.3. Mikrodiyaliz için kullanılan deneysel düzenek.	28
Şekil 3.4. Strain gage transdüser yapım aşamaları.	29
Şekil 3.5. Transdüser cerrahi işlemi.	29
Şekil 3.6. Serbest hareket eden uyanık sıçanlar için oluşturulan motilite kayıt düzeneği.	30
Şekil 3.7. IMAGEJ yazılım programı ile reaktivite yoğunluk analizi.	34
Şekil 4.1. Deney gruplarında mikrodiyaliz için gerçekleştirilen kanülasyonların dağılımı.	35
Şekil 4.2. İcv kanülasyonun histolojik ve makroskopik doğrulaması.	36
Şekil 4.3. LHA'dan elde edilen mikrodiyalizatlarda ölçülen OXA seviyeleri.	37
Şekil 4.4 PVN'den elde edilen mikrodiyalizatlarda ölçülen CRF seviyeleri.	38
Şekil 4.5. Yüksek konsantrasyonda potasyum klorür (100 mM) içeren aCSF perfüzyonu ile LHA'dan elde edilen mikrodiyalizatlarda ölçülen OXA ve PVN'den elde edilen mikrodiyalizatlarda ölçülen CRF seviyeleri.	39
Şekil 4.6. Plazma örneklerinde ölçülen kortikosteron seviyeleri.	40
Şekil 4.7. Sıçanlarda OX1R antagonisti SB-334867 ve non-selektif CRF antagonisti α -helikal CRF ₉₋₄₁ ön uygulamalarının hareket kısıtlama stresine (HKS) bağlı azalan mide boşalmasına etkisi.	41

Şekil 4.8. Stres uygulanmayan bazal koşullardaki sıçanlarda santral ekzojen CRF ve OXA uygulamasının katı mide boşalımına etkisi.	41
Şekil 4.9. Sıçanlarda santral ekzojen OXA uygulamasının ortalama arteriyal basınca etkisi.	42
Şekil 4.10. Normal koşullarda aCSF, non-selektif CRF antagonisti α -helikal CRF ₉₋₄₁ ve OX1R antagonisti SB-334867 uygulamalarının antro-pilorik postprandial kasılmalara etkisi.	43
Şekil 4.11. Sıçanlarda non-selektif CRF antagonisti α -helikal CRF ₉₋₄₁ ve OX1R antagonisti SB-334867 ön uygulamalarının HKS'ye bağlı değişen antro-pilorik postprandial kasılmalara etkisi.	44
Şekil 4.12. Sıçanlarda non-selektif CRF antagonisti α -helikal CRF ₉₋₄₁ ve OX1R antagonisti SB-334867 ön uygulamalarının hareket kısıtlama stresine (HKS) bağlı bozulan antro-pilorik kasılma koordinasyonuna etkisi.	45
Şekil 4.13. Sıçanlarda OX1R antagonisti SB-334867 ve non-selektif CRF antagonisti α -helikal CRF ₉₋₄₁ ön uygulamalarının hareket kısıtlama stresine (HKS) bağlı artan motilite indeks ve kasılma frekansına etkisi.	46
Şekil 4.14. Sıçanlarda OX1R antagonisti SB-334867 ve non-selektif CRF antagonisti α -helikal CRF ₉₋₄₁ ön uygulamalarının hareket kısıtlama stresine (HKS) bağlı azalan antro-pilorik kontraksiyonların yayılım hızına etkisi.	47
Şekil 4.15. Strese maruz kalmayan bazal koşullardaki sıçanlarda santral ekzojen OXA'nın spontan postprandial antro-pilorik kasılmalara etkisi.	48
Şekil 4.16. LHA'da OXA için gözlenen immunoreaktivite.	48
Şekil 4.17. PVN'de OXA için gözlenen immunoreaktivite.	49
Şekil 4.18. LHA ve PVN'deki hücrel OXA(+) immünoreaktivite yoğunluk yüzdesi.	50
Şekil 4.19. LHA'da CRF için gözlenen immunoreaktivite.	51
Şekil 4.20. PVN'de CRF için gözlenen immunoreaktivite.	51
Şekil 4.21. LHA ve PVN'deki hücrel CRF (+) immünoreaktivite yoğunluk yüzdesi.	52
Şekil 5.1. Bazal ve stres koşullarında OXA'nın mide motilitesine etkileri	59

1. GİRİŞ

Hipotalamik ekstraktların taranması esnasında 1998 yılında keşfedilen oreksin nöropeptit ailesi ilk olarak dorsal ve lateral hipotalamik alanda (LHA) bulunan nöronların hücre gövdelerinde gösterilmiştir (de Lecea ve ark., 1998; Sakurai ve ark., 1998). Oreksin-A (OXA, hipokretin-1) 33, oreksin-B (OXB, hipokretin-2) ise 28 aminoasit içermekte olup, iki peptit de 130 aminoasitlik prepro-oreksin molekülünün enzimatik parçalanması sonucu meydana gelmektedir (Siegel ve ark., 2001; Kirchgessner 2002). Oreksinerjik sinir liflerinin beyinde oreksin reseptörlerinin de üretildiği serebral korteks, talamus, hipotalamus ve beyin sapı gibi alanlara projeksiyonları bulunmaktadır (Peyron ve ark., 1998; Date ve ark., 1999; Mondal ve ark., 1999; Nambu ve ark., 1999). Oreksinlerin OX1R ve OX2R olmak üzere 2 farklı reseptörü tanımlanmıştır. Her iki reseptör de G-protein bağlı reseptörler olup, fizyolojik etkilerini hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu arttırarak göstermektedirler. OX1R'nin OXA'ya afinitesinin OXB'den 100 kat fazla olduğu; OX2R'nin ise her iki oreksin molekülüne eşit afinite gösterdiği tespit edilmiştir (Sakurai 1999; Kirchgessner 2002).

Kemirgenlerde yapılan in-vivo çalışmalarda, gastrointestinal (Gİ) motor fonksiyonların düzenlenmesinde santral OXA'nın rolü olabileceğine dair sonuçlar elde edilmiştir (Kobashi ve ark., 2002; Krowicki ve ark., 2002; Bulbul ve ark., 2010a; Bulbul ve ark., 2010b; Nozu ve ark.,). OX1 reseptörünün N.vagus'un dorsal motor nükleusunda (DMV) yüksek seviyelerde eksprese olduğu ve ayrıca OXA'nın bu bölgeye mikroenjeksiyonunun antral motiliteyi arttırdığı gösterilmiştir (Krowicki ve ark., 2002). Bu bulgulara paralel olarak intrasisternal OXA uygulamasının N. vagus aracılığıyla proksimal midede gevşeme, distal midede ise kontraksiyona sebep olduğu tespit edilmiştir (Kobashi ve ark., 2002). Bu sonuçlar, santral OXA'nın Gİ motor fonksiyonlar üzerine vagal kolinerjik yollar üzerinden etki ettiğini düşündürmektedir.

Stres başta endokrin sistem ve sinir sistemini etkileyerek vücudun biyoritminde ve davranışlarda değişikliklere yol açmaktadır. Gastrointestinal sistem (GİS) stres maruziyetinden erken dönemde etkilenen sistemlerin başında gelmekle birlikte, stres sonucu motilite, sekresyon ve koruyucu mukozal bariyer fonksiyonlarında olumsuz yönde değişimler gözlenir. Bu değişiklikler hipotalamik-hipofizer-adrenal (HPA) eksenini

oluşturan nöroendokrin sistemin yanı sıra otonom sinir sistemi (OSS) ve immün sistemin etkileşimi aracılığıyla meydana gelir (Lenz ve ark., 1988b; Yabana ve Yachi 1988; Bhatia ve Tandon 2005; Konturek ve ark., 2011). Stresin neden olduğu GI motor değişikliklerde paraventriküler nükleus (PVN)'da artan kortikotropin salgılatıcı faktör (CRF)'ün rolü ortaya konmuştur (Kalin ve ark., 1994; Imaki ve ark., 1998). GİS'de strese karşı gelişen en belirgin motor yanıt mide boşalımının gecikmesidir. Strese bağlı gelişen mide dismotilitesinde CRF2 reseptörü ve sempatik sinir sisteminin rol aldığı bilinmektedir (Lenz ve ark., 1988a; Nakade ve ark., 2005; Nakade ve ark., 2006).

Hipotalamik PVN hücrelerinde oreksin reseptörlerinin varlığı ve ekzojen santral OXA uygulamasının sıçanlarda plazma adrenokortikotropik hormon (ACTH) ve kortikosteron seviyelerinin artış göstermesi, oreksinlerin stres yanıtı ve HPA eksen aktivasyonunda rolü olabileceğini göstermektedir (Hagan ve ark., 1999; Jaszberenyi ve ark., 2000; Kuru ve ark., 2000; Al-Barazanji ve ark., 2001). Martins ve arkadaşları sıçanlarda 30 dakika süreyle zorlu yüzdürme stresinin serebrospinal sıvıdaki OXA konsantrasyonunu arttırdığını göstermişlerdir (Martins ve ark., 2004). Öte yandan, 10 dakika süreyle uygulanan akut zorlu yüzme stresine cevaben LHA'daki oreksinerjik nöronlarda c-Fos seviyelerinde artışı tespit edilmiştir (Chang ve ark., 2007). LHA'daki oreksinerjik hücrelerden köken alan sinir liflerinin PVN'de yüksek yoğunlukta projeksiyon gösterdiği bilinmekte olup (Cutler ve ark., 1999; Date ve ark., 1999), benzer şekilde CRF reseptörleri de LHA'daki oreksinerjik nöronlarda eksprese edilmektedir (Winsky-Sommerer ve ark., 2004). Buna paralel olarak, CRF immünoreaktif terminallerin LHA'daki oreksinerjik nöronlar ile temas halinde bulunduğunu ve oreksinerjik nöronların CRF'nin her iki tip reseptörünü (CRFR1/CRFR2) eksprese ettiği bilinmektedir. Bu morfolojik bulgular stres yanıtında hipotalamusta bulunan oreksin ve CRF üreten nöron gruplarının etkileşim içinde olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışma, strese bağlı bozulan mide motilitesinde santral endojen OXA'nın etkisinin araştırılması ve stres koşullarında aktive olan santral stres devresinde OXA ve CRF etkileşiminin aydınlatılması amacıyla gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Oreksin Nöropeptit Ailesi

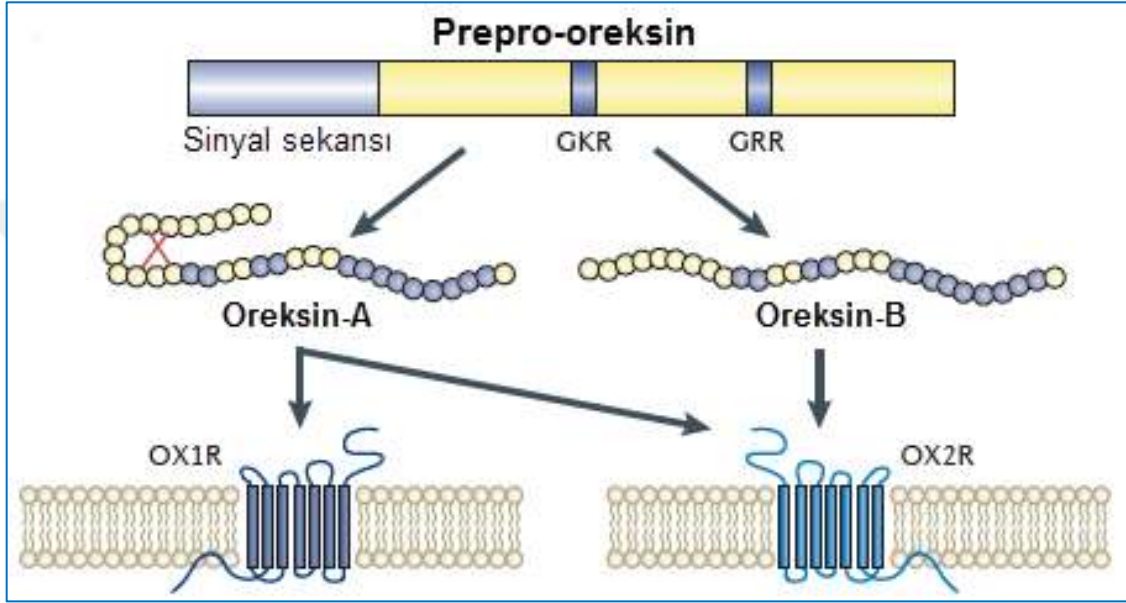
Oreksin nöropeptit ailesi 1998 yılında iki bağımsız grup tarafından keşfedilmiştir (de Lecea ve ark., 1998; Sakurai ve ark., 1998). Sakurai ve arkadaşları insan embriyonik böbrek hücre hattında HFGAN72 yetim reseptörleri ile aktifleşen ve hücre içi kalsiyum artışına neden olan 33 aminoasitlik bir hipotalamik peptidi izole etmişlerdir. Bu peptidin sıçanlarda lateral ventriküle enjeksiyonu sonucu besin alımının artması, araştırmacıların bu peptidi Yunanca'da "iştah anlamına gelen "orexis" kelimesinden esinlenerek "orexin" olarak tanımlamasına neden olmuştur (Sakurai ve ark., 1998). Sakurai ve ekibi, ilk izole ettikleri peptit formunu oreksin-A (OXA) olarak adlandırırken, benzer şekilde hücre içi kalsiyum konsantrasyonunda artışa neden olan ve ilkinde %46 oranında (13/28) homoloji gösteren 28 aminoasit uzunluğundaki ikinci peptidi ise oreksin-B (OXB) olarak tanımlamışlardır.

Aynı yıl içerisinde de Lecea ve arkadaşları ise polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile 130 aminoasit uzunluğunda bir prekürsör peptidi kodlayan hipotalamusa özgü bir mRNA'yı ve bundan meydana gelen iki olgun peptidi izole etmişlerdir. Araştırmacılar bunları hipotalamusa özgünlükleri, ayrıca sekretin ailesine benzer dizilimlerinden ötürü "hipokretinler" olarak isimlendirmişlerdir (de Lecea ve ark., 1998). Daha sonraki dönemde yapılan araştırmalar sonucunda oreksin ve hipokretin nöropeptit ailelerinin aynı sekanslara ve moleküler özelliklerine sahip oldukları ortaya çıkmıştır (Flier ve Maratos-Flier 1998; Kirchgeßner ve Liu 1999; Willie ve ark., 2001).

2.2. Oreksinlerin Yapısı

OXA (hypokretin-1) 33, OXB (hypokretin-2) ise 28 aminoasit içermekte olup, her peptit de 130 amino asitlik prepro-oreksin molekülünün enzimatik klevajı sonucu meydana gelir (Şekil 2.1.) (Siegel ve ark., 2001; Kirchgeßner 2002). Yapısında N-terminal piroglutamil kalıntısı barındıran 3562 Da ağırlığındaki OXA, ayrıca taşıdığı sistein rezidüleri arasında 2 adet disülfid bağı ve C-terminalinde amidasyon oluşumu içerir. OXA'nın bu temel yapısı insan, fare, sığır, sıçan, domuz memeli türlerinde korunmaktadır (Samson ve Resch 2000; Kukkonen ve ark., 2002). Buna karşın, 2937

Da ağırlığındaki OXB C-terminali amidlenmiş bir peptit olup, yapısında disülfid bağı bulunmaz. Cys6-Cys12 ve Cys7-Cys14 arasındaki iki adet disülfid köprüsü ve C-terminal ucundaki 19 amino asitlik zincirin OXA'nın biyolojik etkinliği için elzemdir (Heinonen ve ark., 2008). OXA, OXB'den farklı olarak N-terminalinde 5 amino asitlik ilave bir zincir içerir (Sakurai 1999; Korczynski ve ark., 2006).



Şekil 2.1. OXA ve OXB'nin amino asit dizilimi (Sakurai 2014).

OXA'nın fizyolojik koşullarda OXB'ye göre daha yüksek bir moleküler stabiliteye sahip olduğu bilinmektedir (de Lecea ve ark., 1998; Sakurai ve ark., 1998). OXA, yüksek lipofilik özelliği sayesinde kan-beyin bariyerini hızlı bir şekilde geçerken, düşük lipofilik özellik gösteren OXB kan-beyin bariyerini geçemez ve kanda hızlı şekilde metabolize olur (Mondal ve ark., 2000; Ripley ve ark., 2001).

2.3. Oreksin Reseptörleri

Oreksinlerin fizyolojik etkilerine G protein-bağlı reseptörler OX1R ve OX2R aracılık eder. Bu iki reseptör tipi %64 oranında sekans homolojisi göstermektedir. OX1R için insan ve fare arasında %94 sekans homolojisi bulunurken, OX2R için ise bu oran %95'dir (Smart ve ark., 1999; Ebrahim ve ark., 2002; Korczynski ve ark., 2006; Heinonen ve ark., 2008). OX1R ve OX2R yapılarında orta uzunlukta NH₂ ve COOH terminalleri ile beraber transmembran halkaları barındırırlar. İnsanda 425 amino asit içeren OX1R proteinini kodlayan gen 1. kromozomda yer alırken, 444 amino asitlik

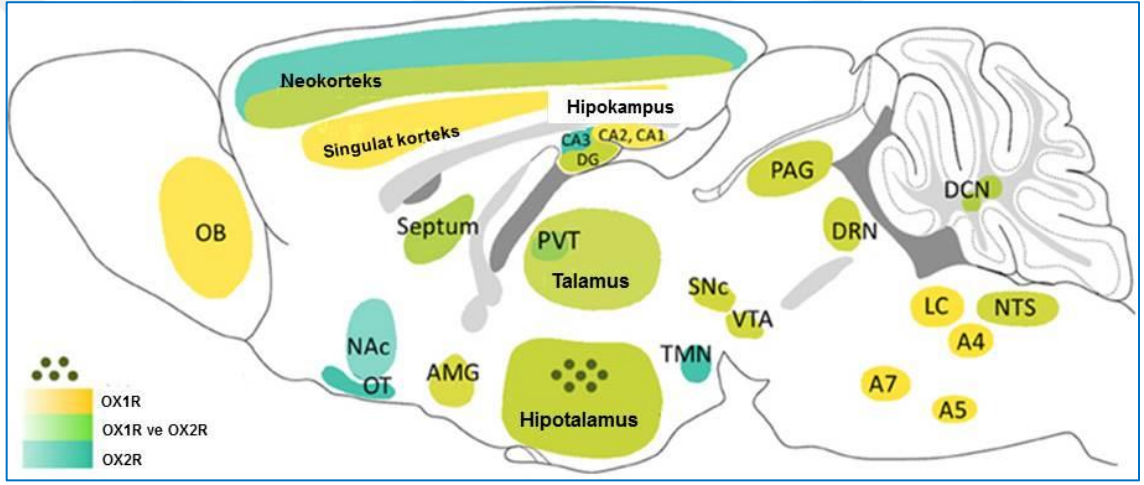
OX2R'yi kodlayan gen ise 6. kromozomda yer almaktadır (Kukkonen ve ark., 2002). OX1R, diğer G-protein bağlı reseptörlerden nöropeptit-Y reseptörü Y2 ile %26, tiotropin serbeleştirici hormon reseptörü ile %25, kolesistokinin tip-1 reseptörü ile %23 ve nörokinin reseptörü NK2 ile %20 oranında sekans benzerliği göstermektedir (Sakurai 1999).

OX1R, OXA'ya 100-1000 kat fazla afinite gösterirken OX2R'nin her iki oreksin tipine afinitesi eşittir (Willie ve ark., 2001; Sakurai 2014). OX1R'nin Gq, OX2R'nin ise Gi ve Gq alt birimleri eşleştğini işaret eden bulgular bulunmaktadır (Sakurai 1999). OXA'nın insan adrenal hücre membranları ile muamele edilmesi sonucu Gq ve daha az oranda Gi alt birimlerinin aktivasyonu olurken, Go alt biriminde ise aktivasyon saptanamamıştır (Randeva ve ark., 2001). Öte yandan Pertussis toksini ile OX2R'nin etkilerinin ortadan kalkması bu reseptörün Gi/Go alt birimleriyle ilişkili olabileceğini göstermektedir (Korczynski ve ark., 2006). Her iki reseptörün aktivasyonu sonucu hücrede iki farklı yanıt oluşur. Bunlardan biri fosfolipaz-C (PLC) aktivasyonu, diğeri ise hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artışıdır (Lund ve ark., 2000). Kalsiyum yanıtında hızlı bir pik evresini kademeli olarak azalan bir plato evresinin takip etmesi bu seyirde hem hücre içi, hem hücre dışı kalsiyum kaynaklarının katkısını göstermektedir (Ebrahim ve ark., 2002; Kukkonen ve ark., 2002).

İzole sıçan ventral tegmental nöronlarında OXA'ya bağlı artan sitoplazmik kalsiyum konsantrasyonunun PLC inhibitörü D609 ve protein kinaz-C (PKC) inhibitörü kalfostin-C ile engellendiği tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra bu kalsiyum artışı, N ve L tipi voltaja duyarlı kalsiyum kanal blokörleri ω -conotoxin ve nitrendipine ile de inhibe edildiği gösterilmiştir (Uramura ve ark., 2001). Bu bulgulardan yola çıkarak oreksin reseptörlerinin hücre içi etki mekanizması: PLC aktivasyonu, inositol trifosfat ve diaçilgliserol oluşumuna bağlı olarak hücre içi depolardan kalsiyum salınımı, PKC aktivasyonu, N ve L tipi voltaja duyarlı kalsiyum kanallarının aktive olması ve hücre içine kalsiyum akımı şeklinde özetlenebilir.

2.4. Oreksin Reseptörlerinin Merkezi Sinir Sistemindeki Dağılımı

Oreksinlerin reseptörlerinin beyinde yaygın şekilde eksprese olduğu moleküler ve histolojik tekniklerin kullanıldığı çalışmalarda gösterilmiştir (Şekil 2.2) (Trivedi ve ark., 1998; Lu ve ark., 2000; Marcus ve ark., 2001; Kukkonen ve ark., 2002; Korczynski ve ark., 2006). Oreksinerjik sinir liflerinin projeksiyon yaptığı alanlarda bu reseptörlerin varlığı oreksinlerin beyindeki diğer nörotransmitter sistemleri ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Öte yandan, bazı oreksinerjik hücre gövdelerinin ve dentritik uzantılarının ventriküler sisteme yakın yerleşim göstermesi oreksinlerin parakrin ve endokrin şekilde etki gösterebileceğini de işaret etmektedir (Smart ve ark., 1999).



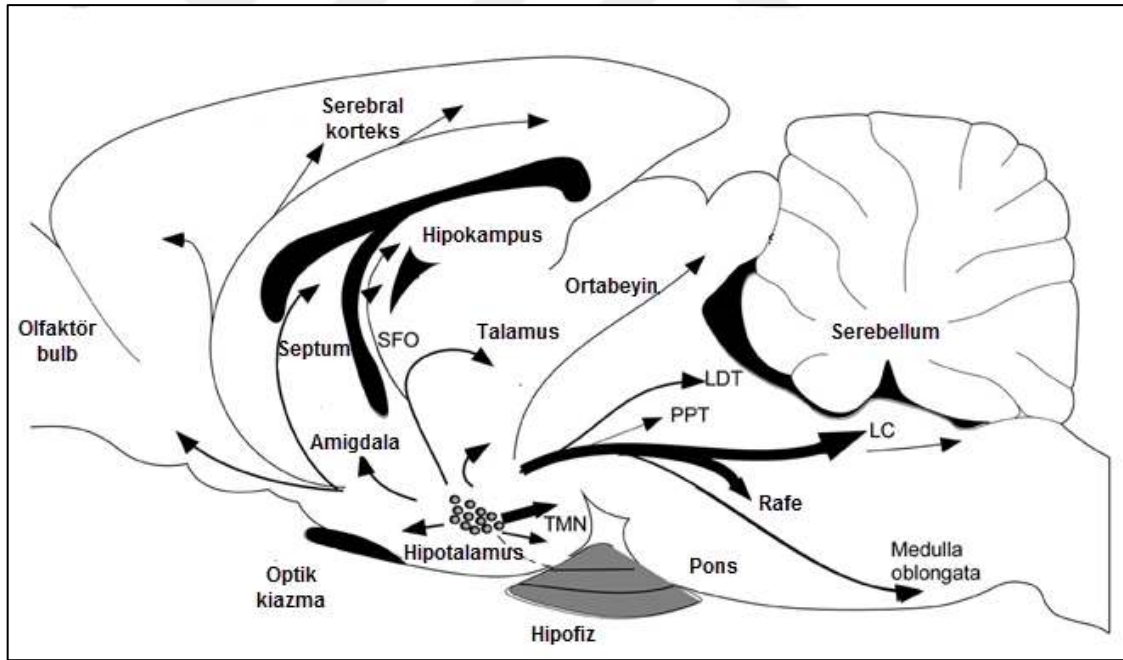
Şekil 2.2. Oreksin reseptörlerinin beyindeki dağılımı. AMG, amigdala; DCN, derin serebellar nükleus; DRN, dorsal rafe nükleus; LC, locus coeruleus; NAc, nükleus akkumbens; NTS, nükleus traktus solitarius; OB, olfaktör bulb; olfT, olfaktör tüberkül; PAG, periakvaduktal gri cevher; PVT, talamusun paraventriküler nükleusu; SNc, substansiya nigra pars kompakta; TMN, tüberomamiller nükleus; VTA, ventral tegmental alan (Flores ve ark., 2013).

OX1R, merkezi sinir sistemi içerisinde yoğunlukla ventromediyal hipotalamusta yerleşim gösterirken OX2R ise PVN'de yerleşim göstermektedir (Trivedi ve ark., 1998; Cai ve ark., 2002; Korczynski ve ark., 2006). OX1R immünoreaktif nöronlar ağırlıklı olarak hipotalamik alandaki PVN, suprakiazmatik nükleus, dorsamediyal nükleus ve ventromediyal nükleus'da bulunur (Korczynski ve ark., 2006). OX1R, ekstrapitalamik olarak hipokampus, dorsal rafe nükleusu, locus ceruleus (LC) ve DMV'de yüksek seviyelerde tespit edilmiştir. Buna karşın, OX2R ekspresyonu en yoğun olarak serebral korteks, subtalamik nükleus, nükleus accumbens, tüberomamiller nükleus ve anterior pretektal nükleus'da saptanmıştır (Sakurai 1999). Spinal kord ve dorsal kök ganglionlarında oreksin reseptörlerinden sadece OX1R mRNA'sı tespit edilirken,

hipokampus ve amigdalada her iki reseptör tipi de saptanmıştır (Lu ve ark., 2000; Korczynski ve ark., 2006). Ayrıca, insan hipofiz bezinde OX1R mRNA'sının somatotrop hücrelerde; OX2R mRNA'sının ise kortikotrop hücrelerde eksprese olması farklı oreksin tiplerinin farklı endokrin etkilere aracılık edebileceğini düşündürmektedir (Blanco ve ark., 2001).

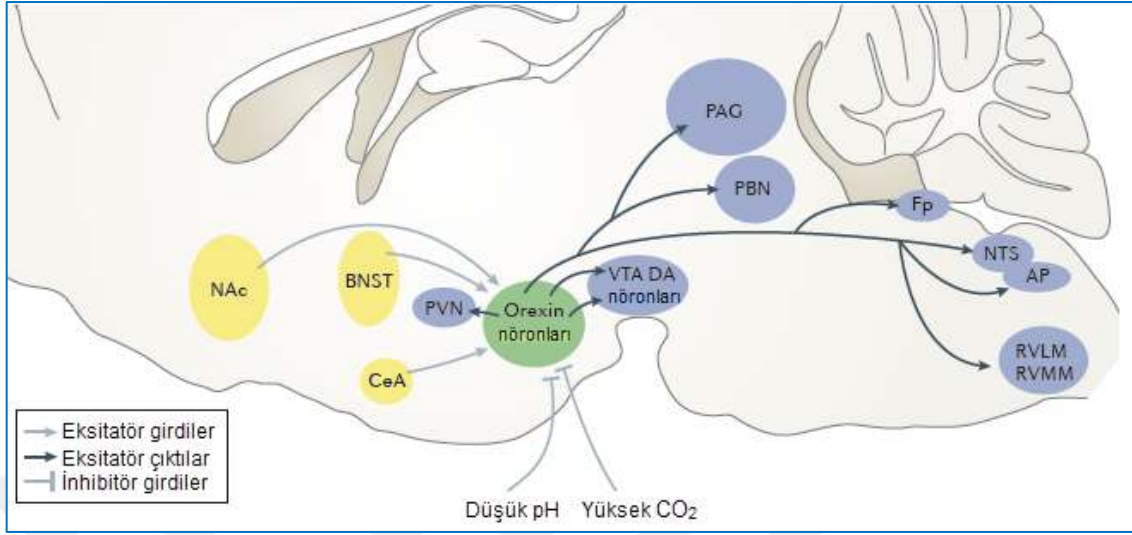
2.5. Oreksinerjik Sinir Liflerinin Projeksiyonları

Oreksinleri üreten hücre gövdelerinin hipotalamustaki LHA, perifornikal nükleus ve dorsomedial nükleus gibi sınırlı alanlarda yerleşim göstermesine karşın bu hücrelerin liflerinin beyinde yaygın projeksiyonları bulunmaktadır. Bu projeksiyonlar özellikle serebral korteks, olfaktör bulb, talamus, hipotalamus, beyin sapı ve spinal kordun neredeyse tüm seviyelerinde yoğun olarak tespit edilmiştir (Şekil 2.3) (Peyron ve ark., 1998; Date ve ark., 1999; Mondal ve ark., 1999).



Şekil 2.3. Oreksinerjik sinir liflerinin beyindeki projeksiyonları (Tsujino ve Sakurai 2013).

Oreksinerjik sinir liflerinin ön beyinde PVN; beyin sapında ise rostral ventrolateral medulla (RVLM), nükleus traktus solitarius (NTS) ve DMV gibi hem sempatik, hem de parasempatik otonom sinyallerin düzenlendiği merkezlere de geniş projeksiyonu bulunmaktadır (Şekil 2.4) (Sakurai 2014).



Şekil 2.4. Oreksin nöronlarının otonomik merkezlere projeksiyonları. NAc, nükleus accumbens; BNST, stria terminalisin bed nukleusu; CeA, santral amigdala; PAG, periakvaduktal gri cevher; PBN, parabrakiyal nükleus; NTS, nükleus traktus solitarius; PVN, paraventriküler nükleus; RVLM, rostral ventrolateral medulla; AP, area postrema; Fp, folium-p; VTA DA, ventral tegmental alandaki dopamin nöronları (Sakurai 2014)

2.6. Oreksinlerin Fizyolojik Etkileri

Oreksinlerin tespit edilen ilk fizyolojik etkileri uyku-uyanıklık döngüsü ve besin alımının regülasyonu üzerinedir (Sakurai 1999; Sutcliffe ve de Lecea 2000). Bunun yanı sıra enerji dengesi, nöroendokrin düzenleme, ağrı iletimi, Gİ ve kardiyovasküler sistemde etkili olduğu bilinmektedir (Ebrahim ve ark., 2002; Kukkonen ve ark., 2002). Araştırmalar ilk olarak besin alımı ve metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynayan LHA'daki yoğun oreksin varlığı nedeniyle oreksinlerin bu alandaki etkileri üzerine yoğunlaşmıştır. Her iki oreksin molekülünün de santral uygulanmaları sonucu doza bağımlı bir şekilde besin alımını uyardığı görülmüştür (Sakurai ve ark., 1998). Bunun yanı sıra, santral OX1R antagonisti SB-334867 uygulanmış sıçanlarda (Haynes ve ark., 2000) ve oreksin knock-out farelerde (Hara ve ark., 2005) besin alımı ve canlı ağırlığın azaldığı tespit edilmiştir.

Besin alımı dışında OXA'nın mide sekresyonu üzerine de etkisi olduğu gösterilmiştir. OXA'nın intrasisternal enjeksiyonunun midede asit üretimini doza bağımlı olarak uyarırken, intraperitoneal uygulanmanın ise mide sekresyonuna herhangi bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir (Takahashi ve ark., 1999). Bu bulgular, OXA'nın mide asit sekresyonuna olan etkisini santral otonomik yollar aracılığıyla gerçekleştirdiğini

düşündürmektedir. Oreksinlerin LC, rafe nükleus ve tüberomamiller nükleus gibi uyku uyanıklığı sağlayan bölgelere projeksiyonları bulunmakta ve santral yolla uygulandığında sıçanlarda uyanıklığı arttırdığı, artan uyanıklık durumunun ise besin alımı artışına dolaylı yoldan katkıda bulunduğu düşünülmektedir.(Sutcliffe ve de Lecea 2000; Willie ve ark., 2001).

Oreksinerjik sinir liflerinin projeksiyonlarının medulla spinalisin tüm segmentlerine kadar ulaşması, oreksinlerin ağrı iletiminde düzenleyici bir etkisi olabileceğini düşündürmüştür. OXA'nın santral uygulaması mekanik, kimyasal, termal uyarılara karşı antinosiseptif etki gösterirken, bu etkiler adenozin tip-1 reseptör antagonisti ile ortadan kaldırılmıştır (Mobarakeh ve ark., 2005). Oreksinlerin analjezik etkilerinin opioid sistemden bağımsız olduğu ve söz konusu etkileri hem beyin, hem de medulla spinaliste eksprese olan reseptörleri aracılığı ile gerçekleştirdiği düşünülmektedir (Ebrahim ve ark., 2002; Korczynski ve ark., 2006).

Oreksinerjik nöronların beyindeki kardiyovasküler düzenleyici alanlar olarak bilinen PVN, RVLM, NTS üzerine yoğun projeksiyonları bulunmaktadır (Peyron ve ark., 1998; Cutler ve ark., 1999; Date ve ark., 1999; Nambu ve ark., 1999). Sıçanlarda yapılan çalışmalarda OXA ve OXB'nin santral uygulamalarının kalp hızını ve ortalama arter basıncını arttırırken (Shirasaka ve ark., 1999; Chen ve ark., 2000; Samson ve Resch 2000) periferik uygulamalarda bu etki saptanamamıştır (Chen ve ark., 2000). Oreksinlerin pressör etkilerini direkt olarak RVLM'deki vasopressör hücrelerin yanı sıra spinal kordun sempatik preganglionik nöronlarında depolarizasyona neden olarak gerçekleştirdiğine dair kanıtlar mevcuttur (Dun ve ark., 2000; Antunes ve ark., 2001; Hirota ve ark., 2003; Huang ve ark., 2010). Bunun yanı sıra, artan HPA eksen aktivasyonu sonucu oluşan sempatik aktivasyon ve plazmada artan katekolaminin de bu etki mekanizmasına katkıda bulunduğu öne sürülmektedir (Heinonen ve ark., 2008).

2.7. Oreksinlerin Gastrointestinal Motor Fonksiyonlara Etkisi

Kemirgenlerde yapılan in-vivo çalışmalarda Gİ motor fonksiyonların düzenlenmesinde santral OXA'nın rolü olabileceği gösterilmiştir. Mideyi innerve eden N.Vagus'un efferent preganglionik hücreleri DMV'de yerleşmişlerdir (Okumura ve Namiki 1990).

Krowicki ve ekibinin yaptığı bir çalışmada DMV’de OX1R’nin yüksek seviyelerde üretildiği tespit edilmiş olup, DMV içerisine OXA’nın mikroenjeksiyonunun mide içi basınçta ve antral motilitede artışa neden olduğu tespit edilmiştir (Krowicki ve ark., 2002). Benzer şekilde sıçanlarda santral ekzojen OXA uygulamasının mide ve kolon motilitesini arttırdığı da bildirilmiştir (Bulbul ve ark., 2010a; Nozu ve ark.). Öte yandan, santral ekzojen OXA’nın gastroduodenal açlık motor paterni üzerine inhibitör etki göstererek tokluk motor paternine benzer bir kasılma paterninin oluşumuna neden olduğu gösterilmiş olup, OXA’ya bağlı bu etkilerin atropin ön uygulaması ve vagotomi ile ortadan kalktığı saptanmıştır (Bulbul ve ark., 2010b). Bulbul ve arkadaşları ayrıca bu çalışmalarında OX1R reseptör antagonisti uygulamasının gastrik spontan faz-III kasılmalarında artışa sebep olduğunu belirtmiş olup, bu bulgular endojen santral OXA’nın Gİ motor fonksiyonlar üzerine rolünü işaret etmektedir (Bulbul ve ark., 2010b). Öte yandan, Kobashi ve arkadaşları intrasisternal OXA uygulamasının midenin proksimalinde gevşeme yaparken, distalinde kontraksiyona sebep olduğunu, distal midede meydana gelen bu fazik kontraksiyonların ise vagotomi ile ortadan kalktığını göstermişlerdir (Kobashi ve ark., 2002). Grabauskas ve arkadaşları OXA’nın mideyi projekte eden DMV hücreleri üzerine ekstatör etkisinin postsinaptik membranda meydana gelen depolarizasyon ile açıklamışlardır. OXA, DMV’deki mideyi projekte eden hücrelerde depolarizasyona sebep olurken, kadmiyum ve tetrodotoksin varlığında sırasıyla kalsiyum ve voltaj-kapılı sodyum kanalları bloke edildiğinde söz konusu uyarıcı etkinin ortadan kalktığı görülmüştür (Grabauskas ve Moises 2003). Bu sonuçlar santral OXA’nın Gİ motor fonksiyonlar üzerine vagal kolinerjik yollar üzerinden etki edebileceğini düşündürmektedir.

2.8. Otonom Sinir Sistemi

Otonom sinir sistemi (OSS) başlıca medulla spinalis, beyin sapı ve hipotalamusta yer alan merkezlerin kontrolü altında olup, periorbital serebral korteks ve özellikle de limbik korteks otonom kontrolün düzenlenmesinde denetleyici role sahiptir. Efferent otonomik sinyaller, sempatik ve parasempatik sinir sistemi olarak adlandırılan iki temel alt kısım ile vücudun çeşitli organlarına aktarılmaktadır. Parasempatik sinir lifleri beyin ve medulla spinalis’in sakral kısmından, sempatik sinir lifleri ise medulla spinalis’in torakal ve lomber seviyesinden terk ederek hedef organa ulaşmaktadır. Bu nedenle çıkış yerlerine

göre sempatik sistem torakolumbal sistem, parasempatik sistem kranyosakral sistem olarak da adlandırılmaktadır. Sempatik ve parasempatik sinir sisteminin her ikisinde de bütün preganglionik nöronlar kolinerjiktir. Parasempatik sistemin postganglionik nöronlarının tamamına yakın bir kısmı kolinerjik iken postganglionik sempatik nöronların çoğu adrenerjiktir. Ancak ter bezleri, piloerektör kaslar ve bazı kan damarlarının postganglionik sempatik sinir lifleri kolinerjiktir (Guyton ve Hall, 2013; Barret ve ark., 2010; Boron ve Boulpaep, 2012).

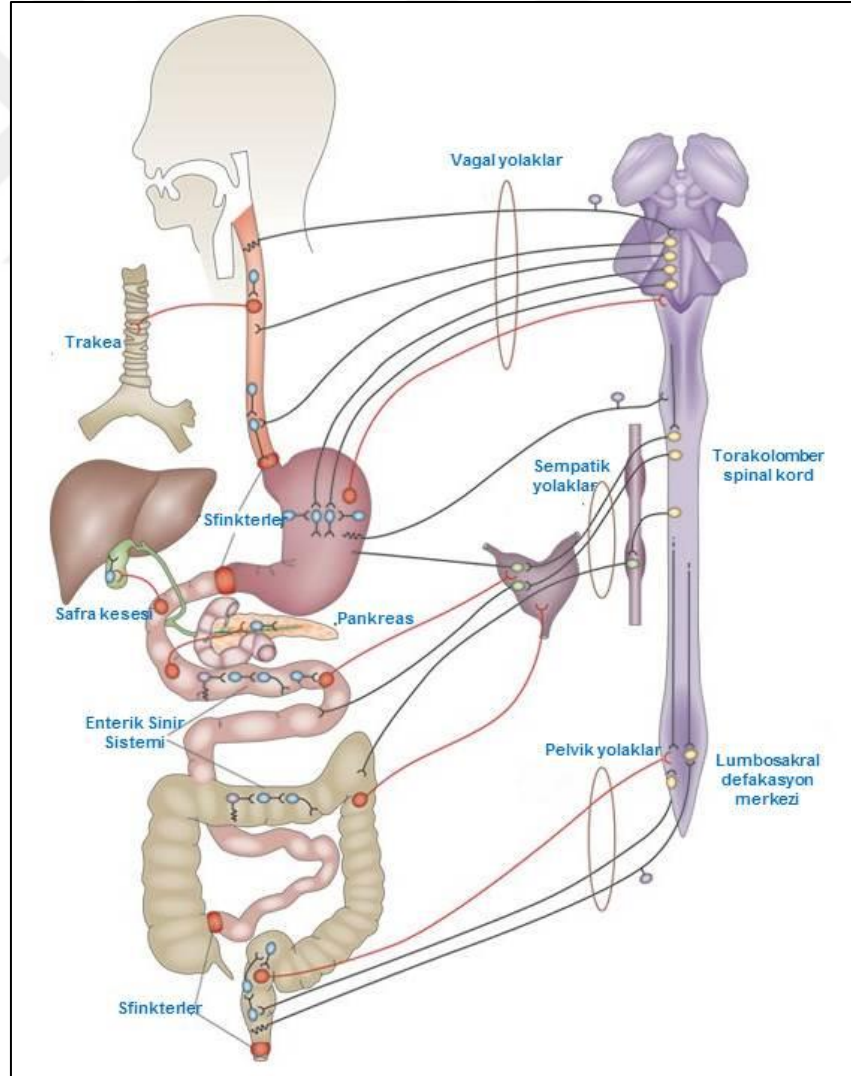
Sempatik sinirler, medulla spinalisten spinal sinirlerle beraber T-1 ve L-2 segmentleri arasından çıkarak ilk olarak sempatik zincire ve daha sonra sempatik sinirler tarafından uyarılan doku ve organlara geçerler. Spinal sinir, spinal kanalı terkettikten sonra preganglionik sempatik lifler spinal sinirden ayrılır ve beyaz ramus boyunca sempatik zincirin ganglionlarından birine ulaşır. Liflerin daha sonraki gidiş yeri 3 yoldan biri olabilir; lifler içine girdiği ganglionda postganglionik nöronlarla sinaps yapabilir, yukarı ve aşağı yönelerek zincirdeki diğer ganglionlardan birinde sinaps yapabilir veya zincir boyunca farklı uzaklıklarda ilerleyebilir. Daha sonra zincirden ayrılan sempatik sinirlerden biri ile seyrederek periferik sempatik ganglionda sinaps yapmaktadır (Guyton ve Hall, 2013; Barret ve ark., 2010).

Parasempatik lifler merkezi sinir sistemini III, VII, IX ve X. kranyal sinirler, ikinci ve üçüncü sakral spinal sinirler, nadiren de birinci ve dördüncü sakral sinirler üzerinden terk ederler. Tüm parasempatik liflerin yaklaşık %75'i vagus içinde yer almaktadır. Vagusun sinirleri özofagus, kalp, akciğer, mide, ince bağırsak, kolonun üst yarısı, karaciğer, safra kesesi, pankreas ve üreterlerin üst kısmının innervasyonundan, S2-S4 segmentlerin lateral boynuz hücrelerinden köken alan sakral preganglionik lifler ise inen kolon, rektum, mesane, üreterlerin alt bölümü ve dış genital organların innervasyonundan sorumludur (Guyton ve Hall, 2013; Boron ve Boulpaep, 2012).

2.9. Gastrointestinal Sistemin İnnervasyonu

Gastrointestinal sistem (GİS) fonksiyonları ekstrinsik ve intrinsik sinirsel mekanizmalar tarafından kontrol edilmektedir. İntrinsik kontrol enterik sinir sistemindeki (ESS) myenterik ve submukozal pleksus aracılığıyla gerçekleşirken, ekstrinsik kontrol OSS ile sağlanmaktadır (Şekil 2.5). ESS, tamamen organ duvarında yer alır, özofagusta başlar ve

anüse kadar devam eder. ESS, longitudinal ve sirküler kas tabakaları arasında yer alan myenterik plexus (Auerbach plexusu) ve submukozada yer alan submukozal plexustan (Meissner plexusu) oluşmaktadır. Myenterik plexus temel olarak Gİ hareketlerinden sorumlu iken, submukozal plexus ise başlıca Gİ salgıların ve lokal kan akımının kontrolünden sorumludur. Bunun yanı sıra merkezi sinir sisteminden gelen parasempatik ve sempatik uyarılar ESS'nin aktivitesini etkiler. Fakat Gİ kanalındaki parasempatik ve sempatik sinirler kesilse bile motor ve salgı işlevi devam eder. GİS ve merkezi sinir sistemi arasındaki nöral bağlantı efferent (otonomik) ve afferent (duysal) mekanizmalar ile iki yönlü olarak çalışmaktadır (Guyton ve Hall, 2013; Barrett ve ark., 2010; Boron ve Boulpaep, 2012).



Şekil 2.5. Gastrointestinal sistemin innervasyonu (Furness 2012).

2.9.1. Gastrointestinal Sistemin Otonomik İnnervasyonu

Gİ kanalda genel olarak sempatik innervasyon inhibe edici, parasempatik innervasyon ise uyarıcı niteliktedir. Ağız ve faringeal bölgeye giden birkaç parasempatik lifi hariç, kranyal parasempatikler neredeyse tamamen vagus siniri içinde taşınmaktadır. Bu lifler özofagus ve mideyi yaygın biçimde, ince bağırsak, safra kesesi ve kolonun ilk yarısını daha az innerve ederler. Sakral parasempatikler ikinci, üçüncü ve dördüncü sakral spinal segmentlerden doğarlar ve pelvik sinirler içinde kolonun distal yarısına kadar ulaşırlar. Kolonun sigmoid, rektum ve anal bölümleri daha yoğun parasempatik donanımına sahiptir. Parasempatik sistemin postganglionik nöronları myenterik ve submukozal pleksus içinde yerleşmişlerdir ve parasempatik sinirlerin uyarılması ESS'nin tamamında genel bir aktivite artışına sebep olmaktadır (Guyton ve Hall, 2013; Boron ve Boulpaep, 2012).

Gİ kanalın sempatik lifleri medulla spinalisin T5-L2 segmentleri arasından kaynaklanır. Bağırsakları innerve eden preganglionik liflerin çoğu medulla spinalisi terk ettikten sonra medulla spinalisin yanında yer alan sempatik zincir içine girerler ve bu liflerin büyük kısmı bu zincirleri terk ederek çölyak ganglion, superior ve inferior mezenterik ganglionlara doğru giderler. Sempatikler genel olarak, parasempatiklerde olduğu gibi ağız boşluğu ve anüse yakın bölgelere yoğun olarak dallar vermek yerine, Gİ kanalın tamamını innerve etmektedirler. Genel olarak sempatik sinir sisteminin uyarılması parasempatik sistemin neden olduğu etkilerin aksine, Gİ kanalın aktivitesinde baskılanmaya neden olur. Bu etki norepinefrinin düz kas üzerine yaptığı hafif baskılama ve ESS nöronlarına norepinefrinin güçlü baskılayıcı etkisiyle meydana gelmektedir. Sempatik uyarı Gİ kanalda peristaltizmi, kan akımını ve salgıyı azaltır (Guyton ve Hall, 2013; Barret ve ark., 2010).

2.9.2. Gastrointestinal Sistemin Duysal İnnervasyonu

Ekstrinsik afferent duysal nöronlar (EPAN) GİS'den aldıkları duysal bilgileri merkezi sinir sistemine taşımaktadırlar. Afferent liflerin merkezi sinir sistemine ilettikleri mekanik, kimyasal ve termal değişiklikler neticesinde açlık, tokluk, bulantı, distansiyon ve ağrı hisleri meydana gelir. Vagal EPAN'ların yoğunlukla aksonlarının NTS'de projeksiyonları bulunurken, spinal EPAN'lar medulla spinalisin farklı segmentlerinde

sonlanırlar. Vagal afferent sinirlerin gövdeleri nodoz ganglionda yer alırken, spinal primer afferent nöronların hücre gövdeleri dorsal kök ganglionunda yer almaktadır. Nodoz ganglionlar Gİ kanalın rostrokaudal organizasyonu olarak da isimlendirilen yumuşak damak ve yutak haricinde kalan kısımların viserotropik innervasyonundan sorumludur. Vagal EPAN'ların büyük bir kısmı myelinsiz C liflerinden oluşur (Furness ve ark., 1999). Spinal EPAN'lar, vagal EPAN'lardan farklı olarak afferent ileti fonksiyonu dışında sinir sonlanmalarından salgıladıkları CGRP, nörokinin-A, nörokinin-B ve substans P gibi lokal modülatörler aracılığıyla mukozal bütünlüğün korunmasında rol oynarlar. Hücre gövdeleri ve aksonları myenterik ve submukozal pleksus'ta yer alan intrinsik primer afferent nöron (İPAN)'lar ise sindirim kanalının mukozal ve musküler katmanlarını innerve edip, birbirleriyle ve ESS'nin motor, sekretomotor ve internöronlarıyla sinaps yaparlar. İPAN'lar bağırsak içeriğindeki mekanik, kimyasal ve gerimdeki değişikliklere cevaben intrinsik refleksleri başlatırlar (Holzer ve ark., 2001).

2.10. Santral Stres Devresi

Santral stres devresi, strese cevaben aktive olan, nöral ağlarla birbirleriyle ilişki içerisinde olan beyin yapılarını ifade etmektedir. Bu beyin yapılarının hiyerarşik düzeninde en tepede lateral prefrontal korteks ve mediyal prefrontal korteks (ventromediyal korteks, perigenual ve infragenual korteks) bulunmaktadır (Bhatia ve Tandon 2005). Preforantal korteksten köken alan sinir lifleri daha çok amigdala ve hipotalamusa projekte olurlar. Daha sonraki projeksiyonlar ise ağırlıklı olarak ön beyinden PVN; orta beyinden periakvaduktal gri cevher yapılarından köken alır ve sırasıyla hipofiz bezi ve pontomedüller kavşakta sonlanır. Santral stres devresinin en son çıktıları ise otonomik nörotransmitterleri (norepinefrin ve epinefrin), nöroendokrin (HPA eksen) ve ağrı modülatör sistemi içeren ve emosyonel motor sistem olarak adlandırılan nöral devre üzerinde sonlanmaktadır (Holstege ve ark., 1996). Bu devrenin negatif geri besleme ile düzenlenmesinde beyin sapındaki rafe nükleusundan yukarı çıkan serotonerjik projeksiyonlar, LC'den köken alan noradrenerjik projeksiyonlar ve dolaşımdaki glukokortikoidler rol almaktadır (Herman ve ark., 2003; Bhatia ve Tandon 2005).

Organizmanın strese cevabı birbiriyle bağlantılı beyin yapıları olan hipotalamus (PVN), amigdala ve periakvaduktal gri cevher aracılığıyla oluşmakta olup, bu bölgeler viseral ve somatik afferent girdileri mediyal prefrontal korteks, anterior singulat ve insular korteks gibi kortikal bölgelerden alır. Buradan çıktılar ise vücudun nöroendokrin ve otonomik cevaplarını düzenleyen alanlar olan hipofiz bezi ve pontomedüller kısma uzanmaktadır (Mayer 2000; Jones ve ark., 2006). Santral stres devresinin ilgili bu çıktıları emosyonel motor sistem (EMS) olarak da adlandırılmaktadır. Sonuç olarak, EMS nöroanatomik olarak vücudun içten ve dıştan gelen karışıklıklara karşı somatik, ağrı modülasyonu, otonomik ve nöroendokrin cevapların düzenlenmesinde görev alan efferent yolları yönlendirir (Nieuwenhuys 1996; Mayer 2000). Genetik faktörler, erken yaşam deneyimleri ve tehdit edici ciddi yaşam stres etkenleri gibi hassas faktörlere karşı EMS’de bozulmuş tepkiler meydana gelebilmektedir (Holstege 1992; Holstege ve ark., 1996; Mayer 2000). Duygusal tepkilerin düzenlendiği limbik sistem, duygunun işlenmesinden sorumlu amigdala, frontal lobun orbital ve mediyal kısımları ve son olarak duygunun dışı vurumundan sorumlu diensefalon ve ön beyin EMS bileşenlerini oluştururlar (Holstege ve ark., 1996).

Tehdit edici bir uyarının algılanması veya hayal edilmesiyle kortikal ve subkortikal yapılarda uyarılma ve prefrontal kortekste aktivasyon söz konusudur. Bu kortikal alanlar limbik sistemde aktivasyona neden olmaktadır. Limbik sistemin bir parçası olan amigdala emosyonel hafıza ve emosyonel tepkilerin oluşmasında rol oynamaktadır. Bunun yanı sıra endokrin ve OSS’nin kontrolünde de görev almaktadır. Kortikal ve limbik yapılardan inen projeksiyonlar başta LC olmak üzere, noradrenerjik hücrelerin aktivasyonuna neden olur (Huether 1996). Bununla beraber prefrontal korteks, amigdala ve hipotalamusun uyarılması sonucu HPA eksen aktif hale geçer (Huether ve ark., 1999).

2.10.1. Stres Yanıtı

Stres yanıtı, fiziksel ve/veya psikolojik uyarıların homeostazisi tehdit etmesiyle ortaya çıkan bir durum olmakla birlikte günümüzde “çevresel değişimlere karşı vücudun spesifik olmayan cevabı” olarak da tanımlanmaktadır (Aguilera ve ark., 2001; Charmandari ve ark., 2005). Memelilerde strese karşı gelişen yanıt, çeşitli fonksiyonel

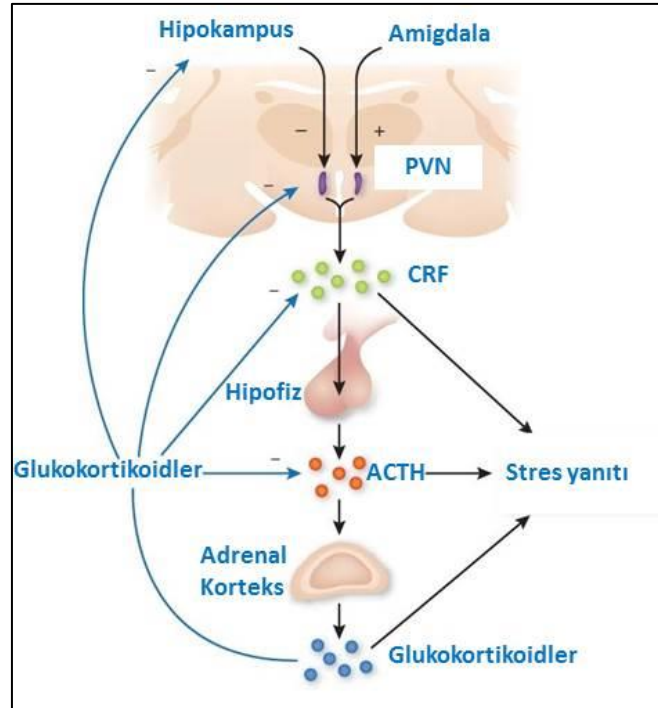
ve yapısal değişiklikleri de beraberinde getirir. Bu değişiklikler, biyolojik savunma sisteminin bir parçası olup merkezi sinir sistemi, endokrin sistem ve bağışıklık sisteminin birbirleri ile olan kompleks etkileşimlerini içeren farklı mekanizmaları içinde barındırır (Charmandari ve ark., 2005). Stresle ilgili ilk çalışmalar ve tanımlamalar Walter Canon (1914) ve Hans Selye (1936) tarafından yapılmıştır. Organizmanın akut bir tehdit altında oluşturduğu sempatik sinir sisteminin ani aktivasyonu sonucu ortaya çıkan “savaş ya da kaç” yanıtı 1915 yılında W.Cannon tarafından bilimsel literatüre kazandırılmıştır. Stres terimi ise ilk olarak yaklaşık 80 yıl önce Hans Selye tarafından organizmanın emosyonel ve fiziksel tehditlere karşı gösterdiği nonspesifik tepki olarak tanımlanmıştır (Larauche ve ark., 2012). Selye stresin etkisinin her zaman olumsuz olmadığını, eğer stres organizmaya zarar veriyorsa distres, hafif şiddette strese maruz kalındığında pozitif etkiler görülüyorsa östres ya da öforik stres, negatif ya da pozitif etkiler görülüyorsa neustres ya da nötral stres olarak tanımlamıştır (Selye 1998). Çevresel koşulların değişmesi, korku, ağrı, travma, ağır egzersiz, enfeksiyon, oksijen kaynağının azalması, yaralanma, yanıklar, açlık gibi faktörlerin yanı sıra yeni ortam, ödülün gecikmesi, cezanın hissedilmesi gibi psikolojik durumlar organizmada stres yanıtına neden olan temel stres faktörleri arasında yer almaktadır (O'Connor ve ark., 2000; Aguilera ve ark., 2001; Charmandari ve ark., 2005).

2.10.2. Strese Karşı Gelişen Endokrin Yanıt

Stres yanıtının temel nöroendokrin bileşeni HPA eksenidir (Şekil 2.6) (Chrousos 1998; Bittencourt ve Sawchenko 2000). PVN, HPA ekseninin merkezi kontrolündeki en önemli odaktır (Herman ve Cullinan 1997). CRF1 ve CRF2 olarak iki farklı tip membran reseptörü tanımlanan CRF, stres durumunda adenohipofizdeki kortikotropik hücrelerde bulunan CRFR1 reseptörüne bağlanarak cAMP aracılığıyla ACTH salınımını uyarır (Charmandari ve ark., 2005). ACTH ise adrenal korteksten glukokortikoidlerin salınmasına neden olur (O'Connor ve ark., 2000; Charmandari ve ark., 2005). İnsanlarda bulunan başlıca glukokortikoid kortizol iken kemirgenlerde kortikosterondur (Welberg ve Seckl 2001). Stres yanıtının oluşumunda glukokortikoidler önemli bir yere sahiptirler. Organizmanın stresle başa çıkabilmesi için gerekli olan enerji ihtiyacını giderecek substrat mobilizasyonunu sağlamada işlev görürler. Bunun yanı sıra katekolaminlerin salınımına yol açarlar ve kardiyovasküler sistemi aktive edip yaşam

için acil şekilde gerekli olmayan bağışıklık, büyüme ve üreme ile ilgili sistemleri baskırlar (O'Connor ve ark., 2000; Charmandari ve ark., 2005).

HPA ekseninin aktivitesi kandaki glukokortikoid miktarına bağılı olarak negatif geri bildirim mekanizması ile kontrol altındadır. Dolaşımdaki serbest glukokortikoidler hipotalamus PVN nöronlarına ve hipofiz bezine etki ederek CRF ve ACTH sekresyonunu inhibe ederler (Welberg ve Seckl 2001; Tsigos ve Chrousos 2002). Glukokortikoidler bu inhibitör etkilerini hücre içi reseptörler aracılığıyla gerçekleştirirler (Sapolsky ve ark., 1990). Glukokortikoidlerin yüksek afiniteli mineralokortikoid reseptörleri (tip I reseptör) ve düşük afiniteli glukokortikoid reseptörleri (tip II reseptör) olmak üzere iki reseptör alt tipi vardır. Mineralokortikoid reseptörleri beyinde lateral septum ve hipokampus gibi sınırlı alanlarda bulunurken, glukokortikoid reseptörleri ise daha yaygın bir dağılım göstermektedirler. PVN, santral amigdala, hipokampus ve LC'deki katekolaminerjik hücreler gibi stresle ve kortikosteron geri bildirimleriyle ilişkili olan alanlarda bulunmaktadır (Welberg ve Seckl 2001; Tsigos ve Chrousos 2002). HPA eksen aktivitesinin kontrolünde özellikle hipokampusta bulunan kortikosteroid reseptörlerinin etkisi önemlidir (Szuran ve ark., 2000).



Şekil 2.6. Hipotalamik-hipofizer-adrenal (HPA) eksen (Hyman 2009).

HPA ekseninin birincil aktivatörü olarak kabul edilen CRF'nin stres yanıtının endokrin bileşenlerinin oluşumunda ACTH sekresyonunu sağlamasının yanı sıra başka fonksiyonları da bulunmaktadır. Deneysel ekzojen CRF uygulaması bir takım endokrin kaskadın tetiklenmesi dışında fizyolojik, nörokimyasal ve davranışsal değişimlerin ortaya çıkmasını sağlamakta olup, bu değişimlerin önemli bir kısmı hipofiz adrenal sisteminden bağımsız olarak meydana gelir. Akut veya kronik stres maruziyetini takiben pek çok beyin alanında CRF seviyelerinde değişim yaşandığı bilinmektedir (Koob ve Bloom 1985; Dunn ve Berridge 1990; Arborelius ve ark., 1999). CRF, hipotalamik ve hipotalamus dışındaki alanlarda bulunan reseptörlerine bağlanarak strese karşı gelişen davranışsal ve otonom yanıtların ortaya çıkmasına aracılık eder (Chrousos 1998; Aguilera ve Rabadan-Diehl 2000; Aguilera ve ark., 2001).

2.11. Stres Yanıtı ve Oreksinler

Hipotalamik PVN hücrelerinde oreksin reseptörlerinin varlığının tespit edilmesi, ilk olarak araştırmacılara oreksinlerin stres yanıtı ve HPA eksen aktivasyonunda rolü olabileceğini düşündürmüştür. Sıçanlarda yapılan çalışmalarda, ekzojen santral OXA uygulamasının sıçanlarda plazma ACTH ve kortikosteron seviyelerini arttırdığı tespit edilmiştir (Hagan ve ark., 1999; Jaszberenyi ve ark., 2000; Kuru ve ark., 2000; Al-Barazani ve ark., 2001). Martins ve arkadaşları sıçanlarda 30 dakika süreyle zorlu yüzdürme stresinin serebrospinal sıvıdaki OXA konsantrasyonunu arttırdığını göstermişlerdir (Martins ve ark., 2004). Benzer şekilde sıçanlarda santral OXA uygulaması (3 µg, icv) ve 10 dakikalık zorlu yüzme stresine bağlı artan plazma ACTH seviyelerinin OX2 reseptör antagonisti ön uygulaması ile ortadan kalktığı gösterilmiş olup, aynı çalışmada 10 dakika süreyle uygulanan zorlu yüzme stresine cevaben LHA'daki oreksinerjik nöronlarda c-Fos seviyelerinde artış tespit edilmiştir (Chang ve ark., 2007).

LHA'daki oreksinerjik hücrelerden köken alan sinir lifleri PVN'de yüksek yoğunlukta projeksiyon göstermekte olup (Cutler ve ark., 1999; Date ve ark., 1999), CRF reseptörleri LHA'daki oreksinerjik nöronlarda eksprese edilmektedir (Winsky-Sommerer ve ark., 2004). Bu morfolojik bulgular stres yanıtında oreksinerjik sistem etkisinin CRF üzerinden ya da CRF'nin oreksinerjik sistem üzerinden etkinlik

gösterebileceğini düşündürmektedir. Bu bulgulardan yola çıkarak takip eden yıllarda oreksinler ve CRF arasındaki santral düzeydeki ilişkiyi inceleyen çalışmalar yapılmıştır. Santral CRF mikroenjeksiyonu ve 1 saat süreyle uygulanan hareketsizlik stresinin LHA'da bulunan oreksinerjik nöronları aktive ederek prepro-oreksin mRNA ekspresyonunu arttırdığı tespit edilmiştir (Ida ve ark., 2000). Öte yandan, sıçanlarda santral OXA (10-30 µg, icv) uygulamasının PVN'deki CRF mRNA ekspresyonunda artışa neden olduğu gösterilmiştir (Al-Barazanji ve ark., 2001). Sakamoto ve arkadaşları ise sıçanlarda OXA (30 µg, icv) uygulamasından 90 dakika sonra PVN ve santral amigdaloide nükleustaki CRF ve c-Fos immünoaktivitesinde sırasıyla %96 ve %45 oranlarında artış tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada 20 dakika süreyle uygulanan hareketsizlik stresinden sonra LHA'daki oreksinerjik nöronların %24 oranında aktive olduğu gösterilmiştir (Sakamoto ve ark., 2004). Stricker-Krongrad ve arkadaşları adrenalectomi uygulanmış sıçanlarda LHA'daki prepro-oreksin mRNA ekspresyonunun kontrol grubuna göre %50 oranında azaldığını, bu azalmanın 5 gün süreyle uygulanan glukokortikoid türevi deksametazon ile ortadan kalktığını göstermişlerdir. Bu bulgular, LHA'daki oreksinerjik aktivitenin stres yanıtının negatif geri bildirimi ile kontrol edildiğini göstermektedir (Stricker-Krongrad ve Beck 2002).

Oreksin nöropeptid ailesinin 1998 yılındaki keşfinden 2004 yılına kadar geçen sürede yapılan çalışmalarda elde edilen morfolojik kanıtlar hipotalamustaki stres devresinde oreksinler ve CRF arasında fonksiyonel bir ilişki olabileceğini düşündürmüştür. Bu konuyla ilgili en detaylı bulgular 2004 yılında Winsky-Sommerer ve arkadaşlarının çalışmasında elde edilmiştir (Winsky-Sommerer ve ark., 2004). Araştırmacılar söz konusu çalışmalarında CRF immünoaktif terminallerin LHA'daki oreksin üreten nöronlar ile temas halinde bulunduğunu ve oreksinerjik nöronların CRF'nin her iki tip reseptörünü eksprese ettiğini göstermişlerdir. Buna ilave olarak, LHA'dan elde edilen kesitlerde CRF'nin oreksinerjik nöronlardaki membran potansiyelini ve ateşleme frekansını arttırdığını, CRF aracılı oluşan bu depolarizasyonun ise CRF reseptör antagonisti astressin ile ortadan kalktığını göstermişlerdir. Son olarak, akut strese cevaben LHA'da gözlenen oreksinerjik nöron aktivasyonunun CRFR1 knock-out farelerde ortadan kalktığı tespit edilmiştir (Winsky-Sommerer ve ark., 2004).

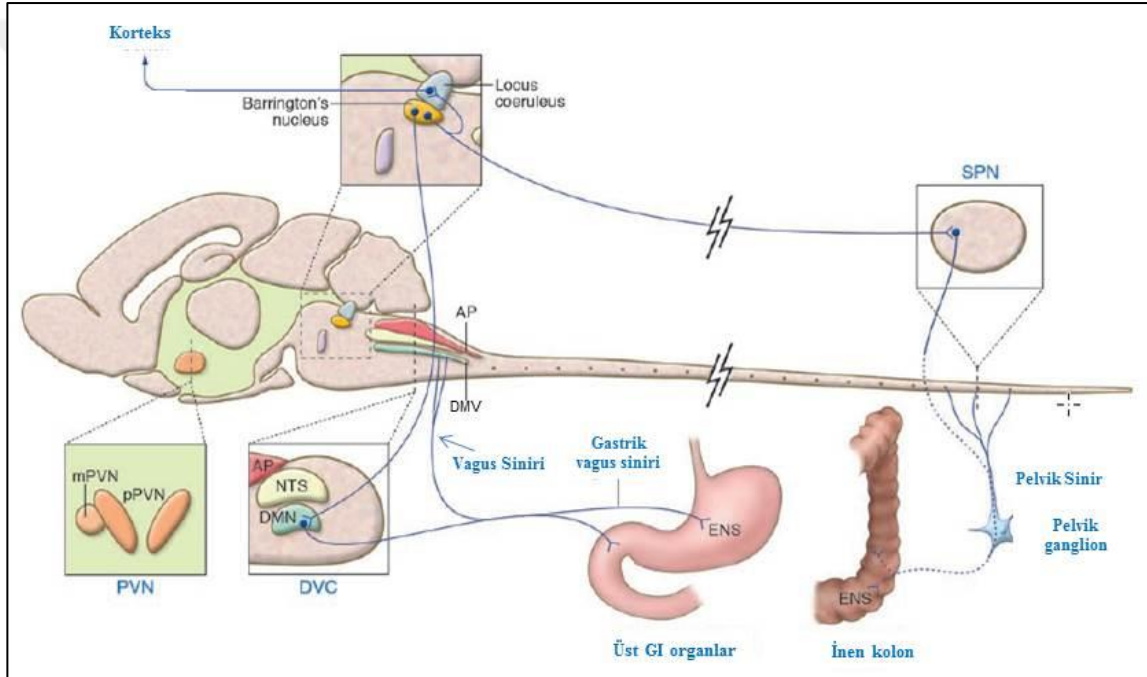
2.12. Gastrointestinal Motor Fonksiyonlarda Strese Bağlı Değişiklikler

Stres tüm organizmayı etkilemekle beraber özellikle GİS stresten etkilenen sistemlerin başında gelmektedir. Literatürdeki mevcut bulgulara karşın, strese bağlı bozulan GİS motor fonksiyonların mekanizması günümüzde halen net olarak bilinmemektedir.

Santral CRF enjeksiyonu kemirgenlerde bağırsak motor fonksiyonlarında stres ile ilişkili değişimlere neden olurken, CRF antagonistleri stres etkenlerinin etkilerini ortadan kaldırmaktadır. CRF, ürokortin-1 ve ürokortin-2 santral yolla uygulandıklarında mide boşalımını inhibe ederler (Lee ve Sarna 1997; Kihara ve ark., 2001; Nakade ve ark., 2005). Öte yandan, akut stresin mide boşalımını CRFR-2 ve periferik sempatik sinirler aracılığıyla inhibe ettiği bilinmektedir (Nakade ve ark., 2005; Masere C 2009). Akut stres ve santral CRF'nin enjeksiyonu ince bağırsak motilitesini de mide boşalımına benzer yolla HPA eksen aktivasyonundan bağımsız olarak vagal efferent sinirler aracılığıyla inhibe ettiği gösterilmiştir (Lenz ve ark., 1988a; Lenz ve ark., 1988b; Williams ve ark., 1988). Akut hareket kısıtlama stresi (HKS) ile oluşan Gİ motilitedeki değişikliklerin CRF antagonisti ön uygulaması ile ortadan kalkması endojen CRF'nin strese bağlı bozulan gastrointestinal motilitedeki rolünü göstermektedir (Lenz ve ark., 1988a; Coskun ve ark., 1997; Nakade ve ark., 2006; Masere C 2009).

Kemirgenlerde yapılan çalışmalarda akut stresin neden olduğu mide boşalımındaki gecikmede santral CRF2 reseptörleri ve sempatik sinir sistemi rol alırken, kolon motilitesinin artışında santral CRF1 reseptörleri ve parasempatik sinir sisteminin rol aldığı görüşü yaygındır (Lenz ve ark., 1988a; Nakade ve ark., 2006; Masere C 2009; Babygiriya ve ark., 2010). Bu bulgulara karşın strese bağlı bozulan üst GİS motilitesinde etkinliği artan sempatik otonom deşarjların yanı sıra etkinliği azalan vagal parasempatik sinyallerin de rolü olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır (Gue ve ark., 1987; Tache ve ark., 1987; Monnikes ve ark., 1992; Lee ve Sarna 1997; Kihara ve ark., 2001; Lewis ve ark., 2002; Czimmer ve ark., 2006). Stresin neden olduğu gastrointestinal motor değişikliklerde PVN'de artan CRF'nin rolü ortaya konmuştur. PVN'deki CRF üreten nöronların projeksiyon yaptığı amigdala, Barrington nükleusu (BN), DMV, LC ve RVLM strese bağlı değişen gastrointestinal motor ve duysal fonksiyonlara aracılık eden temel alanlardır (Lenz ve ark., 1988b; Yabana ve Yachi 1988; Bhatia ve Tandon 2005;

Konturek ve ark., 2011). Özellikle CRF2 reseptörü eksprese eden nöronlar barındıran hipotalamik PVN ve DMV, beyinde CRF'nin etki bölgelerinin başında gelmektedir (Bittencourt ve Sawchenko 2000; Tache ve ark., 2001; Lewis ve ark., 2002). BN ve LC den köken alan efferent sinirlerin DMV ve sakral parasempatik nükleusa (SPN) projeksiyonları bulunmaktadır. DMV, midede myenterik plexus nöronlarıyla sinaps yapan efferent sinir liflerinin kaynağıdır. Stres durumunda PVN, LC ve BN'nin aktivasyonu ile beraber mide boşalımının inhibisyonu ve kolon transitinin stimülasyonu gerçekleşmektedir (Şekil 2.7) (Tache ve Bonaz 2007).

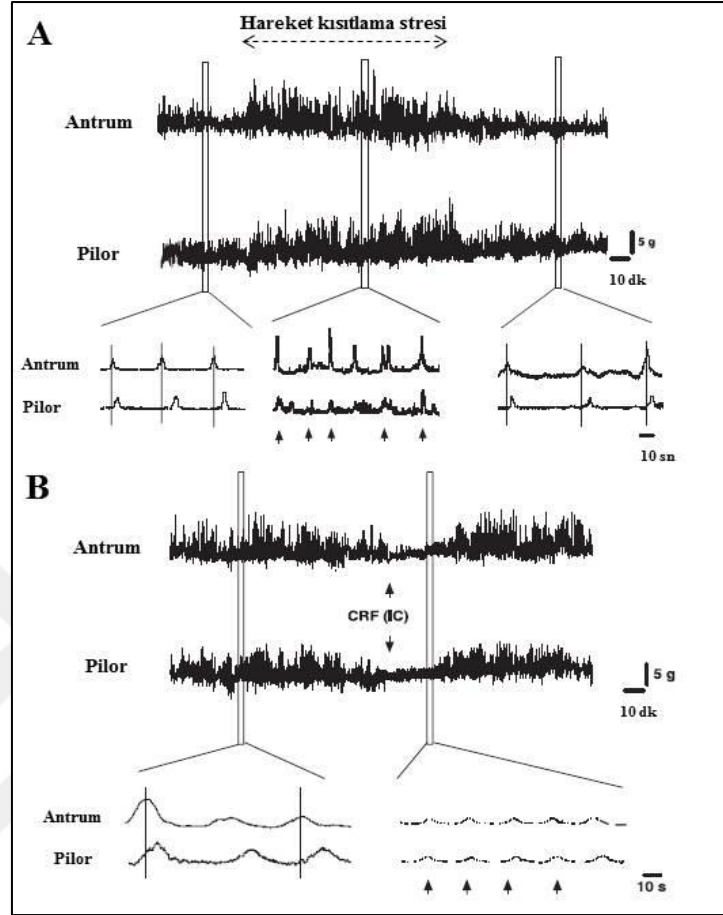


Şekil 2.7. Mide ve kolonik motor fonksiyonların sinirsel kontrolü. DVC: dorsal vagal kompleks; DMV: vagusun dorsal motor nükleusu; PVN: paraventriküler nükleus; SPN: sakral parasempatik nükleus; ENS: enterik sinir sistemi; AP: area postrema; GI: gastrointestinal; mPVN: magnoselüler PVN; pPVN: parvoselüler PVN; NTS: nükleus traktus solitarius (Tache ve Bonaz 2007).

Nakade ve arkadaşları sıçanlarda intrasisternal CRF uygulamasının doza bağımlı olarak katı mide boşalımını inhibe ettiğini tespit etmiş olup, bu inhibitör etki guanitidin, propranolol (beta blokörü) ve çölyak ganglionektomi uygulanmış sıçanlarda ortadan kalkarken, non-selektif α -adrenerjik reseptör blokörü fentolamin uygulamasında bu etki gözlenmemiştir (Nakade ve ark., 2005). Aynı çalışmada 90 dk süreyle uygulanan stresin mide boşalımını yavaşlattığı görülmüş ve guanitidin, çölyak ganglionektomi ve CRF2R antagonisti astressin₂-B uygulaması bu inhibitör etkiyi ortadan kaldırmıştır (Nakade ve ark., 2005). Bu bulgular stresin mide boşalımını CRFR-2 ve periferel sempatik sinirler

aracılığıyla inhibe ettiğini göstermektedir. CRF'nin tip-2 reseptörünün bulunduğu NTS'den beyin sapındaki sempatik aktivitenin düzenlendiği birçok alana projeksiyonlar bulunmaktadır (Gilbey ve Spyer 1993; Bittencourt ve Sawchenko 2000). Ayrıca, NTS otonomik sinir sisteminin düzenlenmesiyle ilişki bölge olan RVLM'ye de efferent sinirlerini projekte etmektedir (Ross ve ark., 1985). RVLM, torakolomber spinal kordun sempatik intermedyolateral boynuzuna projeksiyonlar göndermekte olup, buradan çıkan noradrenerjik sinir lifleri ise çölyak ganglionda sinaps yapıp postganglionik lif olarak mide duvarında sonlanmaktadır (Luiten ve ark., 1985; McCall 1988).

Normal koşullarda, besinin mideye girişinin ardından midenin proksimal kısmında zayıf; distal bölgede ise kuvvetli peristaltik dalgalar meydana gelir. Proksimal kısımdaki tonik kasılmalar ile mide iç hacminin daralması sonucu besinlerin distal bölüme ilerlemesi gerçekleşir. Antruma doğru dalgaların kasılma gücü daha da artarak besinlerin karışması ve kimus formuna dönüşmesi sağlanır. Her peristaltik dalga pilora ulaştığında pilorun kasılıp kapanması ile kimusun büyük bir kısmı geri püskürtülür ve bu şekilde besinlerin parçalanması ve karışması sağlanır. İçerik mideden duodenuma periyodik olarak bolus şeklinde aktarılır (Hunt 1983; Burks ve ark., 1985). Sıvı ve katı maddelerin mideden boşalımı farklı mekanizmalar ile kontrol edilmekte olup, sıvılar öncelikli olarak mide ve duodenum arasındaki basınç gradienti ile mideyi kat eder. Katı besin maddelerinin boşalımı ise antrumdan pilora doğru yayılan güçlü ve koordineli kasılmalar ile gerçekleşmektedir (Ishiguchi ve ark., 2002; Nakade ve ark., 2006). Sıçanlarda yapılan çalışmalarda gerek hareket kısıtlama stresi yüklemesinin (Şekil 2.8A) gerekse santral ekzojen CRF uygulamasının (Şekil 2.8B) postprandial anto-pilorik kasılma koordinasyonunu bozarak mide boşalımını yavaşlattığı gösterilmiştir (Martinez ve ark., 1998; Nakade ve ark., 2005; Nakade ve ark., 2006). Strese bağlı artan antral ve pilorik kontraksiyonların genliği CRF reseptör antagonisti astressin₂-B ve guanitidin ile daha da artış gösterirken, atropin (antikolinerjik, muskarinik reseptör antagonisti), heksametonyum (antikolinerjik, nikotinik reseptör antagonisti) ve vagotomi uygulamalarında bu etki ortadan kalkmıştır. Sonuç olarak, bu bulgular sıçanlarda akut stresin mide boşalımı üzerine inhibitör etkisini sempatik yolak dışında vagal kolinerjik yolak üzerinden de gerçekleştirebileceğini göstermektedir (Nakade ve ark., 2006).



Şekil 2.8. Sıçanlarda hareket kısıtlama stresi (A) ve intra-sisternal CRF uygulamasının (B) postprandial antro-pilorik kasılmalara etkisi. Nakade ve arkadaşları'nın çalışmasından alınarak modifiye edilmiştir (Nakade ve ark., 2006).

2.13. Strese Bağlı Gastrointestinal Motor Değişikliklerde Oreksinlerin Rolü

Literatürde hipotalamik OXA ve CRF ilişkisine ve stres yanıtındaki etkileşimlerine işaret eden bulgular olsa da, OXA'nın stres koşullarında ortaya çıkan Gİ motor değişikliklerdeki rolünü inceleyen çalışmalar yok denecek kadar azdır. Bülbül ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada antral postprandial kasılmalarda strese bağlı gözlenen değişikliklerin OX1 reseptör antagonisti SB-334867 ile ortadan kaldırılması santral oreksinerjik sistemin streste meydana gelen bu değişikliklerde rolü olabileceğini düşündürmektedir (Bulbul ve ark., 2010a).

2.14. Hipotez

Stres koşulları altındaki sıçanların mide motilitesindeki bozulma, beyinde üretimi artan OXA'nın doğrudan ve CRF aracılı etkisine bağlıdır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurul onayı (B.30.2.AKD.0.05.07.00/133) ile Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Ünitesinden temin edilen erişkin, erkek Wistar sıçanlar üzerinde yapılmıştır. Tel kafeslerde standart laboratuvar yemi ve musluk suyu ile beslenen sıçanlar deneye başlamadan önce tartılarak canlı ağırlıkları kaydedilmiştir. Deneysel protokollerden önce hayvanlara 1 hafta süreyle günlük olarak ele alma işlemine tabi tutularak deneysel koşullara adaptasyonları sağlanmıştır.

3.1. Deney Grupları

3.1.1. Mikrodiyaliz Çalışması

LHA'dan OXA analizi için mikrodiyaliz

1. Grup: Kontrol + Taşıyıcı (aCSF) (n=10)
2. Grup: Hareket kısıtlama stresi + Taşıyıcı (aCSF) (n=10)
3. Grup: Hareket kısıtlama stresi + Santral α -helikal CRF₉₋₄₁ ön uygulaması (n=10)

PVN'den CRF analizi için mikrodiyaliz

1. Grup: Kontrol + Taşıyıcı (aCSF) (n=10)
2. Grup: Hareket kısıtlama stresi + Taşıyıcı (aCSF) (n=10)
3. Grup: Hareket kısıtlama stresi + Santral SB-334867 ön uygulaması (n=10)

3.1.2. Mide Boşalımı Ölçümleri

1. Grup: Kontrol + Taşıyıcı (aCSF) (n=10)
2. Grup: Santral α -helikal CRF₉₋₄₁ uygulaması (n=10)
3. Grup: Santral SB-334867 uygulaması (n=10)
4. Grup: Hareket kısıtlama stresi + Taşıyıcı (aCSF) (n=10)
5. Grup: Hareket kısıtlama stresi + Santral α -helikal CRF₉₋₄₁ ön uygulaması (n=10)
6. Grup: Hareket kısıtlama stresi + Santral SB-334867 ön uygulaması (n=10)
7. Grup: Hareket kısıtlama stresi + Santral α -helikal CRF₉₋₄₁ ve SB-334867 ön uygulamaları (n=10)

3.1.3. Mide Motilite Çalışması

1.Grup: Kontrol + Taşıyıcı (aCSF) (n=7)

2.Grup: Santral α -helikal CRF₉₋₄₁ uygulaması (n=7)

3.Grup: Santral SB-334867 uygulaması (n=7)

4.Grup: Hareket kısıtlama stresi + Taşıyıcı (aCSF) (n=7)

5.Grup: Hareket kısıtlama stresi + Santral α -helikal CRF₉₋₄₁ ön uygulaması (n=7)

6.Grup: Hareket kısıtlama stresi + Santral SB-334867 ön uygulaması (n=7)

7.Grup: Hareket kısıtlama stresi + Santral α -helikal CRF₉₋₄₁ ve SB-334867 ön uygulamaları (n=7)

3.1.4. Histolojik Çalışmalar

Hipotalamik OXA ve CRF arasındaki etkileşimin bazal ve stres koşullarında araştırılması

1.Grup: Kontrol + Taşıyıcı (aCSF) (n=5)

2.Grup: Hareket kısıtlama stresi + Taşıyıcı (aCSF) (n=5)

3.Grup: Hareket kısıtlama stresi + Santral α -helikal CRF₉₋₄₁ ön uygulaması (n=5)

4.Grup: Hareket kısıtlama stresi + Santral SB-334867 ön uygulaması (n=5)

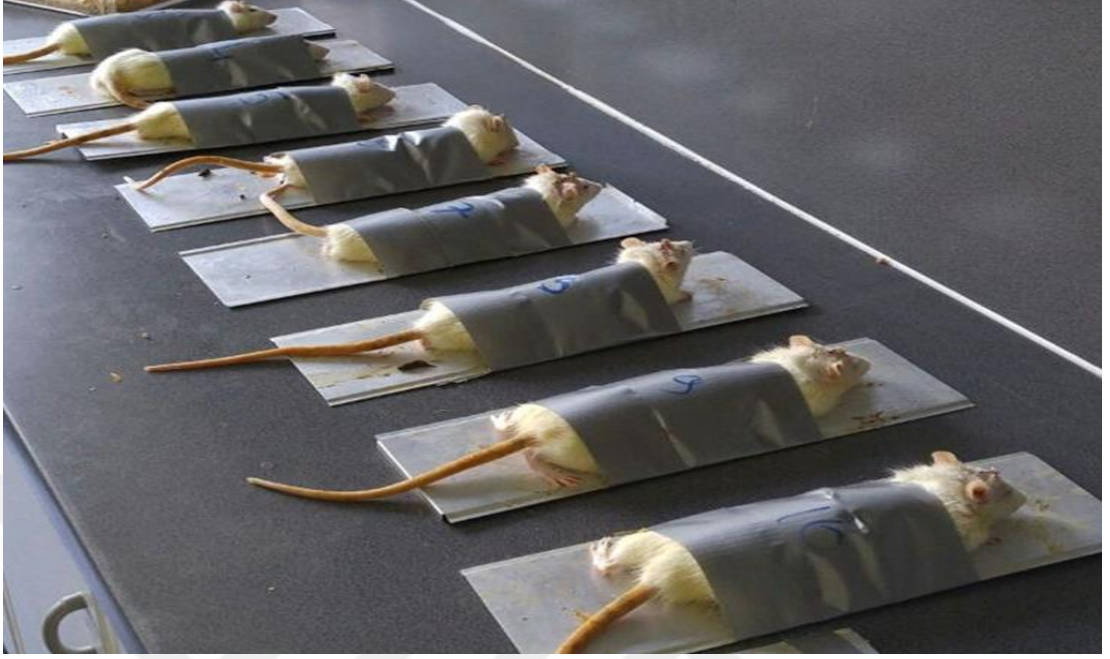
5.Grup: Hareket kısıtlama stresi + Santral α -helikal CRF₉₋₄₁ ve SB-334867 ön uygulamaları (n=5)

Hareket Kısıtlama Stresi (HKS): Sıçanların gövdelerinin 90 dakika süreyle ön ve arka bacakları hareket edecek şekilde 10x30 cm ölçülerindeki düz bir platform üzerine sabitlenmesi ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1).

aCSF: Yapay serebrospinal sıvı

SB-334867: Selektif Oreksin tip-I reseptör antagonisti

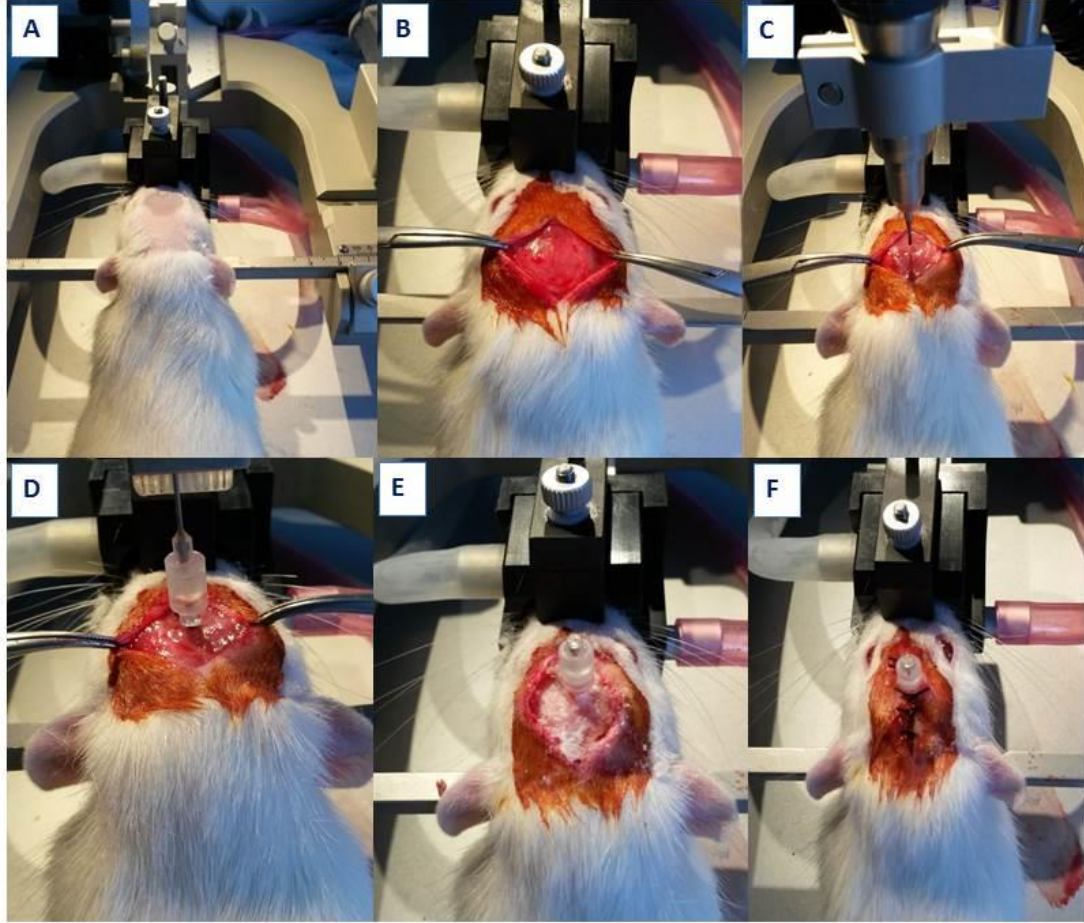
α -helikal-CRF₉₋₄₁: Non-selektif CRF reseptör antagonisti



Şekil 3.1. Sıçanların 90 dakika boyunca düz bir platforma sabitlenmesi ile oluşturulan hareket kısıtlama stresi (HKS).

3.2. Mikrodializ

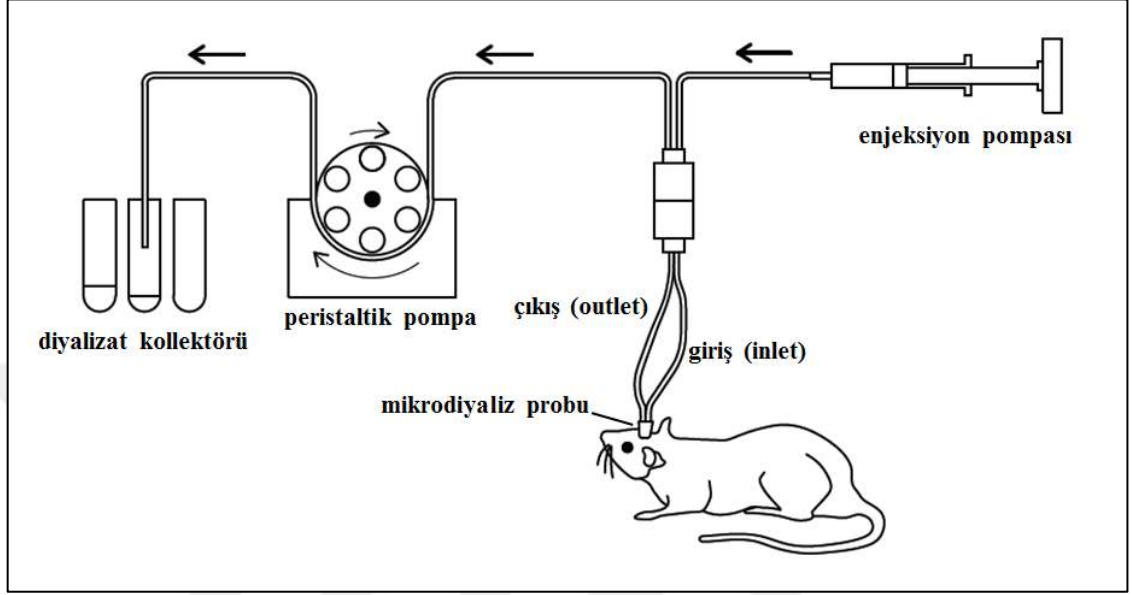
3.2.1. Cerrahi: Mikrodializ için gerçekleştirilen kanülasyon işlemi izofloran anestezisi altında (%5'lik konsantrasyonda indüksiyon başlatılıp, %2,5 konsantrasyonda ve 200-400 ml/dk akım hızında devam ettirilmiştir) ve stereotaksik aparat üzerinde gerçekleştirilmiştir. Hayvanlar stereotaksik aparat üzerine sabitlendikten sonra kafa bölgesine uygulanan orta hat insizyonunu takiben kas tabakaları ekarte edilip, kemiksel çatıya ulaşılmıştır. Paslanmaz çelikten yapılmış 0,44 mm çapındaki kanül bregma referans alınarak rostro-kaudal (RK): -1,88 mm, mediyo-lateral (ML): 2,0 mm ve dorso-ventral (DV): -7,4 mm koordinatlarında lateral hipotalamusa yerleştirilirken, PVN için ise bu koordinatlar RK: 1,8 mm, ML: 0,3 mm, DV: 7 mm olarak uygulanmıştır (Paxinos 1997). Kanüller dental sement ve 1 adet mikro çapa vidası kullanılarak kafatasına sabitlenmiş ve insizyon 3.0 ipek dikiş materyali kullanılarak kapatılmıştır (Şekil 3.2). Cerrahi işlemi takiben geçen 7 günlük toparlanma periyodu süresince kanülün dış ortam ile bağlantısı içerisine yerleştirilen dummy kanül aracılığıyla kesilmiştir. Polietilen membranlı, 1000 KDa moleküler cut-off özelliğindeki mikrodializ problemleri deneyden 24 saat önce LHA veya PVN'ye yerleştirilmiştir.



Şekil 3.2. Mikrodiyaliz için gerçekleştirilen stereotaksik cerrahi. **A:** hayvanın çerçeveye sabitlenmesi, **B:** kafa derisine uygulanan orta hat insizyonu, **C:** bregma referans alınarak elde edilen noktaya kanülün giriş deliğinin açılması, **D:** rehber kanülün yerleştirilmesi, **E:** kanülün dental sement ile kafatasına sabitlenmesi, **F:** kafa derisinin dikilip dummy kanülün yerleştirilip işlemin tamamlanması.

3.2.2. Mikrodiyalizatların Toplanması: Deney günü hayvanlar tabanında talaş altlık bulunan pleksiglas mikrodiyaliz kafeslerine alınarak probun giriş (enjeksiyon pompası) ve çıkışları (peristaltik pompa) 0,25 mm iç çapında, 0,55 mm dış çapındaki florin etilin propilen (FEP) tüp ile sağlandıktan sonra 2 saat süreyle 1 μ l/dk hızda perfüzyon gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3). Mikrodiyalizatların toplanması 2 saatlik stabilizasyon periyodunun ardından başlatılmış olup, örnekler 0.5 μ l/dk perfüzyon hızında buz üzerindeki ependorf tüpler içinde toplanmıştır. Toplanan örnekler biyokimyasal ölçümler yapılana kadar -80°C 'de saklanmıştır. Mikrodiyaliz örneklerinin toplanmasından 48 saat sonra LHA ve PVN bölgelerine yüksek konsantrasyonda (100 mM) KCl içeren aCSF ile perfüzyon uygulanarak ikinci bir mikrodiyalizat toplanmıştır. Mikrodiyaliz işleminin ardından kanülasyon alanları prob içerisinden 10 dk süreyle

%1'lik metilen mavisi geçirilerek işaretlenmiştir. Ardından histolojik doğrulama amacıyla hayvanlar feda edilip beyinleri çıkarılmıştır.



Şekil 3.3. Mikrodiyaliz için kullanılan deneysel düzenek.

3.3. Mide Boşalımı Ölçümü

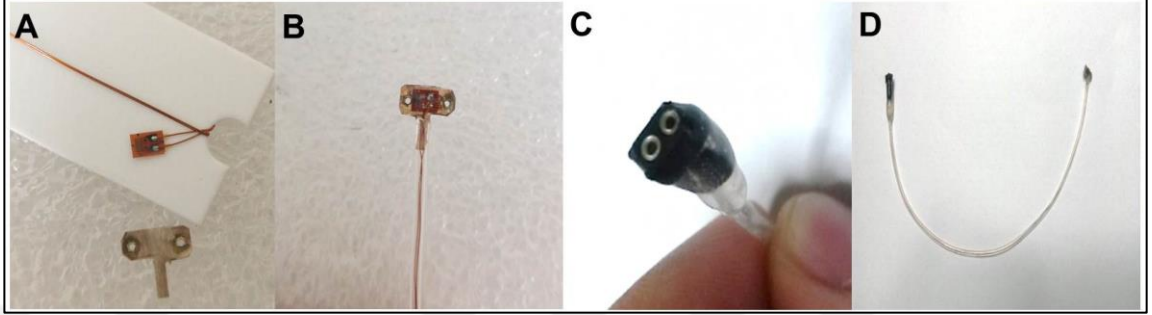
Mide boşalımı için 24 saat aç bırakılan sıçanlara önceden tartılmış 1.6 g ağırlığındaki pelet yemler verilmiştir. Peletlerin tüketilmesini takiben geçen 90 dakika sonunda hayvanlar izofloran anestezisi altında eksanguinasyon ile feda edilerek mideleri çıkarılmış ve mide içerikleri ağırlığı önceden hesaplanmış tartım kaplarına alınarak oda ısısında 72 saat kurutulmuştur. Kurutma işlemi sonunda mide içerikleri tartılıp başlangıç ağırlığına oranlanarak, mideyi terk eden kısım aşağıda verilen formüle göre yüzde (%) olarak ifade edilmiştir.

$$\text{Mide Boşalımı (\%)} = 1 - (\text{kurutulan içerik ağırlığı} / \text{tüketilen total pelet ağırlığı}) \times 100$$

3.4. Mide Motilitesi Kaydı

3.4.1. Transdüser Hazırlanması: 120 Ohm resistansa sahip strain gage'ler, 0,127 mm kalınlığındaki bakır folyodan T-şeklinde kesilen kalıplar üzerine siyanoakrilat sement ile yapıştırılıp preslendikten sonra üzeri medikal implant sınıfında silikon ile ince bir tabaka halinde kaplanıp 24 saat oda ısısında kurumaya bırakılmıştır. Strain gage kablolar gerekli ölçüde kısaltılıp 24G kalınlığındaki silikon tüp içinden geçirilerek kabloların

uçlarına soketler lehimlenmiştir. Sıcak tutkal ile kaplanan soketler oda ısısında kurumaya bırakılmıştır (Şekil 3.4). Strain gage transdüserlerin her biri yerleştirilmeden önce numaralanarak 5 g ağırlığa karşı kalibre edilmiştir.



Şekil 3.4. Strain gage transdüser yapım aşamaları. **A:** Strain gage ve bakır levhadan hazırlanmış kalıp materyal, **B:** Strain gage'in T-şeklinde bakır folyoya yapıştırılması ve silikon tüp içerisine alınması, **C:** Strain gage kablo uçlarının soket ile lehimlenmesi ve sıcak tutkal ile kapatılması, **D:** Yerleştirilmeye hazır hale gelmiş transdüser.

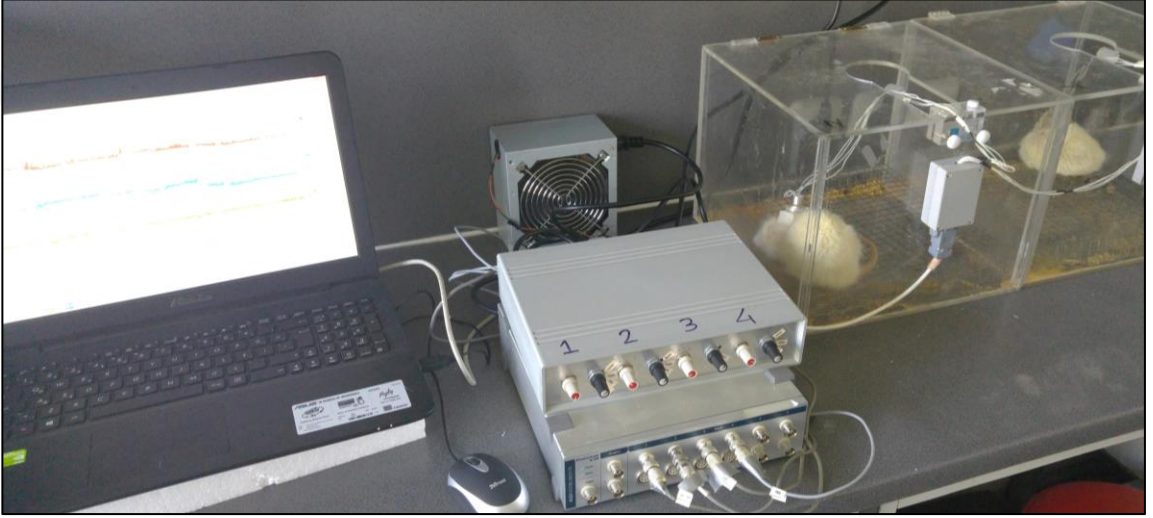
3.4.2. Transdüser Yerleştirilmesi: 18-24 saat aç bırakılmış hayvanların karın bölgesi izofloran anestezisi altında orta hat insizyonu ile açılarak mide ekspoze edilmiştir. İki adet strain gage transdüser antrum ve pilora serozal olarak 5.0 ipek ile yerleştirilmiştir (Şekil 3.5). Karın duvarı kapatılarak transdüserler deri altından ilerletilip inter-skapular bölgeden dışarı çıkarılarak 3.0 ipek ile cilt üzerine sabitlenmiştir. Transdüserlerin zarar görmemeleri için hayvanlara post-operatif dönemde özel bir koruyucu ceket giydirilmiştir.



Şekil 3.5. Transdüser cerrahi işlemi. **A:** İnsizyonu takiben midenin ekspoze edilmesi, **B:** Transdüserlerin serozal olarak yerleştirilmesi, **C:** Transdüserlerin deri altından çıkarılması.

3.4.3. Motilite Kaydı: Yedi günlük toparlanma periyodunun ardından, 18-24 saat aç bırakılan hayvanlar kayıt için pleksiglas materyalden yapılmış kafeslere alınıp transdüserler “bridge amplifier” ve kayıt sistemine (PowerLab 8/35) bağlanarak kayıt işlemi başlatılmıştır (Şekil 3.6). Belirli bir süre açlık motor patern kaydı alındıktan sonra sıçanlara 1.6 g ağırlığındaki pelet yemler verilmiştir. Yem tüketimini takiben oluşacak

olan koordineli antro-pilorik kasılmalar gözlenilmiş, ardından santral enjeksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyonu takiben geçen 15 dakika süre sonunda hayvanlar 90 dakikalık HKS uygulamasına alınarak stres ve stres sonrası dönemde antro-pilorik kasılmalar kaydedilmiştir. Motilite kayıtlarının analizi “LabChart” yazılım programı aracılığıyla 50 hz düşük frekans filtre uygulanarak gerçekleştirilmiş olup, kayıtlarda stres ile stres öncesi dönem kıyaslanarak % değişim olarak ifade edilmiştir. Motilite index analizi eğri altı kalan alan hesaplanarak analiz edilmiştir.



Şekil 3.6. Serbest hareket eden uyanık sıçanlar için oluşturulan motilite kayıt düzeneği.

3.5. Santral İlaç Uygulamaları

3.5.1. İntraserebroventriküler (icv) kanülasyon

Mikrodiyaliz, mide boşalımı ve motilite kaydı çalışmalarında kullanılacak tüm hayvanlarda santral aCSF, SB-334867, α -CRF₉₋₄₁, OXA ve CRF uygulamaları için intraserebroventriküler (icv) kanülasyon yapılmıştır. Bunun için izofloran anestezisi altında kafa bölgesine uygulanan orta hat kesisinin ardından kas ve bağ doku ekarte edildikten sonra kemiksel çatıya ulaşıp bregma açığa çıkarılmıştır. 24 G kalınlığındaki steril plastik kanül 0,8 mm RK, ve 1,4 mm ML koordinatlarında açılmış delikten 4 mm ventral yönde ilerletilip dental sement ile kafatasına sabitlenmiştir. Kanülasyon mide motilitesi ve mikrodiyaliz grubundaki cerrahi işlemlerle aynı anda yapılmıştır. Cerrahiden 24 saat sonra kanülasyonun doğrulanması için hayvanlara Angiotensin II 150 ng/5 µl konsantrasyonda enjekte edilerek oluşan pozitif dipsojenik etki gözlemlenmiştir. Enjeksiyonu takiben 2 dakika süre içinde su içme davranışı gösteren sıçanlar deney

gruplarına dahil edilmiş, 120 saniyenin üzerinde latans gösteren hayvanlar ise deney dışı bırakılmıştır.

3.5.2. İntraserebroventriküler İlaç Uygulamaları

Bir haftalık toparlanma periyodunun ardından deney günü OX1R antagonisti SB-334867, non-selektif CRF reseptör antagonisti α -helikal-CRF₉₋₄₁, OXA ve CRF sıçanlara icv olarak uygulanmıştır. SB-334867 40 μ g (Nozu ve ark., 2012; Sinen ve ark., 2015); α -helikal-CRF₉₋₄₁ 30 μ g (Coskun ve ark., 1997); OXA 20 μ g (Bulbul ve ark., 2010b) ve CRF 1 μ g dozda (Tache ve ark., 1987) 5 μ l hacim içerisinde 33G kalınlığındaki enjeksiyon kanülüne polietilen borucuk ile bağlı bir Hamilton şırıngası ile uygulanmıştır. Taşıyıcı olarak yapay serebrospinal sıvı (aCSF) 5 μ l hacimde uygulanmıştır. Enjeksiyon işlemi 1 dakika süresince yapılmış olup, uygulama sonrası enjeksiyon kanülü 30 saniye icv kanül içerisinde bekletilerek çözeltinin ventrikül içine difüze olması sağlanmıştır. Tüm icv enjeksiyonlar stres yüklemesinden 30 dk önce gerçekleştirilmiştir.

3.6. Plazma kortikosteron ölçümleri: Kortikosteron ölçümleri HKS ve antagonist uygulamalarının ardından toplanılmış periferik (abdominal aort) kan örneklerinde EIA yöntemi ile ticari kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.7. Mikrodializ örneklerinde OXA ve CRF ölçümü: -80°C'de saklanan hipotalamik mikrodializatlar buz üzerinde çözündürülerek örneklerdeki OXA ve CRF seviyeleri ticari kit kullanılarak EIA yöntemiyle ölçülmüştür.

Prensip: Yöntem kit içerisinde bulunan işaretli peptid ile ölçümü yapılan peptid arasındaki yarışmayı temel alan bir antijen-antikor reaksiyonudur.

İşlemler: OXA, CRF ve CORT kitleri ile mikrodializatlar oda ısısına getirildikten sonra,

- 1- Primer antikor, biyotinlenmiş peptid, pozitif kontrol (PK), total bağlanma (TB), streptavidin horseradish peroksidaz (SA-HRP) ve standart tüpleri hazırlanmıştır.
- 2- Standartlar (0,01-100 ng aralığında) sulandırılmış ve standart kuyularına eklenmiştir.
- 3- TB kuyularına 50 μ L sulandırıcı buffer eklenmiştir.
- 4- PK kuyularına 50 μ L rehidre olmuş pozitif kontrol eklenmiştir.
- 5- Mikrodializatlar kalan diğer kuyulara 50 μ L hacimde eklenmiştir.

- 6- Blank kuyularının dışındaki tüm kuyulara 25 µL rehidre olmuş primer antikor eklenmiştir.
- 7- Blank kuyularının dışındaki tüm kuyulara 25 µL rehidre olmuş ve biyotinlenmiş peptit eklenmiştir.
- 8- Kuyuların üstü kapatılarak 2 saat oda ısısında (20-23°C) inkübe edilmiştir.
- 9- Tüm kuyular 4 x 350 µL hacimde yıkandıktan sonra 100 µL SA-HRP solüsyonu eklenmiştir.
- 10- Kuyuların üstü kapatılarak 1 saat oda ısısında (20-23°C) inkübe edilmiştir.
- 11- Tüm kuyular 4 x 350 µL hacimde tekrar yıkandıktan sonra 100 µL TMB solüsyonu eklenmiştir.
- 12- Kuyuların üstü ışıktan korunacak şekilde kapatılarak 1 saat oda ısısında (20-23°C) inkübe edilmiştir.
- 13- Reaksiyonun durdurulması için kuyulara 100 µL hidroklorik asit eklenmiştir.
- 14- 450 nm dalga boyunda “microplate” okuyucu ile okuma yapılmıştır.
- 15- Standart grafiği çizilmiş ve bu grafiğe bağlı olarak örneklerdeki OXA miktarı pg/ml, CRF ve CORT miktarları ise ng/ml şeklinde hesaplanmıştır.

3.8. Kan Basıncı Ölçümü: İnvazif olmayan tail cuff yöntemiyle kuyruk arterlerinden ölçülmüştür. Kuyruğa geçirilen halka şeklindeki basınç probundan alınan sinyaller MP 150 veri toplama sistemi ve MAY-BPHR 9610-PC ünitesi aracılığıyla bilgisayar ortamına aktarılmıştır. Her sıçan için Acknowledge 3.8 paket programı aracılığıyla en az üç basınç trasesi enjeksiyon öncesi ve sonrası dönemde kaydedilmiş, sonuçlar ortalama arteriyel basınç (mmHg) olarak ifade edilmiştir.

3.9. İmmünohistokimya

3.9.1. İmmünohistokimya Tekniği için Doku Hazırlanması

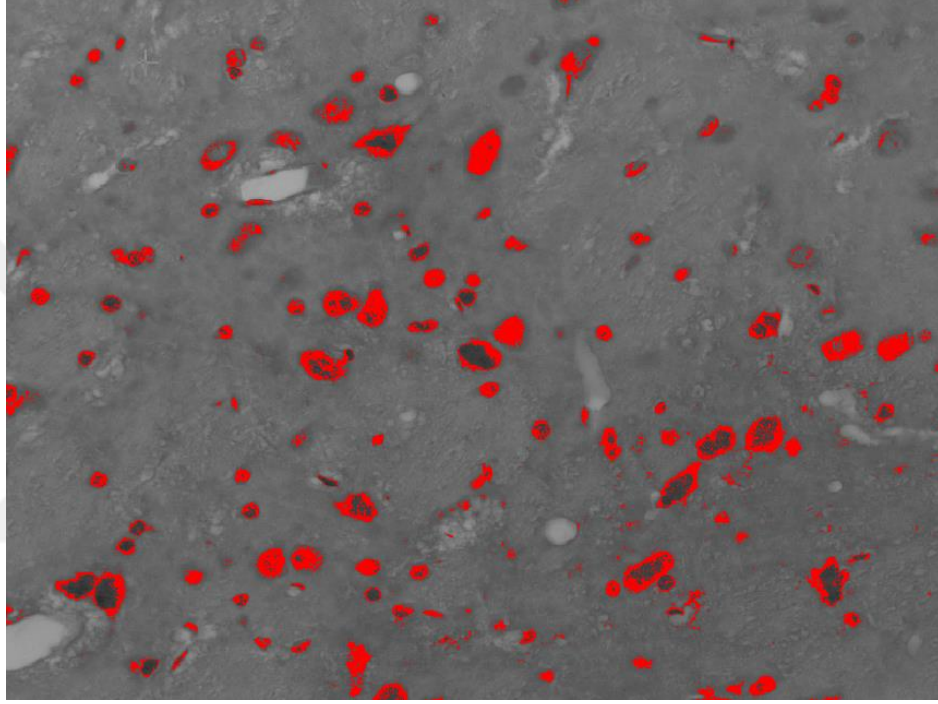
Mide boşalımı çalışmasında kullanılan hayvanlara yapılan transkardiyak perfüzyon işleminin ardından çıkarılan beyin dokuları %10'luk formalin fiksatifine alınmıştır. Dokular 1 gecelik fiksasyonun ardından %70, %80, %90'luk alkollerde 24 saat bekletilmiş ve en son %100'lük alkolde 3 saat tutularak dehidratasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ksilol içerisinde birkaç saniye bekletilerek şeffaflaştırılan dokular

58°C'lik etüvde, 3 defa 1'er saat parafinize edilmiştir. 3. saatin sonunda dokular temiz parafine gömülerek parafinin oda ısısında donması sağlanmıştır.

3.9.2. İmmünohistokimya Protokolü

İn vivo deneyler için doku bloklarından alınan 5 µm kalınlığındaki kesitler superfrost (manyetik olarak statik) lamalar üzerine alınarak 1 gece boyunca 37°C'lik etüvde bekletilmiştir. Deparafinizasyon için iki kere 10'ar dakika ksilollerden geçirilmiş ve her birinde 5 dakika olmak kaydıyla %100, %90, %80, %70'lik alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edilmiştir. Kesitler distile suda çalkalanmış ve fosfat tamponlu tuz çözeltisinde (PBS; pH: 7.2-7.4) üç kez 5 dakika süreyle yıkanmıştır. Antijenik maskelenmenin giderilmesi amacıyla, kesitler 200 ml sitrat tamponuna (pH:6.0) konularak mikrodalga fırında 6 dakika 750W'ta kaynatılmıştır. Mikrodalga fırını dışına alınan kesitler 20 dakika oda ısısında soğumaya bırakılmıştır. Hidrofobik kalemle etrafı çizilen kesitler, distile sudan ve ardından PBS'ten 5'er dakika sürelerle geçirilmiştir. Kesitler endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için metanolle hazırlanmış %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda 20 dk inkübe edilmiştir. Kesitler PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandıktan sonra spesifik olmayan immunoglobulin (Ig) bağlanmalarını önlemek amacıyla bloklama solüsyonu ile 5 dakika muamele edilmiştir. Bloklama solüsyonu uzaklaştırılarak kesitler anti-Oreksin A (1:200) ve anti-CRF (1:200) primer antikoları ile + 4°C'de gece boyu inkübe edilmiştir. Negatif kontrol kesitlerine primer antikor yerine izotip kontroller uygulanmıştır. Kesitler inkübasyon sonunda PBS ile üç defa beşer dakika yıkanmıştır. Daha sonra sırasıyla, 30 dakika biyotinlenmiş anti- tavşan sekonder antikor ile inkübe edilmiş ve 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkamanın ardından 20 dakika streptavidin peroksidaz kompleksi ile oda ısısında inkübe edilmesi sağlanmıştır. Daha sonra 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkanan kesitler DAB ile 2-5 dk inkübe edilmiş ve kesitler distile suya alınmıştır. Daha sonra Mayer hematoksilin ile 10 sn zıt boyama uygulanarak ve akar musluk suyunda yıkanılmıştır. Kesitler gliserol jelatini kapatma solüsyonu ile kapatılmış, Axioplan ışık mikroskopunda (Zeiss, Almanya) farklı gruplara ait kesitlerdeki anti-Oreksin A ve anti-CRF immünoaktiviteleri tespit edilip, incelenerek fotoğraflanmıştır.

OXA ve CRF boyanma yoğunlukları 40X objektif büyütmesinde çekilmiş fotoğraflardan IMAGEJ yazılım programı aracılığıyla analiz edilmiştir. Program, hücresel boyanma yoğunluklarının kırmızı renkte tespit edilmesi ve oluşan kırmızı renklerin toplam alandaki yüzdesini vermektedir (Şekil 3.7). Gruplardaki boyanma yoğunlukları aCSF grubuna göre % değişim olarak ifade edilmiştir.



Şekil 3.7. IMAGEJ yazılım programı ile reaktivite yoğunluk analizi. Kırmızı renk hücresel reaktivite yoğunluğunu göstermektedir.

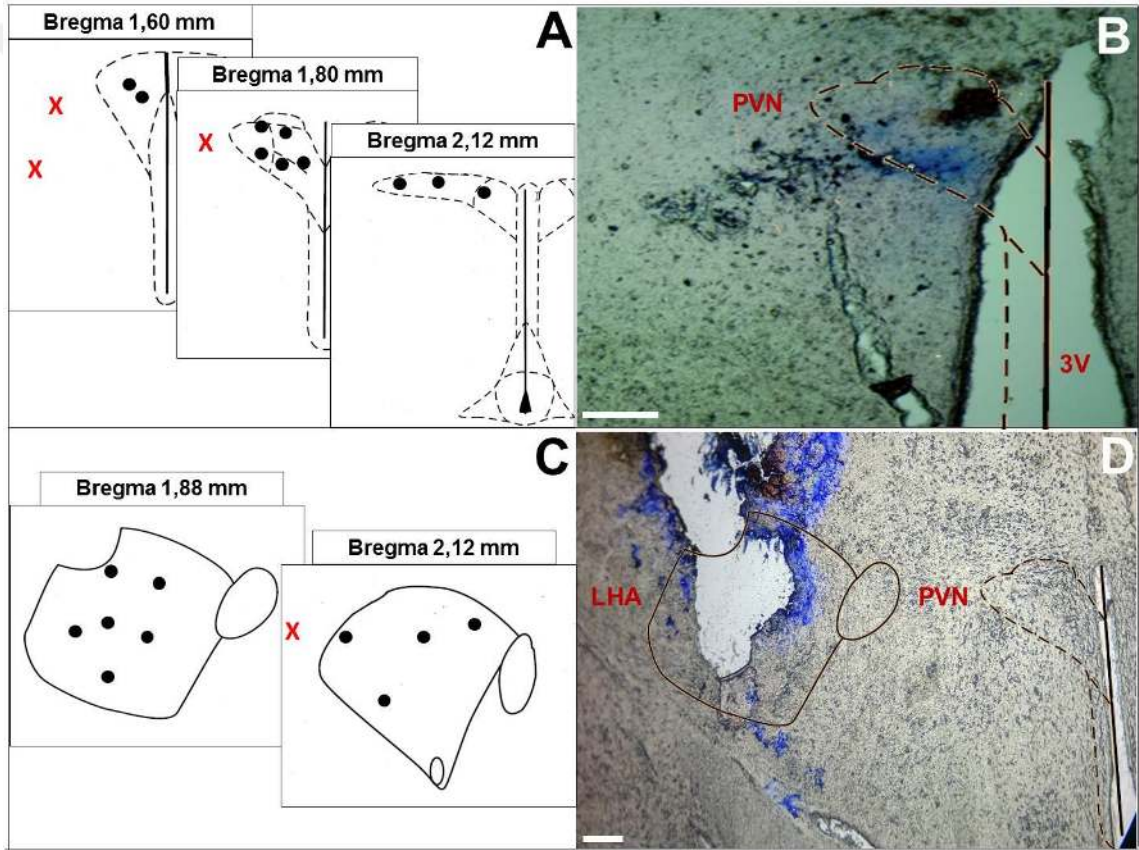
3.10. İstatistiksel Analiz

Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edilmiştir. Mikrodializ, mide boşalımı ve plazma kortikosteron sonuçlarının analizi için “Tek yönlü varyans analizi (ANOVA)” ve ikili karşılaştırmalar için “Tukey Post Hoc” testi kullanılırken, mide motilitesi ve immunohistokimyasal sonuçların değerlendirilmesinde ise “Kruskal Wallis” testi ve ikili karşılaştırmalar için “Mann-Whitney U” testi kullanılmıştır. Kan basıncı ölçümlerinin analizi için ise eşleştirilmiş t-testi kullanılmıştır. Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

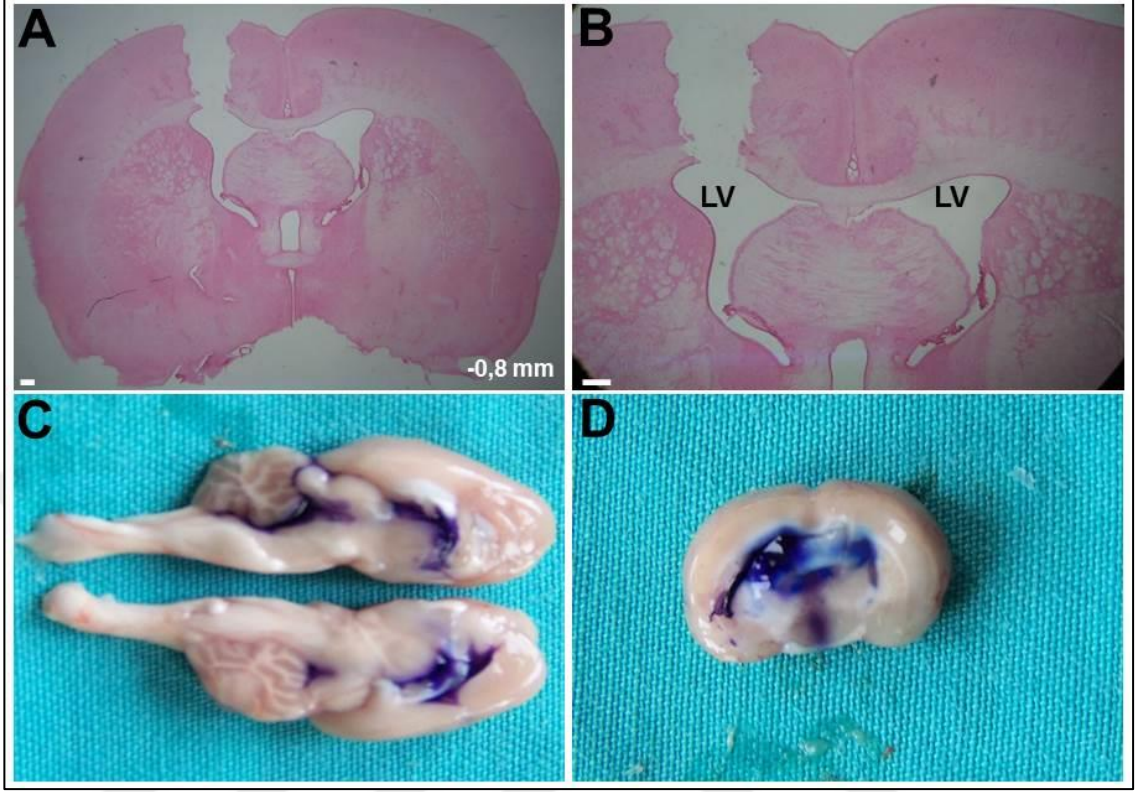
4. BULGULAR

4.1. Mikrodializ ve İcv Kanülasyon İçin Giriş Koordinatlarının Tespiti

Deney gruplarında mikrodializ işlemi sonrası hayvanlardan elde edilen giriş koordinatları ve histolojik doğrulanması Şekil 4.1’de; icv kanülasyonun histolojik ve makroskopik doğrulanmasına ilişkin veriler Şekil 4.2’de sunulmuştur. Histolojik değerlendirme sonucunda LHA ve PVN sınırları dışında kalan alanlardan elde edilen veriler deney haricinde bırakılmış ve hesaplamalara dahil edilmemiştir.



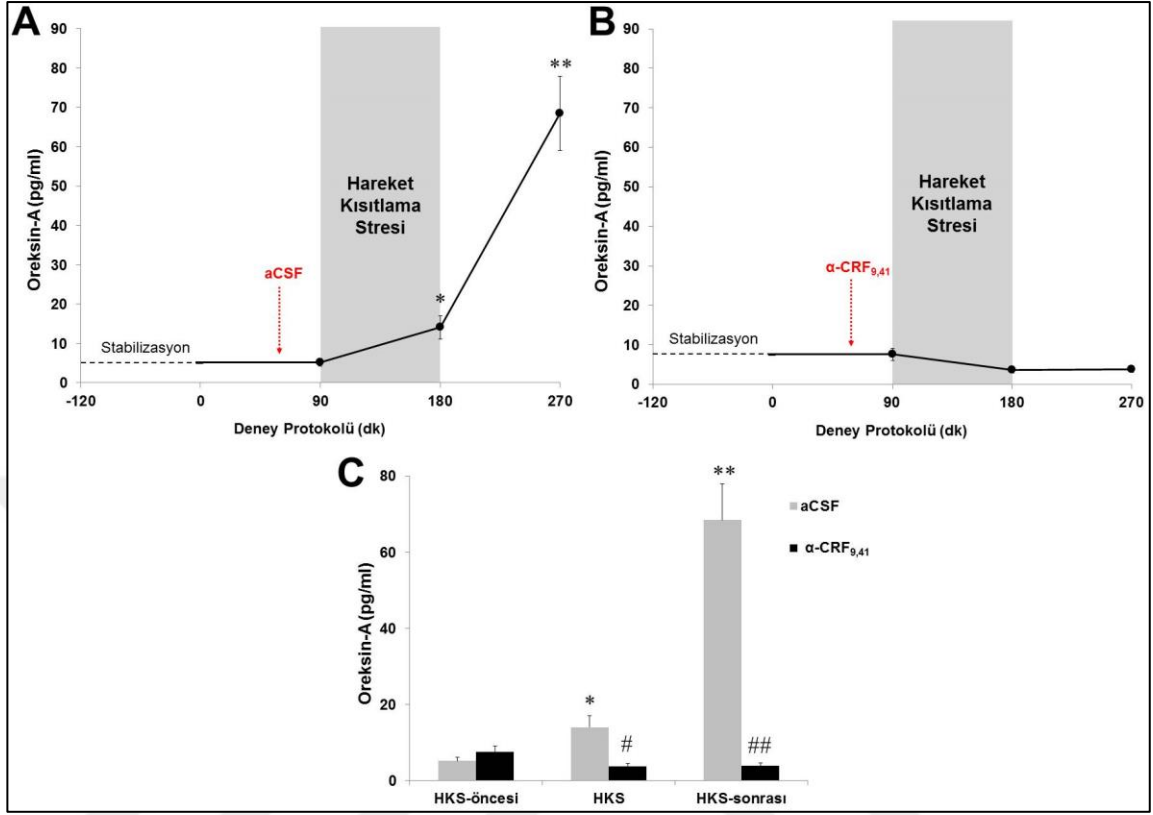
Şekil 4.1. Deney gruplarında mikrodializ için gerçekleştirilen kanülasyonların dağılımı. A, C; LHA ve PVN’ye uygulanan kanülasyonlar. Siyah dairesel işaretler LHA ve PVN sınırları içerisinde kalan; kırmızı çarpı işaretleri ise bu alanların dışında kalan kanülasyonları ifade etmektedir. İşaretlemeler 2 mm uzunluğundaki prob membranının oluşturduğu lezyonun orta noktası baz alınarak yapılmıştır. B, D; LHA ve PVN’deki kanülasyonların histolojik doğrulanması. Perfüze edilen metilen mavisi solüsyonunun kalıntıları LHA ve PVN sınırları içerisinde görülmektedir. PVN: paraventriküler nükleus, LHA: lateral hipotalamik alan, 3V: üçüncü ventrikül. Skala bar: 200 µm.



Şekil 4.2. İcv kanülasyonun histolojik (A, B) ve makroskopik (C, D) doğrulaması. Histolojik kesitlerde sağ lateral ventriküle uygulanan kanülasyonun neden olduğu doku hasarı görülmektedir. Makroskopik doğrulamada metilen mavisi solüsyonunun ventriküler sistemdeki dağılımı sagittal (C) ve koronal (D) kesitlerde gösterilmiştir. LV: lateral ventrikül. Skala bar: 500 µm.

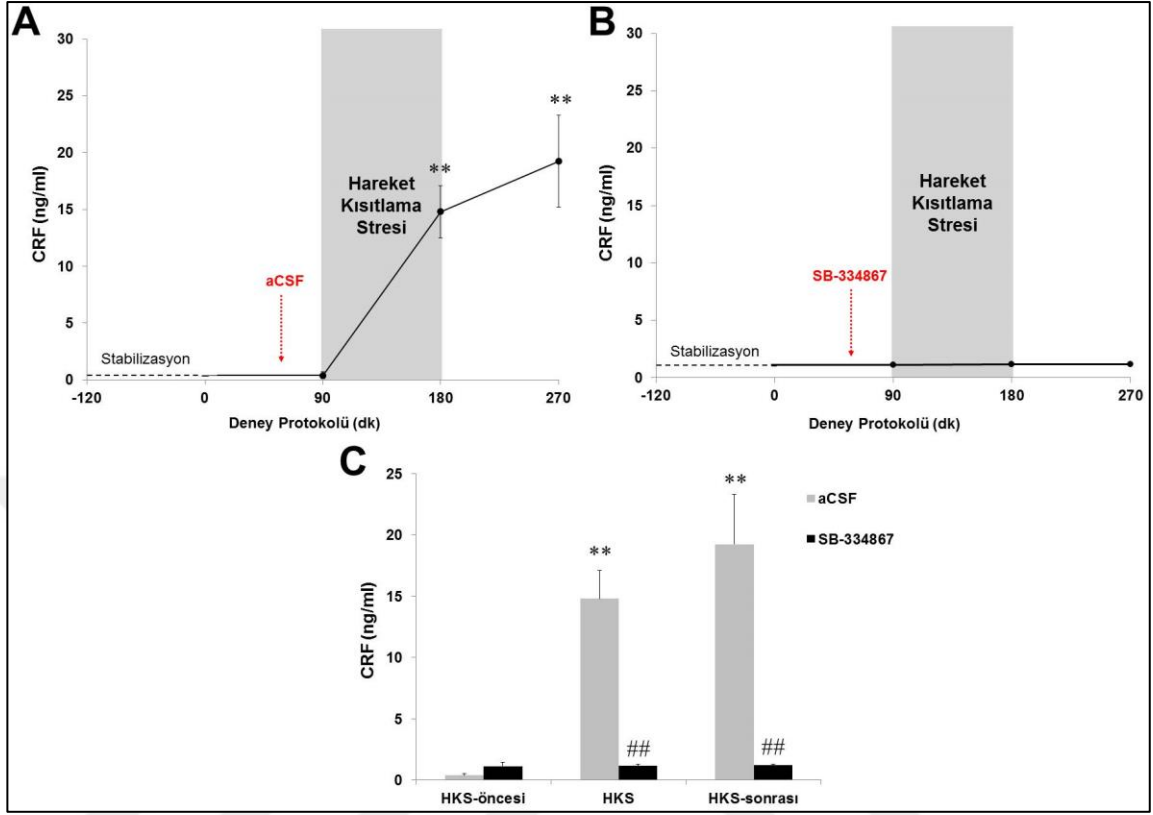
4.2. Mikrodializ

Mikrodializ çalışmasında 90 dk süreyle HKS uygulanan sıçanlardan elde edilen mikrodializatlarda OXA seviyeleri stres ($14,07 \pm 2,99$ pg/ml; $p < 0,05$) ve stres sonrası periyotta ($68,49 \pm 9,45$ pg/ml) bazal koşullara altında elde edilen mikrodializatlara ($5,16 \pm 0,95$ pg/ml) göre anlamlı derecede ($p < 0,01$) yüksek bulunmuştur (Şekil 4.3A). CRF antagonisti α -helikal CRF_{9,41} ön uygulaması, strese bağlı LHA'da artan OXA seviyelerini ($3,85 \pm 2,71$ pg/ml) anlamlı derecede (stres sırasında $p < 0,05$; stres sonrasında $p < 0,01$) engelleyerek kontrol seviyelerine çekmiştir (Şekil 4.3B).



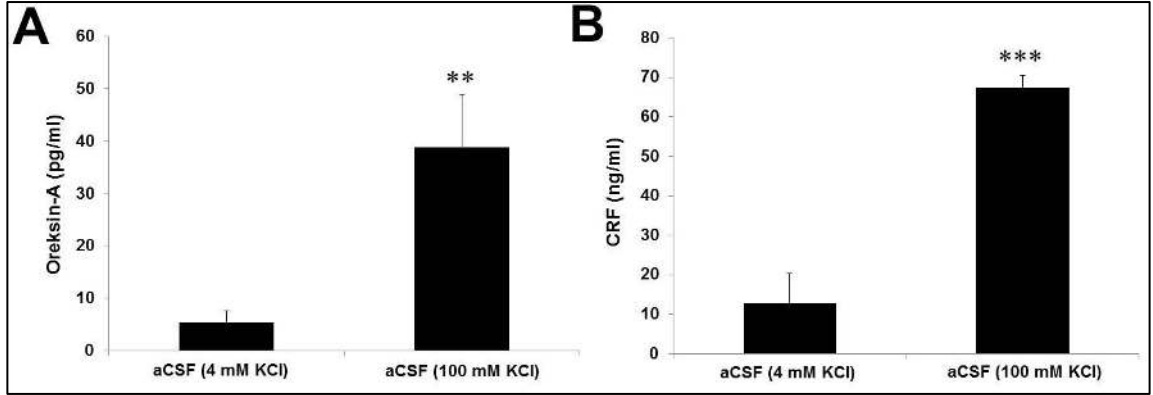
Şekil 4.3. LHA'dan elde edilen mikrodializatlarda ölçülen OXA seviyeleri. A: aCSF ön uygulaması ile elde edilen OXA seviyeleri, B: Non-selektif CRF reseptör antagonisti α -helikal CRF_{9,41} (30 μ g, icv) ön uygulaması ile elde edilen OXA seviyeleri. C: A ve B çizgi grafiklerinin histogram şeklinde gösterimi. aCSF: yapay serebrospinal sıvı; HKS: hareket kısıtlama stresi. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ HKS öncesine göre; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ aCSF grubuna göre istatistiksel farkı işaret etmektedir. Tüm gruplarda $n = 10$. İstatistiksel analiz; student t-testi.

PVN'den elde edilen mikrodializatlardaki CRF seviyeleri, HKS'ye cevaben stres yüklemesi esnasında ($14,79 \pm 3,29$ ng/ml) ve stres sonrasında ($19,24 \pm 4,05$ ng/ml) anlamlı derecede ($p < 0.01$) artış göstermiş olup, bu artış OX1R antagonisti SB-334867 ön uygulaması ile ortadan kalkmıştır ($1,20 \pm 0,25$ ng/ml; $p < 0,01$) (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. PVN'den elde edilen mikrodializatlarda ölçülen CRF seviyeleri. A: aCSF ön uygulaması sonrasında elde edilen örneklerdeki CRF seviyeleri, B: OX1R antagonisti SB-334867 (40 µg, icv) ön uygulaması sonrasında elde edilen örneklerdeki CRF seviyeleri. C: A ve B çizgi grafiklerinin histogram şeklinde gösterimi. aCSF: yapay serebrospinal sıvı; HKS: hareket kısıtlama stresi. ** $p < 0.01$ HKS öncesine göre; ## $p < 0.01$ aCSF grubuna göre istatistiksel farkı işaret etmektedir. Tüm gruplarda $n=10$. İstatistiksel analiz; student t-testi.

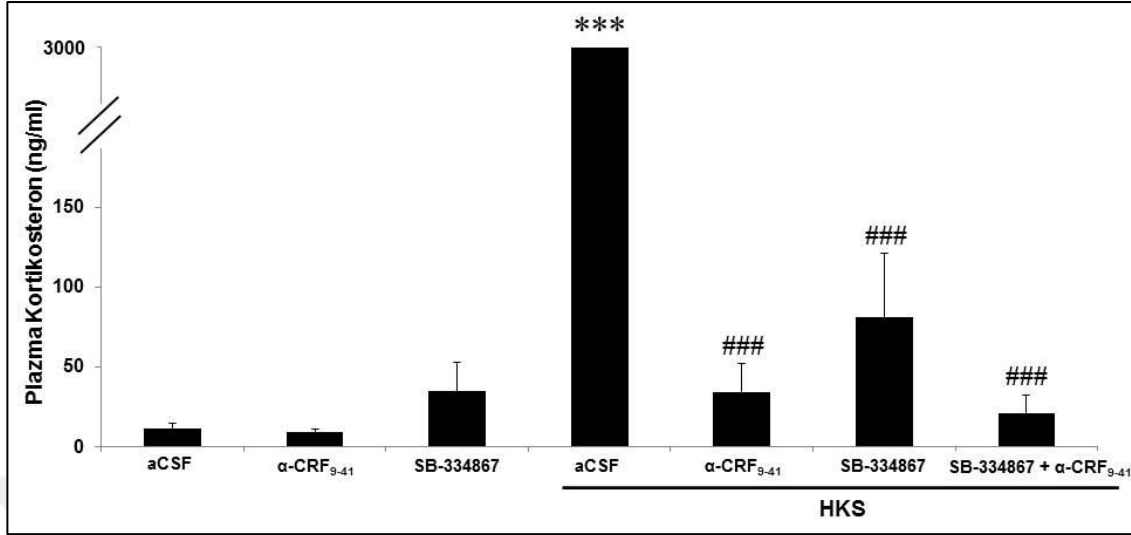
Mikrodializ örneklerinin toplanmasından 48 saat sonra LHA ve PVN bölgelerine yüksek konsantrasyonda (100 mM) KCl içeren aCSF ile perfüzyon uygulanmıştır. Bu alanlardan KCl uyarımı ile elde edilen örneklerdeki OXA ve CRF seviyelerinde anlamlı derecede (OXA için $p < 0.01$; CRF için $p < 0.001$) artış tespit edilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Yüksek konsantrasyonda potasyum klorür (100 mM) içeren aCSF perfüzyonu ile LHA'dan elde edilen mikrodializatlarda ölçülen OXA (A) ve PVN'den elde edilen mikrodializatlarda ölçülen CRF (B) seviyeleri. aCSF: yapay serebrospinal sıvı. ** $p<0.01$; *** $p<0.001$ aCSF grubuna göre farkı işaret etmektedir. Tüm gruplarda $n=10$. İstatistiksel analiz; student t-testi.

4.3. Plazma Kortikosteron Seviyeleri

OXA ve CRF'nin strese bağlı gelişen nöro-endokrin yanıtındaki etkilerini incelemek amacıyla plazma kortikosteron seviyeleri ölçülmüştür. Doksan dakika süreyle HKS uygulanan sıçanlardan elde edilen kan örneklerinde plazma kortikosteron seviyeleri ($3045,9 \pm 318,1$ ng/ml) kontrol grubuna göre ($11,8 \pm 4,4$ ng/ml) anlamlı ($p<0.001$) derecede yüksek bulunmuştur. SB-334867 ($81,4 \pm 39,9$ ng/ml) ve α -helikal CRF₉₋₄₁ ($34,4 \pm 17,6$ ng/ml) ön uygulaması strese bağlı artan plazma kortikosteron seviyelerini anlamlı şekilde ($p<0.001$) azaltmıştır. Antagonistlerin beraber uygulandığı hayvanlardan elde edilen örneklerdeki kortikosteron seviyeleri ($21,1 \pm 4,61$ ng/ml) kontrol seviyelerine gerilemiştir. Her iki antagonistin bazal koşullardaki santral uygulamaları plazma kortikosteron seviyesinde anlamlı bir etkiye neden olmamıştır (Şekil 4.6).



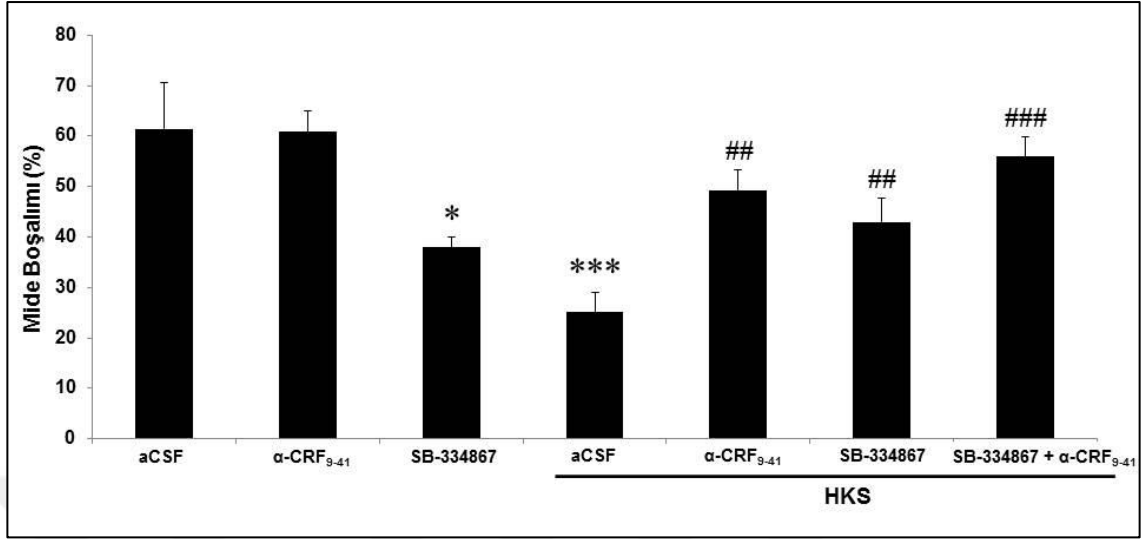
Şekil 4.6. Plazma örneklerinde ölçülen kortikosteron seviyeleri. ***p<0.001 aCSF grubuna göre; ###p<0.001 HKS grubuna göre istatistiksel farkı ifade etmektedir. aCSF: yapay serebrospinal sıvı; HKS: hareket kısıtlama stresi. Tüm gruplarda n=10. İstatistiksel analiz; student t-testi.

4.4. Mide Boşalımı

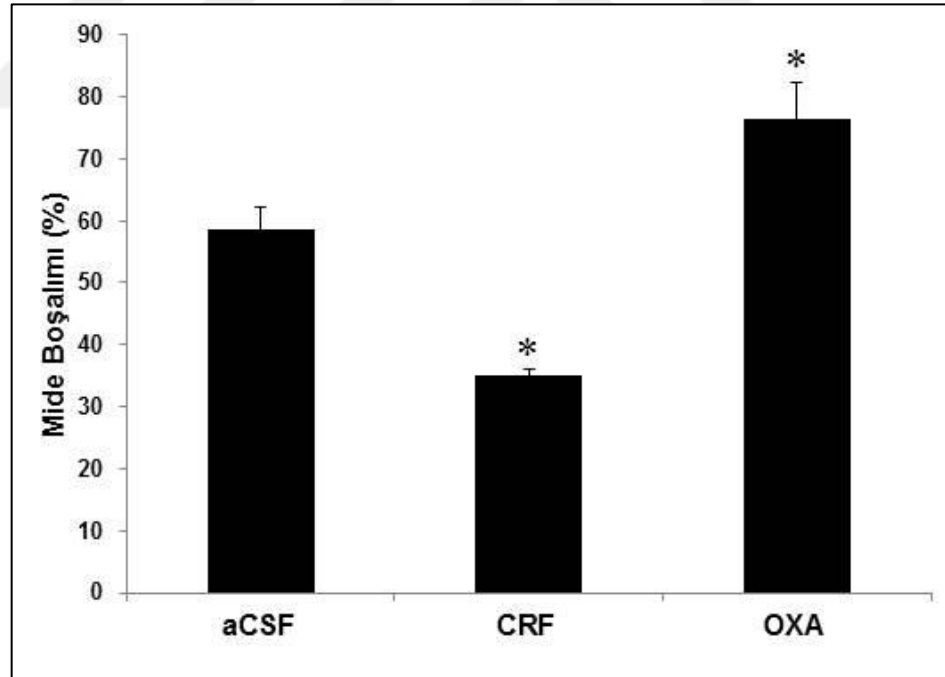
Stres uygulanmayan kontrol sıçanlarında $61,42 \pm 9,15$ olarak tespit edilen katı mide boşalımı, HKS yüklemesi sonucu anlamlı derecede ($p<0.001$) yavaşlayarak $25,13 \pm 3,86$ olarak ölçülmüştür. Santral OX1R antagonisti SB-334867 ve CRF antagonisti α -helikal CRF₉₋₄₁ ön uygulamaları HKS'nin mide boşalımı üzerine olan yavaşlatıcı etkisini anlamlı olarak (SB-334867 için $42,95 \pm 4,65$; $p<0.01$; α -helikal CRF₉₋₄₁ için $49,28 \pm 3,98$; $p<0.01$) düzelttiği saptanmıştır. Öte yandan, her iki antagonistin birlikte uygulandığı hayvanlarda ise mide boşalımının HKS'ye bağlı olarak yavaşlaması tamamen ortadan kalkmıştır ($55,98 \pm 3,8$; $p<0.001$) (Şekil 4.7).

Endojen OXA ve CRF'nin mide boşalımı üzerine olan santral etkisini incelemek amacıyla stres uygulanmayan bazal koşullardaki hayvanlara uygulanan CRF antagonisti α -helikal CRF₉₋₄₁ mide boşalımı üzerine herhangi bir etki göstermezken ($60,8 \pm 4,3$), OX1R antagonisti SB-334867 uygulaması mide boşalımını kontrol grubuna göre anlamlı olarak ($37,95 \pm 2,06$; $p<0.05$) azaltmıştır (Şekil 4.7).

Ekzojen OXA ve CRF'nin etkileri değerlendirildiğinde, santral CRF uygulaması katı mide boşalımını kontrol grubuna göre anlamlı olarak ($p<0.05$) yavaşlatırken ($34,98 \pm 1,22$), santral OXA uygulaması ise mide boşalımını anlamlı derecede ($p<0.05$) hızlandırmıştır ($76,5 \pm 5,71$) (Şekil 4.8).



Şekil 4.7. Sıçanlarda OX1R antagonisti SB-334867 (40 µg, icv) ve non-selektif CRF antagonisti α-helikal CRF₉₋₄₁ (30 µg, icv) ön uygulamalarının hareket kısıtlama stresine (HKS) bağlı azalan mide boşalımına etkisi. aCSF: yapay serebrospinal sıvı. *p<0.05; ***p<0.001 aCSF grubuna göre; ##p<0.01; ###p<0.001 HKS grubuna göre istatistiksel farkı ifade etmektedir. Tüm gruplarda n=10. İstatistiksel analiz; student t-testi.

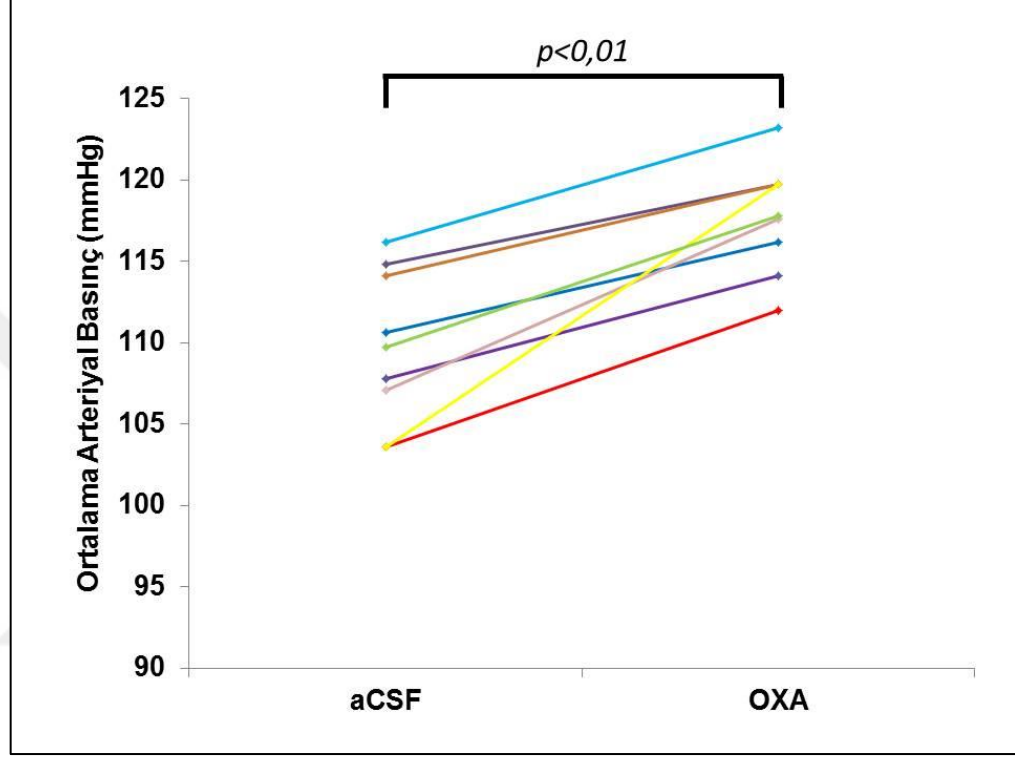


Şekil 4.8. Stres uygulanmayan bazal koşullardaki sıçanlarda santral ekzojen CRF (1 µg, icv) ve OXA (20 µg, icv) uygulamasının katı mide boşalımına etkisi. aCSF: yapay serebrospinal sıvı. *p<0.05 aCSF grubuna göre farkı işaret etmektedir. aCSF ve OXA grubunda n=10; CRF grubunda n=6. İstatistiksel analiz; Kruskal Wallis ve Mann-Whitney U testi.

4.5. Kan Basıncı Ölçümleri

Santral ekzojen OXA uygulaması (20 µg, icv) ortalama arteriyel kan basıncını aCSF uygulaması sonrası yapılan ölçümlere göre anlamlı derecede (p<0.01, n=9) arttırmıştır.

aCSF uygulaması sonrası elde edilen kan basıncı değerleri 109,72 mmHg olarak ölçülürken, bu ölçümden 10 dk sonra santral yolla (icv) uygulanan OXA sonucu kan basıncı değerleri 117,77 mmHg seviyesine çıkmıştır (Şekil 4.9).

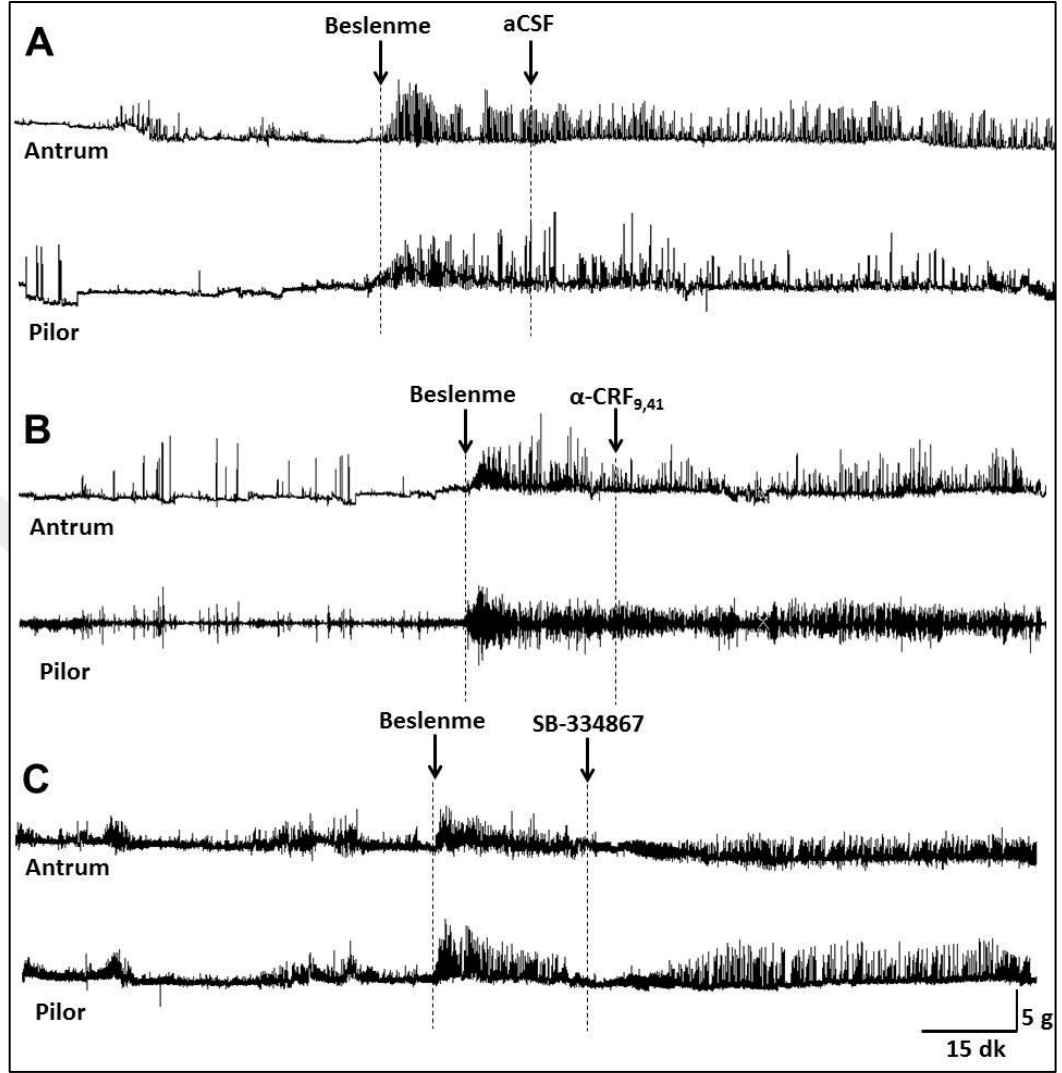


Şekil 4.9. Sıçanlarda santral ekzojen OXA (20 µg, icv) uygulamasının ortalama arteriyel basınca etkisi. Tüm gruplarda n=9.İstatistiksel analiz; Eşleştirilmiş t-testi

4.6. Mide Motilitesi

4.6.1. Bazal Koşullarda Postprandial Mide Motilitesi

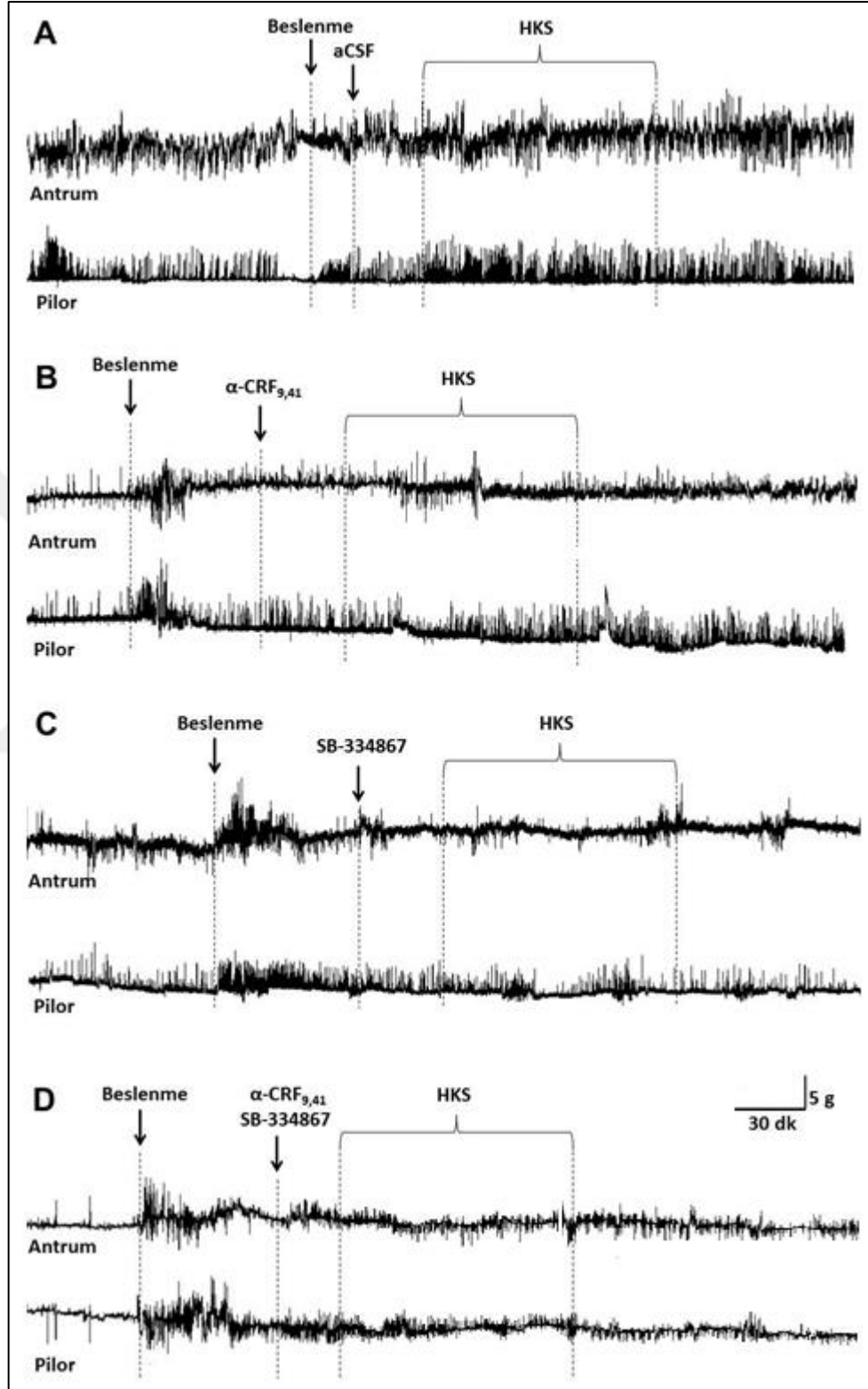
Santral yolla (icv) uygulanan aCSF, α -helikal CRF₉₋₄₁ ve SB-334867'nin serbest hareket eden uyanık sıçanlarda kaydedilen spontan antro-pilorik postprandial kasılmalara etkisi Şekil.4.10'da verilmiştir. aCSF ve α -helikal CRF₉₋₄₁ uygulamaları besin tüketimini takiben ortaya çıkan postprandial kasılmalarda bir değişime neden olmazken, SB-334867 uygulaması ile postprandial kasılmaların yaklaşık olarak 30 dk süreyle inhibe olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.10. Normal koşullarda aCSF (A), non-selektif CRF antagonisti α -helikal CRF₉₋₄₁ (30 μ g, icv) (B) ve OX1R antagonisti SB-334867 (40 μ g, icv) (C) uygulamalarının antro-pilorik postprandial kasılmalara etkisi. aCSF: yapay serebrospinal sıvı.

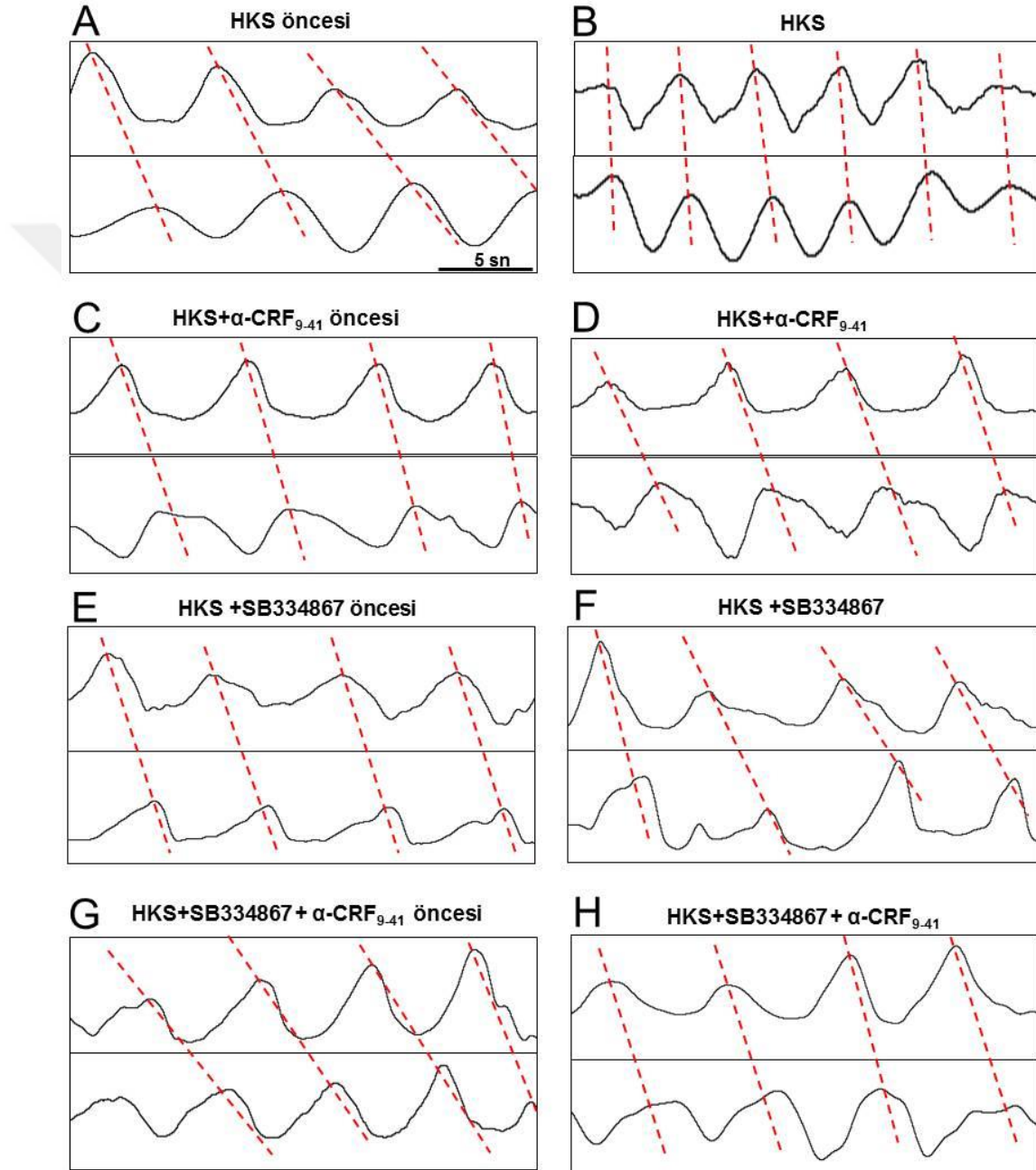
4.6.2. Stres Koşullarında Postprandial Mide Motilitesi

Stres durumunda santral uygulanan aCSF, α -helikal CRF₉₋₄₁ ve SB-334867 uygulamalarının antro-pilorik postprandial kasılmalara etkisi Şekil 4.11 ve Şekil 4.12’de verilmiştir. HKS uygulaması besin tüketimini takiben ortaya çıkan spontan postprandial kasılmaların genlik ve frekansını artırarak yüksek frekanslı düzensiz bir motor patern oluşumuna neden olmaktadır (Şekil.4.11A) Buna karşın, α -helikal CRF₉₋₄₁ ve SB-334867 antagonistlerinin ön uygulamaları postprandial motilitede HKS’ye bağlı oluşan değişimleri belirgin şekilde zayıflatmıştır (Şekil.4.11B, C). Öte yandan, Şekil 4.11D’de her iki antagonistin birlikte uygulandığı grupta HKS’nin postprandial motilite üzerine olan etkilerinin belirgin şekilde ortadan kalkmış olduğu görülmektedir.



Şekil 4.11. Sıçanlarda non-selektif CRF antagonisti α -helikal CRF_{9,41} (30 μ g, icv) ve OX1R antagonisti SB-334867 (40 μ g, icv) ön uygulamalarının HKS'ye bağlı değişen antro-pilorik postprandial kasımlara etkisi. aCSF: yapay serebrospinal sıvı; HKS: hareket kısıtlama stresi.

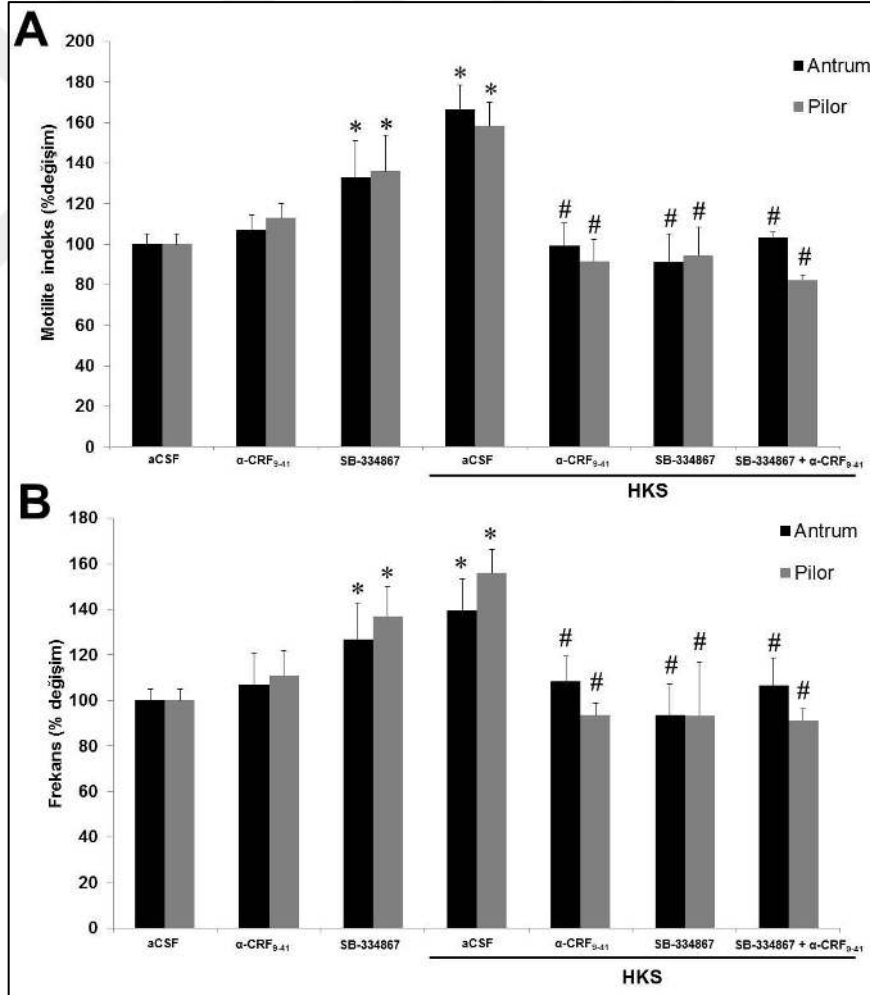
HKS öncesinde koordineli antro-pilorik kasılmaların HKS sonrası inkoordine eş zamanlı kasılmalara dönüştüğü gözlenmektedir (Şekil.4.12A, B). Buna karşın SB-334867, α -helikal CRF₉₋₄₁ antagonistleri yalnız başına ve beraber uygulandığında HKS'ye bağlı bu değişikliklerin yerini koordineli kasılmalara bıraktığı görülmektedir (Şekil 4.12C-H).



Şekil 4.12. Sıçanlarda non-selektif CRF antagonisti α -helikal CRF₉₋₄₁ (30 μ g, icv) ve OX1R antagonisti SB-334867 (40 μ g, icv) ön uygulamalarının hareket kısıtlama stresine (HKS) bağlı bozulan antro-pilorik kasılma koordinasyonuna etkisi. Kırmızı kesikli çizgiler antrumdan pilora yayılan kasılmaları ifade etmektedir.

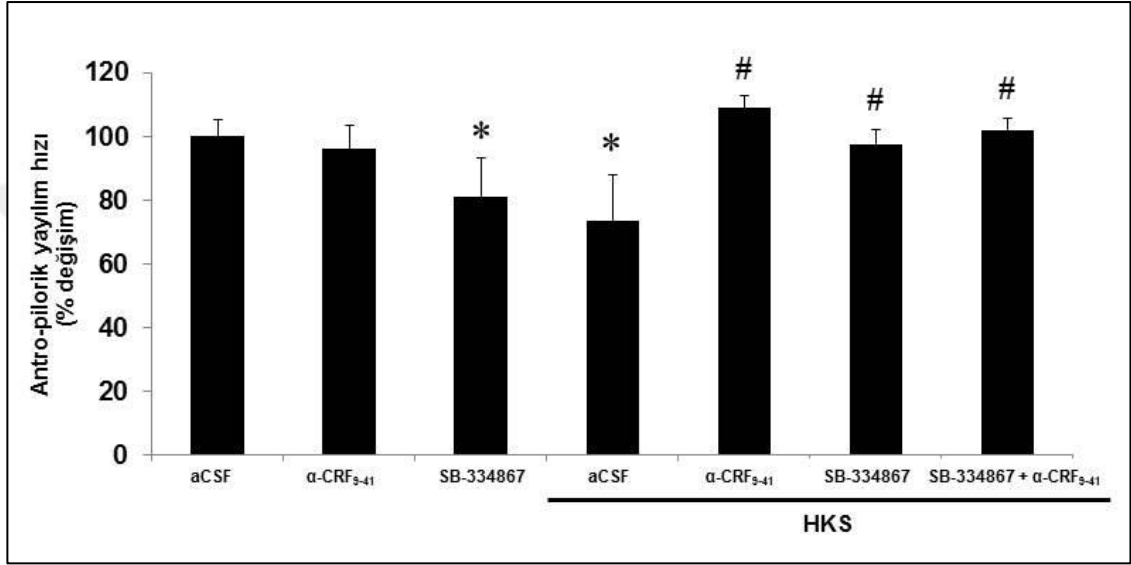
4.6.3. Motilite Kayıtlarının Kantitatif Analizi

HKS'ye maruz kalan sıçanların antral ve pilorik motilite indeks değerleri stres öncesine göre anlamlı ($p<0.05$) derecede yüksek hesaplanmıştır (Şekil 4.13A). HKS'ye bağlı artan motilite indeksi santral SB-334867 ve α -helikal CRF₉₋₄₁ ön uygulamaları ile anlamlı ($p<0.05$) şekilde azalma göstermiştir. Benzer şekilde, strese bağlı artan antropilorik kasılmaların frekansı SB-334867 ve α -helikal CRF₉₋₄₁ ön uygulamaları ile anlamlı ($p<0.05$) olarak kontrol seviyelerine düşmüştür (Şekil 4.13B). Normal koşullarda SB-334867 ön uygulaması motilite indeks ve kasılma frekansını anlamlı ($p<0.05$) derecede arttırırken, α -helikal CRF₉₋₄₁ uygulaması ise herhangi bir etki göstermemiştir (Şekil 4.13).



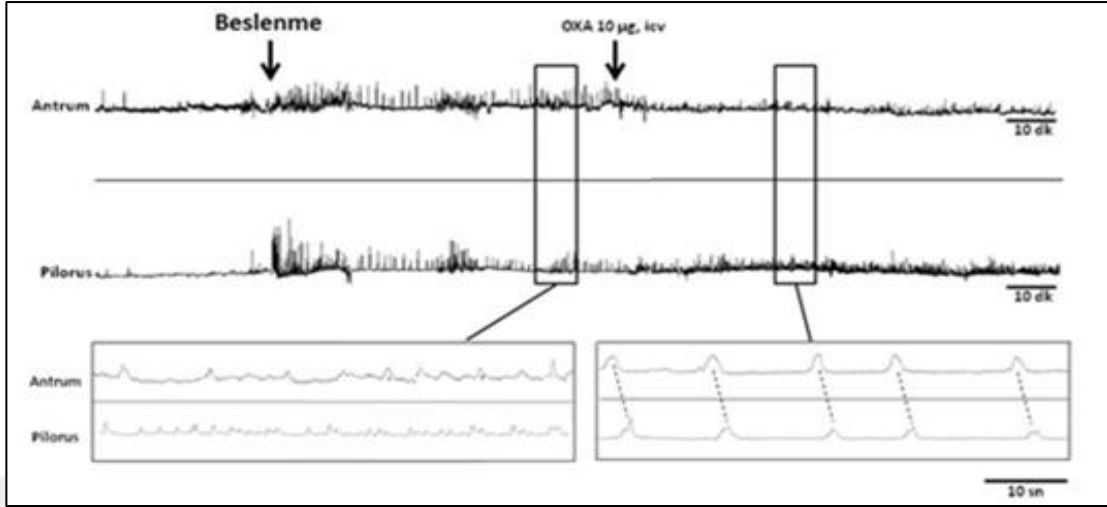
Şekil 4.13. Sıçanlarda OX1R antagonisti SB-334867 (40 μ g, icv) ve non-selektif CRF antagonisti α -helikal CRF₉₋₄₁ (30 μ g, icv) ön uygulamalarının hareket kısıtlama stresine (HKS) bağlı artan motilite indeksi ve kasılma frekansına etkisi. aCSF: yapay serebrospinal sıvı; HKS: hareket kısıtlama stresi. * $p<0.05$ aCSF grubuna göre; # $p<0.05$ HKS grubuna göre istatistiksel farkı ifade etmektedir. Tüm gruplarda $n=7$. İstatistiksel analiz; Kruskal Wallis ve Mann-Whitney U testi.

Postprandial antro-pilorik kontraksiyonların yayılım hızları değerlendirildiğinde, HKS'ye bağlı azalan antro-pilorik kasılmaların yayılım hızı, SB-334867 ve α -helikal CRF₉₋₄₁ ön uygulamaları ile anlamlı ($p<0.05$) şekilde düzelerek kontrol seviyelerine çıkmıştır. Bazal koşullarda ise SB-334867 uygulaması yayılım hızını kontrol (aCSF) grubuna göre anlamlı ($p<0.05$) olarak azaltmıştır (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Sıçanlarda OX1R antagonisti SB-334867 (40 μ g, icv) ve non-selektif CRF antagonisti α -helikal CRF₉₋₄₁ (30 μ g, icv) ön uygulamalarının hareket kısıtlama stresine (HKS) bağlı azalan antro-pilorik kontraksiyonların yayılım hızına etkisi. aCSF: yapay serebrospinal sıvı. * $p<0.05$ aCSF grubuna göre; # $p<0.05$ HKS grubuna göre istatistiksel farkı ifade etmektedir. Tüm gruplarda $n=7$. İstatistiksel analiz; Kruskal Wallis ve Mann-Whitney U testi.

Strese maruz kalmayan bazal koşullarındaki sıçanlarda santral ekzojen OXA'nın postprandial antro-pilorik kasılmalara etkisi Şekil 4.15'de sunulmuştur. Beslenme sonrası oluşan spontan antro-pilorik kasılmaların santral OXA uygulamasını (20 μ g, icv) takiben frekanslarının azaldığı, buna karşın yüksek genliğe sahip koordineli kasılmaların meydana geldiği gözlenmiştir (Şekil.4.15).

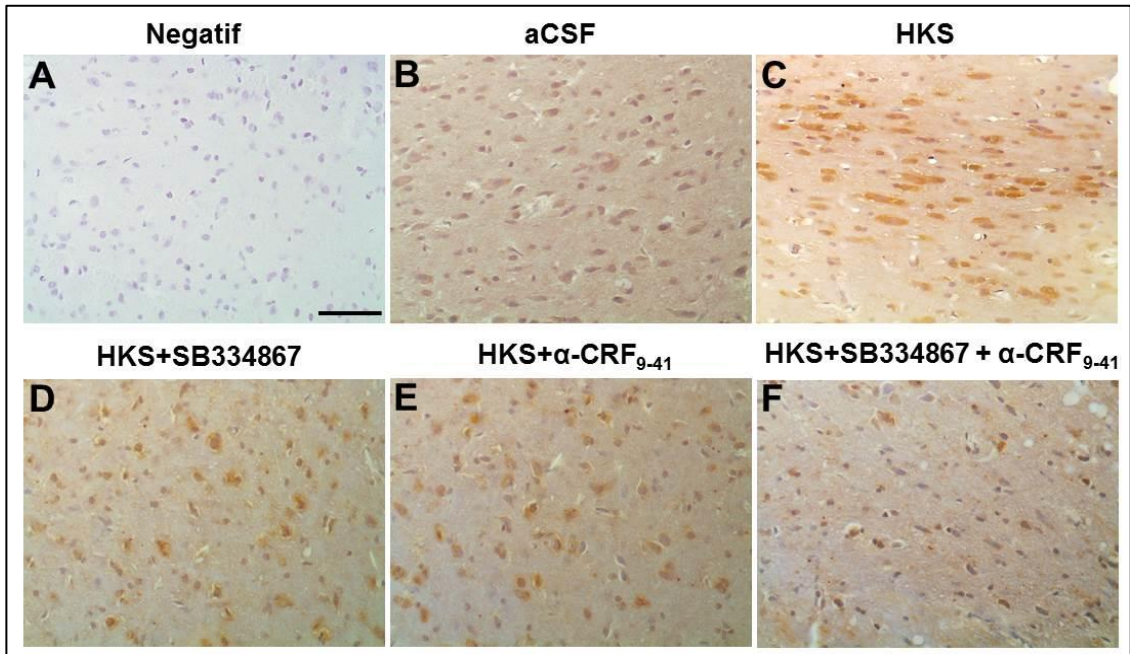


Şekil 4.15. Strese maruz kalmayan bazal koşullardaki sıçanlarda santral ekzojen OXA'nın (20 µg, icv) spontan postprandial antro-pilorik kasılmalara etkisi.

4.7. İmmunohistokimyasal Değerlendirmeler

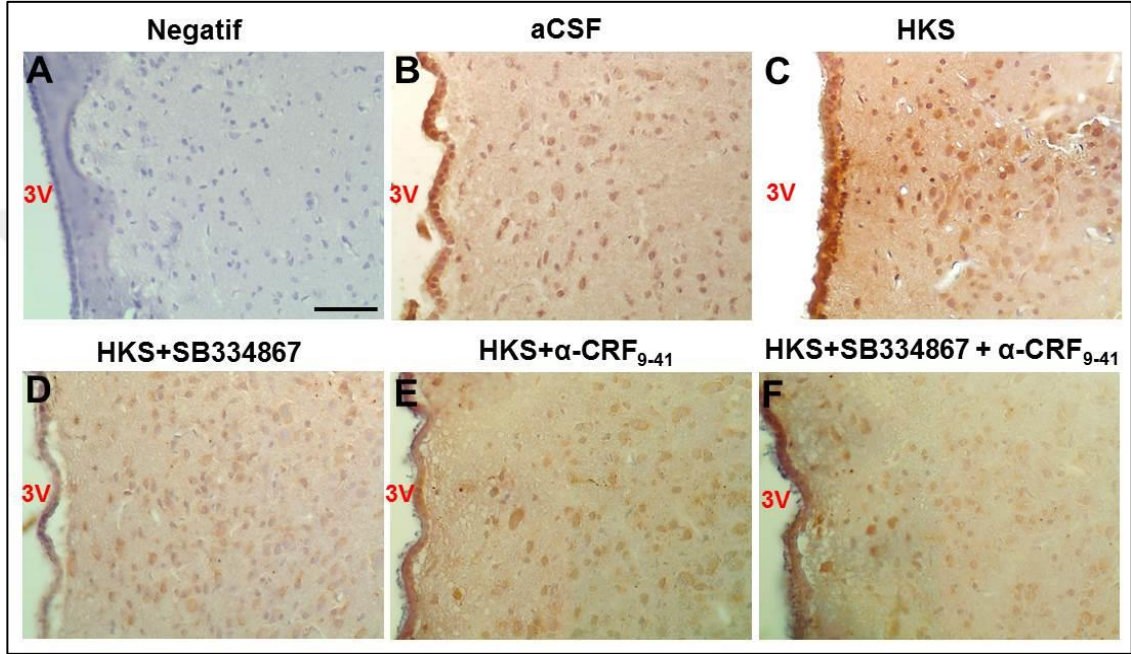
4.7.1. OXA İmmunoreaktivitesi

LHA'daki OXA immunoreaksiyonlarına göre (Şekil 4.16), HKS grubundaki OXA immunoreaksiyon yoğunluğunun kontrole göre %96 artış gösterdiği ($p<0.01$) tespit edilmiştir. SB-334867 (%17,4), α -helikal CRF₉₋₄₁ (%7,7) ve her iki antagonistin birlikte uygulandığı (-%2,4) sıçanlarda ise HKS'ye bağlı artan OXA immünoreaktivitesi anlamlı şekilde ($p<0.01$) azalma göstermiştir (Şekil 4.18).

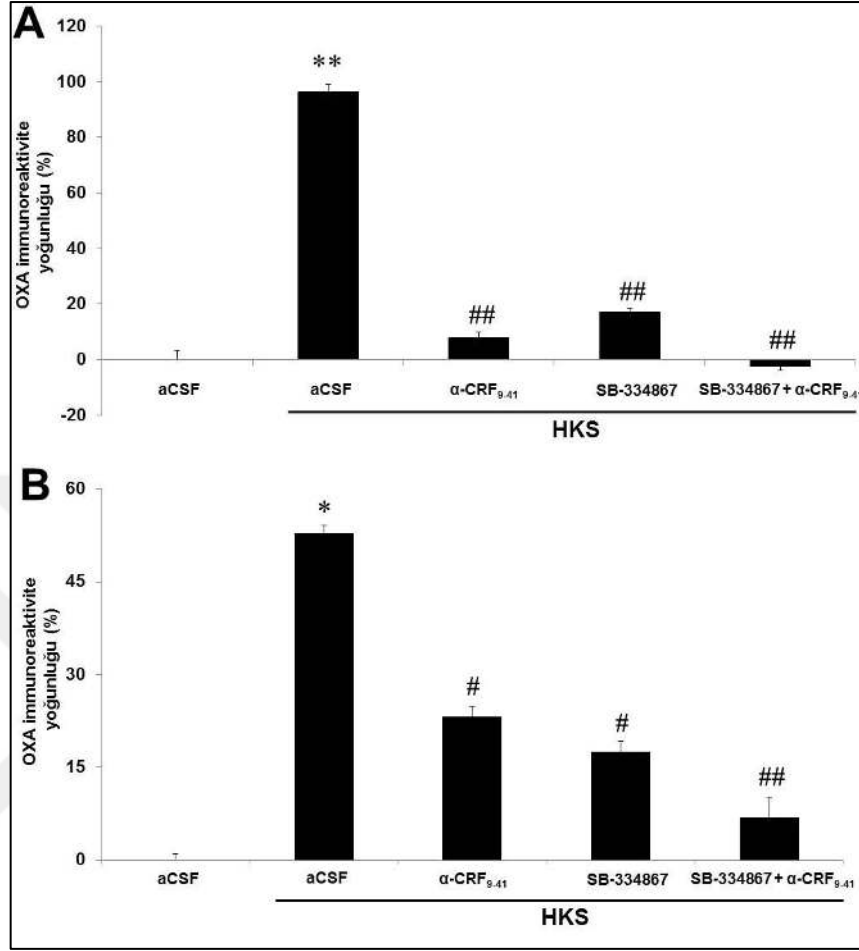


Şekil 4.16. LHA'da OXA için gözlenen immunoreaktivite. aCSF: yapay serebrospinal sıvısı; HKS: hareket kısıtlama stresi. 40x büyütme. Skala bar: 50 µm.

PVN'deki OXA immunoreaksiyonlarına değerlendirildiğinde (Şekil 4.17), HKS grubunda OXA yoğunluğu yaklaşık %52 oranında artış gösterirken ($p<0.05$), strese bağlı bu artış SB-334867 (%17,47, $p<0.05$), α -helikal CRF₉₋₄₁ (%23,19, $p<0.05$) ve her iki antagonistin uygulandığı (%6,89, $p<0.01$) gruplarda anlamlı olarak azalma göstermiştir (Şekil 4.18).



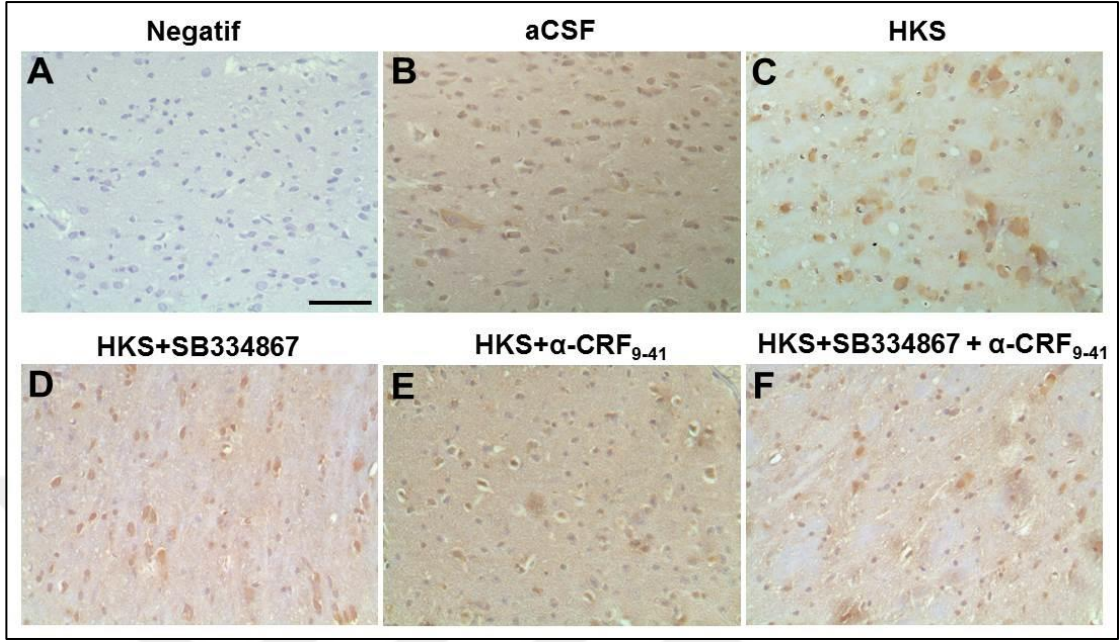
Şekil 4.17. PVN'de OXA için gözlenen immunoreaktivite. aCSF: yapay serebrospinal sıvı; HKS: hareket kısıtlama stresi. 3V: 3. Ventrikül. 40x büyütme. Skala bar: 50 μ m.



Şekil 4.18. LHA (A) ve PVN'deki (B) hücrel OXA(+) immünoreaktivite yoğunluk yüzdesi. aCSF: yapay serebrospinal sıvı; HKS: hareket kısıtlama stresi. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ aCSF grubuna göre; # $p<0.05$, ## $p<0.01$ HKS grubuna göre istatistiksel farkı ifade etmektedir. Tüm gruplarda $n=5$. İstatistiksel analiz; Kruskal Wallis ve Mann-Whitney U testi.

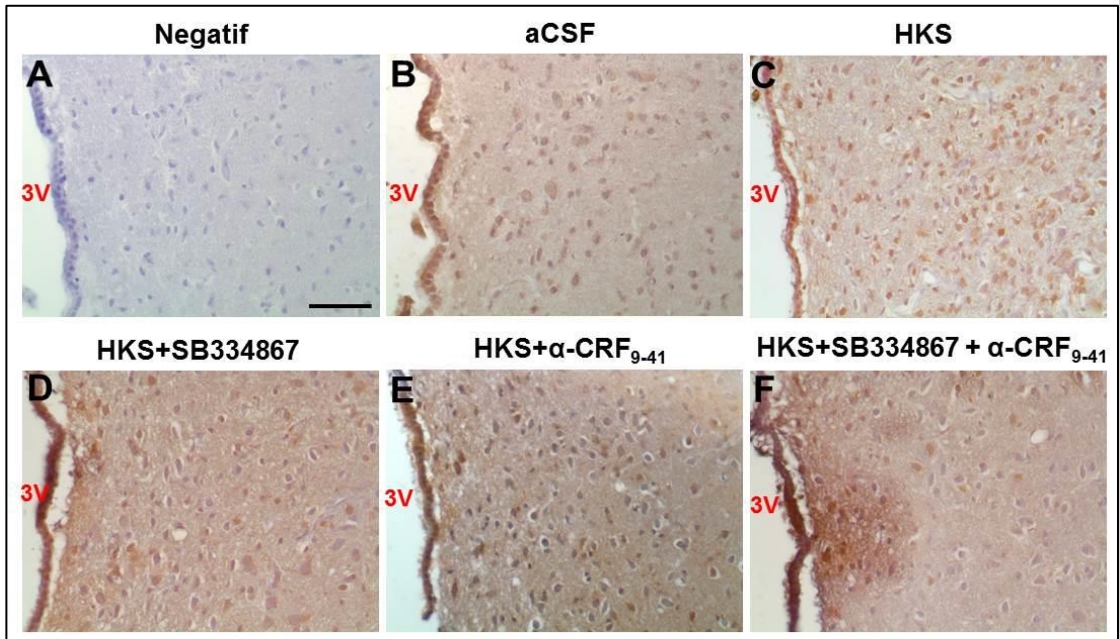
4.7.2. CRF İmmünoreaktivitesi

LHA'daki CRF immünoreaksiyonları değerlendirildiğinde (Şekil 4.19), HKS grubunda CRF yoğunluğu yaklaşık %63 oranında artış gösterirken ($p<0.01$), SB-334867 (%0,66), α -helikal CRF₉₋₄₁ (%1,5) ve her iki antagonistin uygulandığı (-%10,7) gruplarda strese bağlı artan CRF immünoreaktivitesi anlamlı şekilde ($p<0.01$) azalma göstermiştir (Şekil 4. 21).

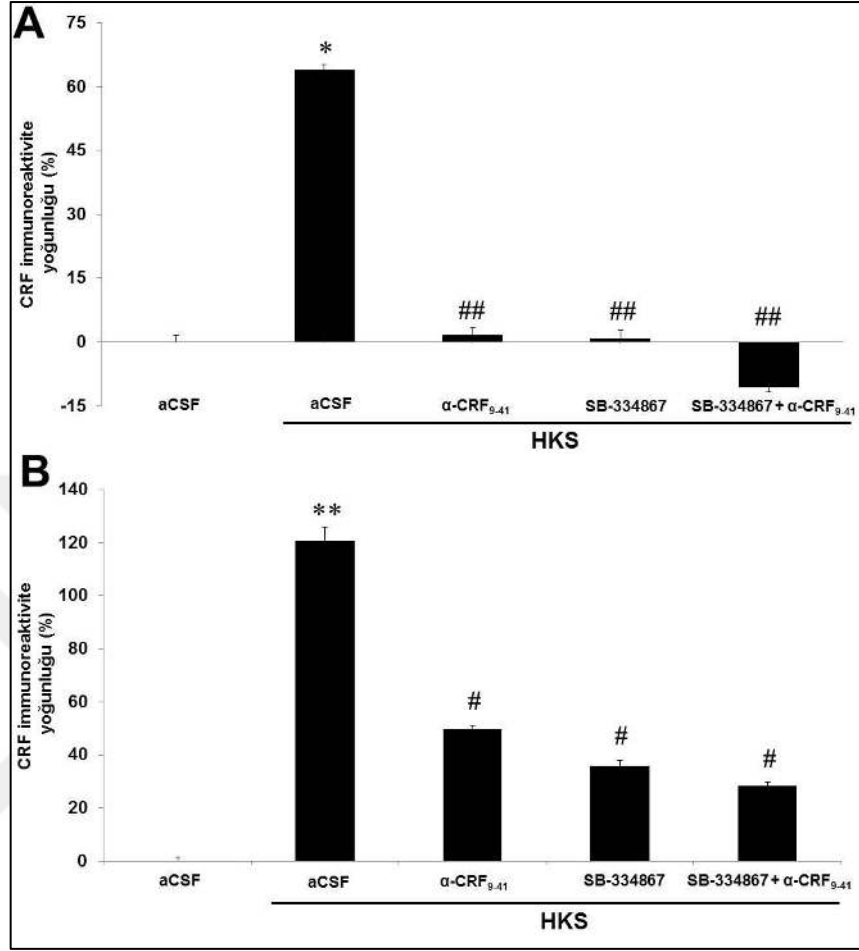


Şekil 4.19. LHA’da CRF için gözlenen immunoreaktivite. aCSF: yapay serebrospinal sıvı; HKS: hareket kısıtlama stresi. 40x büyütme. Skala bar: 50 μ m.

PVN’deki CRF immunoreaksiyonları incelendiğinde (Şekil 4.20), HKS grubundaki CRF immunoreaksiyon yoğunluğunun kontrole göre %120 artış gösterdiği ($p<0.01$) tespit edilmiştir. SB-334867 (%35,9), α -helikal CRF₉₋₄₁ (%49,8) ve her iki antagonistin birlikte uygulandığı (%28,4) gruplarda ise HKS’ye bağlı olarak artış gösteren CRF immünoreaktivitesi anlamlı şekilde ($p<0.05$) zayıflamıştır (Şekil 4.21).



Şekil 4.20. PVN’de CRF için gözlenen immunoreaktivite. aCSF: yapay serebrospinal sıvı; HKS: hareket kısıtlama stresi. 3V: 3. Ventrikül. 40x büyütme. Skala bar: 50 μ m.



Şekil 4.21. LHA (A) ve PVN'deki (B) hücrel CRF (+) immünoreaktivite yoğunluk yüzdesi. aCSF: yapay serebrospinal sıvı; HKS: hareket kısıtlama stresi. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ aCSF grubuna göre; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ HKS grubuna göre istatistiksel farkı ifade etmektedir. Tüm gruplarda $n = 5$. İstatistiksel analiz; Kruskal Wallis ve Mann-Whitney U testi.

5. TARTIŞMA

Literatürde oreksinlerin stres yanıtı ve HPA eksen aktivasyonundaki rolüne dair çalışmalar bulunmaktadır (Kuru ve ark., 2000; Al-Barazanji ve ark., 2001; Stricker-Krongrad ve Beck 2002; Sakamoto ve ark., 2004; Chang ve ark., 2007; Tung ve ark., 2016). Sıçanlara 30 dakika süreyle uygulanan zorlu yüzme stresinin serebrospinal sıvıdaki OXA konsantrasyonunda önemli artışa sebep olduğu gösterilmiştir (Martins ve ark., 2004). Buna paralel olarak 20 dakika süreyle uygulanan hareketsizlik stresinden sonra LHA'daki oreksinerjik nöronların aktive olduğu bildirilmiştir (Sakamoto ve ark., 2004). Winsky-Sommerer ve arkadaşları akut strese cevaben LHA'da gerçekleşen oreksinerjik nöron aktivasyonunun CRF1R knock-out farelerde ortadan kalktığını tespit etmişlerdir (Winsky-Sommerer ve ark., 2004). Son olarak, 10 dakika süreyle uygulanan zorlu yüzme stresinin (Chang ve ark., 2007) ve 30 dakika süreyle uygulanan hareketsizlik stresinin (Tung ve ark., 2016) LHA'daki oreksinerjik nöronlarda c-Fos seviyelerinde artışa neden olduğu bildirilmiştir. Sakamoto ve arkadaşları ekzojen santral OXA (30 µg, icv) uygulamasının PVN ve santral amigdaloïd nükleustaki CRF ve c-Fos immünoreaktivitesinde artışa sebep olduğunu göstermişlerdir (Sakamoto ve ark., 2004). OXA'nın bu ekzojen etkisinin yanı sıra HPA eksen aktivasyonunda da rol oynamaktadır. Literatürde ekzojen santral OXA uygulamasının sıçanlarda plazma ACTH ve kortikosteron seviyelerini arttırdığını gösteren bulgular mevcuttur (Al-Barazanji ve ark., 2001; Russell ve ark., 2001; Chang ve ark., 2007; Samson ve ark., 2007). Samson ve arkadaşları santral olarak uyguladıkları OXA'nın (3 nmol, icv) plazma ACTH seviyelerinde artışa sebep olduğunu, OX1R antagonisti ön uygulamasının ise bu etkiyi ortadan kaldırdığını tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada, 10 dakika süreyle uygulanan hareketsizlik stresinin de neden olduğu ACTH salınımı, OX1R antagonisti ile önlenmiştir (Samson ve ark., 2007). Bunun yanı sıra, santral OXA (3 nmol, icv) uygulamasının ACTH, kortikosteron ve hipotalamik kesitlerden CRF salınımına neden olduğu bilinmektedir (Russell ve ark., 2001).

Çalışmamızda endojen OXA'nın strese bağlı gelişen nöro-endokrin yanıtındaki etkilerini incelemek amacıyla plazma kortikosteron seviyeleri ölçülmüştür. Literatüre uyumlu olarak HKS uygulanan sıçanlardan elde edilen kan örneklerinde plazma kortikosteron seviyeleri kontrol grubuna göre artış gösterirken, OX1R ve CRF reseptör antagonistlerinin ön uygulamaları strese bağlı artan plazma kortikosteron seviyelerini azaltması oreksinerjik sistemin stres yanıtının CRF-aracılı endokrin bileşenlerine katkıda bulunabileceğini işaret etmektedir. Oreksinin her iki reseptörünün sıçan adrenal bezinde varlığı gösterilmiştir (Lopez ve ark., 1999). Plazmada artan OXA adrenal korteksteki reseptörüne bağlanarak periferik endokrin yollar üzerinden de HPA eksenine katkıda bulunuyor olabilir. Dolayısıyla mikrodialize ek olarak strese bağlı periferik kaynaklardan salınan OXA'nında değerlendirilmesi konuya daha ayrıntılı bir bakış açısı kazandıracaktır.

Bu çalışmada stres koşullarında hipotalamusta üretimleri artan OXA ve CRF seviyeleri mikrodializ yöntemi ile tespit edilmiştir. Mikrodializ beyin dokusunda ekstraselüler alandan örnek toplamak amacıyla yaygın olarak uygulanan bir in-vivo yöntemdir (Bito ve ark., 1966). Prensip olarak basit difüzyon ilkesine dayalı şekilde perfüzyon sıvısında bulunmayan çözünmüş hücre dışı alandaki maddelerin yarı geçirgen bir zarıdan konsantrasyon gradiyenti doğrultusunda geçişi ile gerçekleşir (Chefer ve ark., 2009). Çalışmamızda 90 dk süreyle HKS uygulanmış sıçanların PVN'sinden elde edilen örneklerde stres ve stres sonrası dönemde CRF artışı; LHA'dan elde edilen mikrodializatlarında ise stres ve stres sonrası dönemde OXA artışı görülmüştür. OXA ve CRF'nin stres sonrası dönemde de artışının devam etmesi, stres sırasında aktive olan nöronların kalıcı bir şekilde aktivasyonunu devam ettirdiğini göstermektedir. Öte yandan, çalışmamızda HKS'ye cevaben OXA seviyelerinin tespiti zamansal açıdan sınırlıdır. OXA'nın dinamik değişimlerinin daha ayrıntılı olarak tespit edilebilmesi için daha uzun süre kronik mikrodializ deneylerine ihtiyaç vardır. Bununla birlikte, LHA'daki oreksinerjik nöronların açlığa bağlı uyarıldığı ve beslenmenin postprandial döneminde OXA üretiminin baskılandığı bilinmektedir (Mondal ve ark., 1999; Komaki ve ark., 2001). Çalışmamızda mikrodializ tok hayvanlarda gerçekleştirilmiş olup, açlık durumunda OXA üreten nöronlarda sensitizasyon, tokluk durumunda ise desensitizasyon oluşabileceğini düşünmek yanlış olmaz. Sıçanlar nokturnal (gece aktif) hayvanlar

olduklarından beslenmelerinin büyük bir kısmı gece gerçekleşirken, gündüz periyodunda ise daha çok spontan şekilde beslenme davranışı gösterirler. Çalışmamızdaki mikrodializ deneyleri gündüz periyodunda gerçekleştirilmiş olup, hayvanların kan glukoz seviyeleri mikrodializ ile eş zamanlı olarak incelenmemiştir. Bu sebeple, beslenme durumunun monitörize edildiği, hem aç hem de tok hayvanlarda, gece/gündüz periyotlarında gerçekleştirilecek mikrodializ çalışmaları OXA üreten hücrelerin söz konusu yanıtındaki duyarlılığının karşılaştırılabilmesi için yararlı olacaktır.

Mikrodializ deneylerinin ikinci aşamasında stres ve stres sonrası dönemde LHA'da artan OXA seviyeleri non-selektif CRF reseptör antagonisti ile belirgin şekilde azalma gösterirken, PVN'de artan CRF seviyeleri ise selektif OX1R antagonisti ile azalma göstermiş ve kontrol seviyelerine düşmüştür. Bunun yanı sıra, santral CRF mikroenjeksiyonu ve 1 saat süreyle uygulanan hareketsizlik stresinin LHA'da ki prepro-oreksin mRNA artışına, santral OXA (10-30 µg, icv) uygulamasının ise PVN'deki CRF mRNA artışına sebep olduğu bilinmektedir (Ida ve ark., 2000; Al-Barazanji ve ark., 2001; Sakamoto ve ark., 2004). Öte yandan LHA'daki oreksinerjik hücrelerden köken alan sinir liflerinin PVN'de projeksiyon gösterdiği (Cutler ve ark., 1999; Date ve ark., 1999), CRF immünoreaktif terminallerin LHA'daki oreksin üreten nöronlar ile temas halinde bulunduğu ve oreksinerjik nöronların CRF'nin her iki tip reseptörünü eksprese ettiği bilinmektedir (Winsky-Sommerer ve ark., 2004). Literatürde bulunan bu bilgiler elde ettiğimiz bulguları destekler nitelikte olup, stres yanıtında oreksinerjik sistem etkisinin CRF üzerinden ya da CRF'nin oreksinerjik sistem üzerinden etkinlik gösterebileceğini işaret etmektedir. Çalışmamızda CRF'nin non-selektif reseptör antagonisti kullanılırken, oreksinin DMV'de üretilen ve OXA'ya 100-1000 kat daha afinite gösteren tip-1 reseptörünün selektif antagonisti tercih edilmiştir (Willie ve ark., 2001; Krowicki ve ark., 2002; Sakurai 2014). Buna karşın, Chang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada santral OXA uygulaması ve 10 dakikalık zorlu yüzme stresine bağlı artan plazma ACTH seviyeleri OX2R antagonisti ile önlenmiştir. Bu anlamda ileride yapılacak çalışmalarda her iki oreksin reseptör antagonistinin karşılaştırılması, bu reseptörlerin stres yanıtındaki rollerinin aydınlatılmasına fayda sağlayacaktır.

Mikrodiyaliz çalışmasından elde edilen bulgular, OXA ve CRF'nin protein düzeyinde ekspresyonlarının immünohistokimyal olarak gösterilmesi ile teyit edilmiştir. Stres uygulamasının hemen ardından PVN ve LHA bölgelerinden alınan kesitlerde CRF ve OXA immünoreaktivitelerinde artış tespit edilmiş olup, bu artışların hem OXA hem de CRF reseptör antagonisti ile azaldığı belirlenmiştir. Gerek bu hücrelerin strese bağlı gerçekleşen aktivasyonlarının, gerekse antagonistlerle sağlanan inaktivasyonun ileride yapılacak çalışmalarda c-Fos immünoreaktivitesi ile birlikte gösterilmesi bu konudaki soru işaretlerinin giderilmesine yardımcı olacaktır.

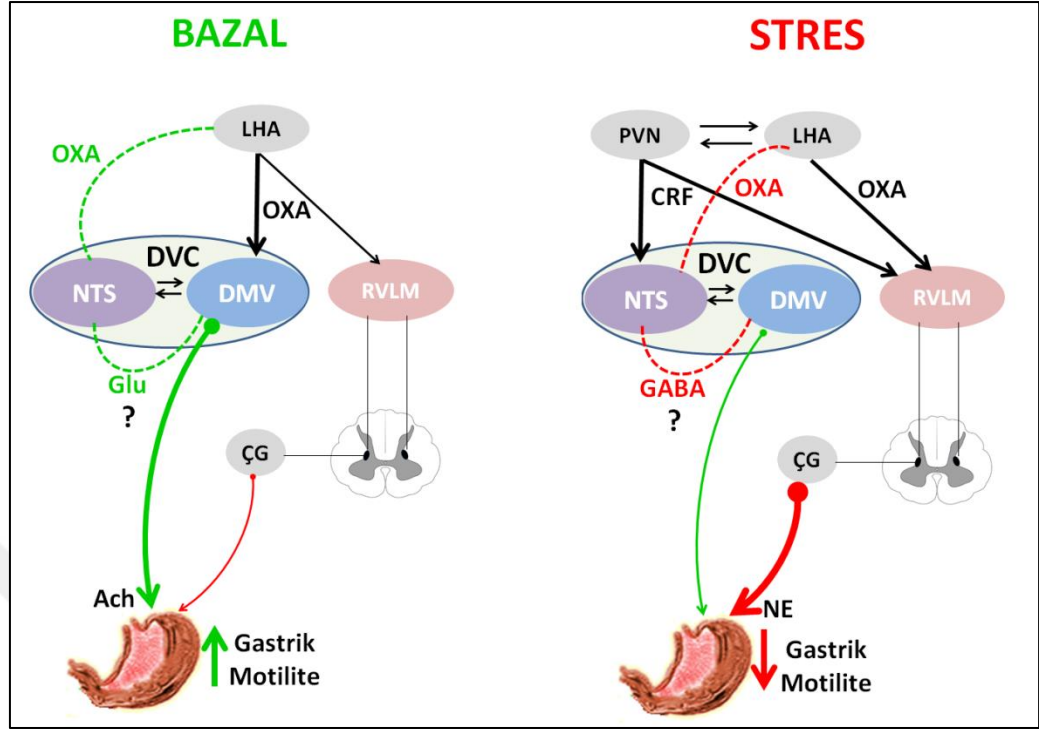
Strese bağlı bozulan üst GIS motilitesinde, etkinliği artan sempatik otonom deşarjların yanı sıra etkinliği azalan vagal parasempatik sinyallerin de rolü olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır (Lenz ve ark., 1988a; Martinez ve ark., 1998; Nakade ve ark., 2005; Nakade ve ark., 2006). Sıçanlarda yapılan çalışmalarda hareket kısıtlama stresi ve santral CRF uygulamasının postprandial antro-pilorik kasılma koordinasyonunu bozarak mide boşalımını yavaşlattığı gösterilmiştir (Martinez ve ark., 1998; Nakade ve ark., 2005; Nakade ve ark., 2006). Strese bağlı artan antral ve pilorik kontraksiyonların genliği CRF reseptör antagonisti astressin₂-B ve guanitidin ile daha da artış gösterirken, parasempatolitik ajanlar ve vagotomi uygulamalarında bu etki ortadan kalkmıştır (Nakade ve ark., 2006). Sonuç olarak, sıçanlarda akut stresin mide boşalımı üzerine inhibitör etkisini vagal kolinerjik yolak üzerinden gerçekleştirebileceğini göstermektedir. Öte yandan, intrasisternal CRF uygulamasının doza bağımlı olarak katı mide boşalımını inhibe ederken, bu inhibitör etkinin guanitidin, propranolol (beta blokörü) ve çölyak ganglionektomi uygulanmış sıçanlarda ortadan kalktığı görülmüştür. Aynı çalışmada 90 dk süreyle uygulanan stresin mide boşalımını yavaşlattığı görülmüş ve guanitidin, çölyak ganglionektomi ve CRF2R antagonisti astressin₂-B uygulaması bu inhibitör etkiyi ortadan kaldırmıştır (Nakade ve ark., 2005). Bu bulgular stresin mide boşalımını CRFR-2 ve periferik sempatik sinirler aracılığıyla inhibe ettiğini göstermektedir. Ayrıca strese bağlı gelişen Gİ motilitedeki değişikliklerin CRF antagonisti ön uygulaması ile ortadan kalkması endojen CRF'nin strese bağlı bozulan gastrointestinal motilitedeki rolünü göstermektedir (Lenz ve ark., 1988a; Coskun ve ark., 1997; Nakade ve ark., 2006; Masere C 2009). Öte yandan, yapılan birçok in-vivo çalışmada santral OXA'nın Gİ motor fonksiyonların düzenlenmesindeki rolleri ortaya

koyulmuştur (Kobashi ve ark., 2002; Krowicki ve ark., 2002; Bulbul ve ark., 2010a; Bulbul ve ark., 2010b). Bülbül ve arkadaşları santral ekzojen OXA'nın gastroduodenal açlık motor paterni üzerine inhibitör etki gösterdiğini, bu etkinin atropin  n uygulaması ve vagotomi ile ortadan kalktığını saptamışlardır (Bulbul ve ark., 2010b). Ayrıca bu çalışmada OX1R reseptör antagonisti uygulamasının gastrik spontan faz-III kasılmalarında artışa sebep olduğu bildirilmiştir. Bu bulgular endojen santral OXA'nın GI motor fonksiyonlar üzerine rolünü işaret etmektedir (Bulbul ve ark., 2010b). DMV'ye yapılan OXA mikroenjeksiyonunun mide içi basınçta ve antral motilitede artışa neden olduğu bildirilmiştir (Krowicki ve ark., 2002). Buna paralel olarak santral (icv) OXA uygulamasının mide motilitesini arttırdığı (Bulbul ve ark., 2010a), intrasisternal OXA uygulamanın ise midenin proksimalinde gevşeme yaparken distalinde kontraksiyona sebep olduğu ve bu fazik kontraksiyonların vagotomi ile ortadan kalktığı tespit edilmiştir (Kobashi ve ark., 2002). Bu bulgular, santral OXA'nın GI motor fonksiyonlar üzerine vagal kolinerjik yolaklar üzerinden etki ettiğini işaret etmektedir. Hao ve arkadaşları LHA'daki gastrik gerime duyarlı nöronlar üzerinde yaptıkları elektrofizyolojik çalışmada, bu bölgeye yapılan OXA mikroenjeksiyonu gastrik gerime duyarlı nöronları uyarıp gastrik motiliteyi arttırırken, SB-334867  n uygulaması bu etkiyi ortadan kaldırmıştır. Bu bulgu, LHA'nın GI kanaldan sinyaller alabildiğini ve ekzojen OXA'nın tip-1 reseptörü aracılığıyla gastrik motiliteye etki ettiğini göstermektedir (Hao ve ark., 2016). Aynı  alışmada PVN'ye yapılan elektriksel uyarı sonucu LHA'daki gastrik gerime duyarlı nöronların uyarıldığı g r lm ştir. Bu sonuçlar, PVN'deki nöronların LHA'daki gastrik gerime duyarlı nöronların aktivitesi üzerine etkisini göstermektedir (Hao ve ark., 2016).

Literatürdeki bu bulgulara karşın OXA'nın stres koşullarında ortaya çıkan GI motor değişikliklerdeki rolü ile ilgili bilenenler oldukça kısıtlıdır. Bülbül ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada antral postprandial kasılmalarda strese bağlı gözlenen değişikliklerin selektif OX1 reseptör antagonisti ile ortadan kalkması, santral oreksinerjik sistemin streste meydana gelen GI motor değişikliklerde rolü olabileceğini düşündürmektedir (Bulbul ve ark., 2010a). Mikrodiyaliz  alışması sonucu elde ettiğimiz hipotalamik OXA ve CRF üretiminin stresteki artışı ve birbirleri üzerine olan uyarıcı etkileri, bize CRF'ye benzer şekilde endojen OXA'nın da strese bağlı gelişen mide

motilite değişikliklerinde rolü olabileceğini düşündürmüştür. Gerçekleştirdiğimiz mide boşalımını ölçümlerinde akut HKS'ye bağlı yavaşlayan mide boşalımını OX1R antagonisti SB-334867 ve non-selektif CRF reseptör antagonisti α -helikal CRF_{9,41} ön uygulaması ile önlenmiştir. İlginç olarak, her iki antagonist yalnız başına azalan mide boşalımını anlamlı olarak düzeltse de, kontrol seviyesine geri döndürememiştir. CRF ve OXA antagonistleri birlikte uygulandığında ise strese bağlı olarak mide boşalımındaki yavaşlamanın tamamen ortadan kalktığı tespit edilmiştir. Öte yandan, çalışmamızda ekzojen uygulanan OXA'nın ekzojen CRF'nin aksine mide motor fonksiyonları uyarak mide boşalımını hızlandırdığı tespit edilmiştir. Buna karşın, bazal koşullarda uygulanan SB-334867'in mide boşalımını yavaşlatması endojen OXA'nın stressiz koşullarda mide motor fonksiyonları düzenleyen tonik etkili bir mediyatör olabileceğini düşündürmektedir. Bu sonuçlar stres koşullarında OXA'nın CRF üzerine olan sinerjistik etkisinin yanı sıra biriyle kesişmeyen diğer bir yolağı kullandığını düşündürmektedir. Her ne kadar bu çalışmadan elde edilen veriler bu ikinci yolağı tam olarak aydınlatmaya yetmese de, farmakolojik dozda icv yolla uygulanan ekzojen OXA'nın kan basıncını arttırması literatürde daha önce reseptörünün gösterildiği (Xiao ve ark., 2013) RVLM-aracılı etkinliğini işaret etmektedir. Bazal ve stres koşullarında endojen santral OXA'nın bağlı mide motor fonksiyonlarına etkileri ve olası etki mekanizmaları Şekil 5.1'de ifade edilmiştir.

Mideyi innerve eden efferent DMV nöronları, normal koşullarda NTS'nin tonik glutamaterjik ve gabaerjik innervasyonu altındadır. Ancak stres koşullarında ve ekzojen olarak in-vitro ortama uyguladığında CRF'nin dorsal vagal kompleksteki monoaminerjik internöronların görev aldığı sinirsel devrede sinaptik plastisitede c-AMP aracılı değişikliklerine neden olduğu bildirilmiştir (Browning ve ark., 2014; Travagli ve Anselmi 2016). Bu anlamda, OXA'nın bazal ve stres koşullarındaki mide boşalımını üzerine zıt etkisi, strese bağlı artan CRF'nin dorsal vagal kompleksde yol açtığı snaptoplastik değişiklikler ile açıklanabilir. Monoaminerjik internöronların görev alması muhtemel bu mekanizmanın aydınlatılabilmesi için dorsal vagal kompleksde gerçekleştirilecek in-vivo mikrodializ ve in-vitro elektrofizyolojik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.



Şekil.5.1. Bazal ve stres koşullarında OXA'nın mide motilitesine etkileri. OXA'ya bağlı hipotetik yollar kesikli çizgi ile farklı renkte (uyarıcı: yeşil, inhibitör: kırmızı) ifade edilmiştir. OXA ve CRF'nin yolaklardaki etkinliği farklı çizgi kalınlıkları ile vurgulanmıştır. LHA: lateral hipotalamik alan, PVN: paraventriküler nükleus, DVC: dorsal vagal kompleks, NTS: nükleus traktus solitarius, DMV: vagal dorsal motor nükleus, RVLM: rostral ventrolateral medulla, ÇG: çöliak gangliyon, Glu: glutamat, GABA: Gaba amino bütirik asit, Ach: asetil kolin, NE: nor-epinefrin.

Katı besin maddelerinin boşalımı antrumdan pilora doğru yayılan güçlü ve koordineli kasılmalar ile karakterizedir (Ishiguchi ve ark., 2002; Nakade ve ark., 2006). Mikrodializ ve mide boşalımı sonuçlarımız bize stres durumunda artan endojen OXA'nın da postprandial antro-pilorik kasılmaların koordinasyonunu bozabileceğini ve bu şekilde streste azalan mide boşalımında rol alabileceğini düşündürmüştür. Bu anlamda sıçanlarda antrum ve pilora kronik olarak yerleştirdiğimiz strain gage transdüserler ile yaptığımız motilite kayıtlarında, HKS uygulamasının beslenme sonrası ortaya çıkan ve mide boşalımının en önemli fizyolojik mekanizmasını oluşturan postprandial antro-pilorik kasılmaların koordinasyonunu bozduğu tespit edilmiştir. Buna karşın, OXA ve CRF reseptör antagonistlerinin ön uygulamaları HKS'ye bağlı oluşan değişimleri belirgin şekilde zayıflatırken, her iki antagonist birlikte uygulandığında HKS'nin postprandial motilite üzerine olan etkileri belirgin şekilde zayıflamıştır. Bu sonuç, OXA ve CRF'nin streste bozulan mide motor fonksiyonu

üzerine birbiriyle etkileşimlerinin yanı sıra birbirinden bağımsız etkiler de gösterebileceklerini işaret etmektedir.

Fonksiyonel gastrointestinal hastalıklar (FGID) yapısal yada biyokimyasal anormalliklerin olmadığı ve patofizyolojisinin altında yatan mekanizmaların iyi bilinmediği, GİS'e ilişkin kronik yakınmalarla karakterize bir grup hastalık için kullanılan bir terimdir. Uluslararası bir uzman ekip tarafından belirlenen "Roma Kriterleri" FGID'ın tanı ve tedavisi ile ilgili klavuzları geliştirmişlerdir. Bu ekip tarafından Gİ semptomlarla sınıflandırılmış olup, bunlar; visseral hipersensitivite, motilite bozuklukları, mukozal ve immün fonksiyonlarda değişim, değişmiş bağırsak mikrobiyotası ve değişmiş merkezi sinir sistem algılaması gibi durumların herhangi biriyle veya kombinasyonu ile ortaya çıkmaktadırlar (Drossman 2016; Drossman ve Hasler 2016). Strese maruz kalınması bu hastalıklarda gözlenen GIS bulgularının oluşumunu hızlandırdığı ve mevcut bulguların alevlenmesine neden olduğu bilinmektedir. İnsanlarda kronik strese maruz kalınması ve bozulan stres yanıtı ile birlikte maladaptasyon gözlenmektedir. Buna bağlı olarak fonksiyonel dispepsi (FD) ve irritabl bağırsak sendromu (IBS) gibi klinik tablolar meydana gelmektedir (Lenz ve ark., 1988b; Vassallo M 1992; Camilleri ve ark., 1999). Kemirgenlerde yapılan deneysel FGID modellerinde hipotalamusta aşırı artan CRF ekspresyonu ve bunun tetiklediği beyin-barsak eksenini disfonksiyonu saptanmıştır. Strese maruz kalınması durumunda beyin-bağırsak ekseninde oluşan nöro-biyolojik değişikliklerde hipotalamik CRF'nin başlattığı yolların rol aldığı düşünülse de bu konuda bilenenler sınırlıdır.

FD, FGID içerisinde en sık görülen klinik tablo olup, etyolojisinde çeşitli faktörler suçlanmaktadır. Bu nedenle patofizyolojisi ve tedavi yöntemleri hakkında bilgiler oldukça kısıtlıdır. Postprandial dolgunluk, erken doygunluk, epigastrik ağrı ve yanma gibi üst abdominal semptomlarla karakterizedir. Bu semptomlardan bir ya da daha fazlasının bulunması dispepsi olarak tanımlanmaktadır. FD'de semptomların gelişiminde mide motilite bozuklukları, visseral duyarlılık, H. pylori enfeksiyonu ve psikososyal faktörler rol oynamaktadır. Epidemiyolojik çalışmaların sonuçları gelişmiş batı ülkelerinde dispeptik hastaların üçte ikisine FD tanısı konulduğunu ve kronik seyir gösteren FD hastalarının %80'inde dispeptik bulguların yanı sıra gastro-özofageal reflü

ve IBS semptomlarının ortaya çıktığı bildirilmiştir. FD hastalarında yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular psikolojik stresin hastalık semptomlarının şiddet ve görülme sıklığında birincil etken olduğunu ortaya koymaktadır (Saad ve Chey 2006). Bu anlamda FGID tedavisi için stres ve beyin-barsak eksenini ile ilgili patofizyolojik mekanizmaların aydınlatılması büyük önem taşımaktadır. Bunun yanı sıra oreksin antagonistlerinin özellikle kronik dispeptik semptomlar gösteren hastalar üzerinde kullanımından yola çıkarak stres, CRF ve oreksin arasındaki ilişkinin ilerleyen dönemde temel bilim araştırmalarının yanı sıra klinik araştırmalara da konu olacağına inanmaktayız.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar santral OXA'nın stres durumunda üretimi artan ve strese bağlı gelişen otonom yanıtlarda rol alabilecek bir mediyatör olabileceğini düşündürmektedir. Mide motilite deneylerimizden elde ettiğimiz sonuçlar bize CRF ve OXA'nın strese bağlı gelişen mide dismotilesinde birbirinden bağımsız farklı yollar aracılığıyla etki edebileceğini düşündürmektedir. LHA'da bulunan oreksinerjik nöronların beyindeki RVLM, PVN, NTS ve DMV gibi hem sempatik, hem de parasempatik otonom çıkışların düzenlendiği merkezlere projeksiyonları bulunmaktadır (Peyron ve ark., 1998; Cutler ve ark., 1999; Date ve ark., 1999; Nambu ve ark., 1999). Aynı zamanda bu bölgelerde OX1R'nin varlığı söz konusudur (Marcus ve ark., 2001; Krowicki ve ark., 2002; Shahid ve ark., 2012). Bu anlamda, strese bağlı artan santral endojen OXA'nın mide motor fonksiyonlar üzerine her iki yolak üzerinden de etki edebileceğini düşündürmekte olup OXA'nın bazal ve stres koşullarındaki bu etki mekanizmalarının aydınlatılması için yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Akut stres uygulanan sıçanlardan elde edilen lateral hipotalamik mikrodializatlarda OXA seviyeleri bazal koşullar altındaki kontrol hayvanlarından elde edilenlere göre stres ve stres sonrası dönemde yüksek bulunmuş, CRF antagonistinin ön uygulaması bu artışı ortadan kaldırmıştır.
2. Benzer durum PVN'den elde edilen mikrodializatlarda görülmüş olup, strese bağlı artan CRF seviyeleri OX1R antagonistinin ön uygulaması ile ortadan kalkmıştır.
3. Mide boşalımı ölçümlerinde akut stresin etkisiyle azalan mide boşalımının hem OXA antagonisti, hem de CRF antagonistinin uygulandığı gruplarda önemli derecede düzelirken, CRF ve OXA antagonistlerinin birlikte uygulandığı grupta ise strese bağlı mide boşalımındaki yavaşlamanın tamamen ortadan kalktığı tespit edilmiştir.
4. Akut stresin etkisiyle bozulan koordineli antro-pilorik kontraksiyonlar hem OXA antagonisti, hem de CRF antagonistinin uygulandığı gruplarda önemli derecede düzelme göstermiştir.
5. Stres uygulamasının ardından PVN ve LHA bölgelerinde CRF ve OXA immünoreaktivitelerinde artış tespit edilmiş olup, bu artışların her iki reseptör antagonisti ile de azaldığı belirlenmiştir.
6. Bazal ve stres koşullarında LHA ve PVN'de OXA ve CRF arasındaki resiprokal etkileşimin daha net ifade edilebilmesi için her iki bölgeye anterograd floresan tracer mikroenjeksiyonu yapılarak projeksiyonların tespit edilmesi ve ilgili projeksiyon alanlarındaki reseptörlerin belirlenmesi önem taşımaktadır. Bunun yanı sıra DMV'de mideyi innerve eden pregangliyonik efferent hücrelerin floresan retrograd tracer molekülü ile işaretlenmesi ve bu hücrelerde OXA ve CRF reseptörlerini eksprese edenlerin stres durumunda gelişen nöronal aktivasyon c-Fos immünoreaktivitelerinin belirlenmesi çalışmayı daha da değerli kılacaktır.
7. Bunlara ilave olarak, OXA ve CRF reseptörlerine özgül antikorlar kullanılarak CRF-OXA etkileşiminde rol alan reseptör alt tiplerinin de ortaya çıkarılarak literatüre kazandırılması bu konuda ileriki dönemde yapılacak olan yeni çalışmalara altyapı oluşturacaktır.

KAYNAKLAR

- Aguilera, G., and Rabadan-Diehl, C. "Vasopressinergic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for stress adaptation", *Regul Pept.* 2000; 96, 23-29.
- Aguilera, G., Rabadan-Diehl, C., and Nikodemova, M. "Regulation of pituitary corticotropin releasing hormone receptors", *Peptides.* 2001; 22, 769-774.
- Al-Barazanji, K.A., Wilson, S., Baker, J., Jessop, D.S., and Harbuz, M.S. "Central orexin-A activates hypothalamic-pituitary-adrenal axis and stimulates hypothalamic corticotropin releasing factor and arginine vasopressin neurones in conscious rats", *J Neuroendocrinol.* 2001; 13, 421-424.
- Antunes, V.R., Brailoiu, G.C., Kwok, E.H., Scruggs, P., and Dun, N.J. "Orexins/hypocretins excite rat sympathetic preganglionic neurons in vivo and in vitro", *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001; 281, R1801-1807.
- Arborelius, L., Owens, M.J., Plotsky, P.M., and Nemeroff, C.B. "The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders", *J Endocrinol.* 1999; 160, 1-12.
- Babygirija, R., Zheng, J., Bulbul, M., Cerjak, D., Ludwig, K., and Takahashi, T. "Sustained delayed gastric emptying during repeated restraint stress in oxytocin knockout mice", *J Neuroendocrinol.* 2010; 22, 1181-1186.
- Barrett K, Brooks H, Boitano S, Barman S. Ganong's Review of Medical Physiology. 23rd ed. Arizona: McGraw Hill; 2010, p:261-271; 430-441.
- Bhatia, V., and Tandon, R.K. "Stress and the gastrointestinal tract", *J Gastroenterol Hepatol.* 2005; 20, 332-339.
- Bito, L., Davson, H., Levin, E., Murray, M., and Snider, N. "The concentrations of free amino acids and other electrolytes in cerebrospinal fluid, in vivo dialysate of brain, and blood plasma of the dog", *J Neurochem.* 1966; 13, 1057-1067.
- Bittencourt, J.C., and Sawchenko, P.E. "Do centrally administered neuropeptides access cognate receptors?: an analysis in the central corticotropin-releasing factor system", *J Neurosci.* 2000; 20, 1142-1156.
- Blanco, M., Lopez, M., Garcia-Caballero, T., Gallego, R., Vazquez-Boquete, A., Morel, G., Senaris, R., Casanueva, F., Dieguez, C., and Beiras, A. "Cellular localization of orexin receptors in human pituitary", *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86, 1616-1619.
- Boron W, Boulpaep E. Medical Physiology. 2nd ed. Philadelphia: McGraw Hill; 2012, p:261-271; 351-371.
- Browning, K.N., Babic, T., Toti, L., Holmes, G.M., Coleman, F.H., and Travagli, R.A. "Plasticity in the brainstem vagal circuits controlling gastric motor function triggered by corticotropin releasing factor", *J Physiol.* 2014; 592, 4591-4605.
- Bulbul, M., Babygirija, R., Ludwig, K., and Takahashi, T. "Central orexin-A increases gastric motility in rats", *Peptides.* 2010a; 31, 2118-2122. 64

- Bulbul, M., Babygirija, R., Zheng, J., Ludwig, K.A., and Takahashi, T. "Central orexin-A changes the gastrointestinal motor pattern from interdigestive to postprandial in rats", *Auton Neurosci*. 2010b; 158, 24-30.
- Burks, T.F., Galligan, J.J., Porreca, F., and Barber, W.D. "Regulation of gastric emptying", *Fed Proc*. 1985; 44, 2897-2901.
- Cai, X.J., Liu, X.H., Evans, M., Clapham, J.C., Wilson, S., Arch, J.R., Morris, R., and Williams, G. "Orexins and feeding: special occasions or everyday occurrence?", *Regul Pept*. 2002; 104, 1-9.
- Camilleri, M., Mayer, E.A., Drossman, D.A., Heath, A., Dukes, G.E., McSorley, D., Kong, S., Mangel, A.W., and Northcutt, A.R. "Improvement in pain and bowel function in female irritable bowel patients with alosetron, a 5-HT₃ receptor antagonist", *Aliment Pharmacol Ther*. 1999; 13, 1149-1159.
- Chang, H., Saito, T., Ohiwa, N., Tateoka, M., Deocaris, C.C., Fujikawa, T., and Soya, H. "Inhibitory effects of an orexin-2 receptor antagonist on orexin A- and stress-induced ACTH responses in conscious rats", *Neurosci Res*. 2007; 57, 462-466.
- Charmandari, E., Tsigos, C., and Chrousos, G. "Endocrinology of the stress response", *Annu Rev Physiol*. 2005; 67, 259-284.
- Chefer, V.I., Thompson, A.C., Zapata, A., and Shippenberg, T.S. "Overview of brain microdialysis", *Curr Protoc Neurosci*. 2009; Chapter 7, Unit7 1.
- Chen, C.T., Hwang, L.L., Chang, J.K., and Dun, N.J. "Pressor effects of orexins injected intracisternally and to rostral ventrolateral medulla of anesthetized rats", *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000; 278, R692-697.
- Chrousos, G.P. "Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture", *Ann N Y Acad Sci*. 1998; 851, 311-335.
- Coskun, T., Bozkurt, A., Alican, I., Ozkutlu, U., Kurtel, H., and Yegen, B.C. "Pathways mediating CRF-induced inhibition of gastric emptying in rats", *Regul Pept*. 1997; 69, 113-120.
- Cutler, D.J., Morris, R., Sheridhar, V., Wattam, T.A., Holmes, S., Patel, S., Arch, J.R., Wilson, S., Buckingham, R.E., Evans, M.L., Leslie, R.A., and Williams, G. "Differential distribution of orexin-A and orexin-B immunoreactivity in the rat brain and spinal cord", *Peptides*. 1999; 20, 1455-1470.
- Czimmer, J., Million, M., and Tache, Y. "Urocortin 2 acts centrally to delay gastric emptying through sympathetic pathways while CRF and urocortin 1 inhibitory actions are vagal dependent in rats", *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006; 290, G511-518.
- Date, Y., Ueta, Y., Yamashita, H., Yamaguchi, H., Matsukura, S., Kangawa, K., Sakurai, T., Yanagisawa, M., and Nakazato, M. "Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems", *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96, 748-753.

de Lecea, L., Kilduff, T.S., Peyron, C., Gao, X., Foye, P.E., Danielson, P.E., Fukuhara, C., Battenberg, E.L., Gautvik, V.T., Bartlett, F.S., 2nd, Frankel, W.N., van den Pol, 65 A.N., Bloom, F.E., Gautvik, K.M., and Sutcliffe, J.G. "The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity", *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95, 322-327.

Drossman, D.A. "Functional Gastrointestinal Disorders: History, Pathophysiology, Clinical Features and Rome IV", *Gastroenterology*. 2016; 150, 1262–1279.

Drossman, D.A., and Hasler, W.L. "Rome IV-Functional GI Disorders: Disorders of Gut-Brain Interaction", *Gastroenterology*. 2016; 150, 1257-1261.

Dun, N.J., Le Dun, S., Chen, C.T., Hwang, L.L., Kwok, E.H., and Chang, J.K. "Orexins: a role in medullary sympathetic outflow", *Regul Pept*. 2000; 96, 65-70.

Dunn, A.J., and Berridge, C.W. "Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses?", *Brain Res Brain Res Rev*. 1990; 15, 71-100.

Ebrahim, I.O., Howard, R.S., Kopelman, M.D., Sharief, M.K., and Williams, A.J. "The hypocretin/orexin system", *J R Soc Med*. 2002; 95, 227-230.

Flier, J.S., and Maratos-Flier, E. "Obesity and the hypothalamus: novel peptides for new pathways", *Cell*. 1998; 92, 437-440.

Flores, A., Maldonado, R., and Berrendero, F. "Cannabinoid-hypocretin cross-talk in the central nervous system: what we know so far", *Frontiers in Neuroscience*. 2013; 7, 256.

Furness, J.B. "The enteric nervous system and neurogastroenterology", *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012; 9, 286-294.

Furness, J.B., Kunze, W.A., and Clerc, N. "Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut. II. The intestine as a sensory organ: neural, endocrine, and immune responses", *Am J Physiol*. 1999; 277, G922-928.

Gilbey, M.P., and Spyer, K.M. "Essential organization of the sympathetic nervous system", *Baillieres Clin Endocrinol Metab*. 1993; 7, 259-278.

Grabauskas, G., and Moises, H.C. "Gastrointestinal-projecting neurones in the dorsal motor nucleus of the vagus exhibit direct and viscerotopically organized sensitivity to orexin", *J Physiol*. 2003; 549, 37-56.

Gue, M., Fioramonti, J., Frexinos, J., Alvinerie, M., and Bueno, L. "Influence of acoustic stress by noise on gastrointestinal motility in dogs", *Dig Dis Sci*. 1987; 32, 1411-1417.

Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology* Çeviren: Çağlayan Yeğen, B. Tıbbi Fizyoloji. 12. basım, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., İstanbul; 2013, s: 729-739.

Hagan, J.J., Leslie, R.A., Patel, S., Evans, M.L., Wattam, T.A., Holmes, S., Benham, C.D., Taylor, S.G., Routledge, C., Hemmati, P., Munton, R.P., Ashmeade, T.E., Shah, A.S., Hatcher, J.P., Hatcher, P.D., Jones, D.N., Smith, M.I., Piper, D.C., Hunter, A.J., Porter, R.A., and Upton, N. "Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat", *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96, 10911-10916. 66

- Hao, H., Luan, X., Guo, F., Sun, X., Gong, Y., and Xu, L. "Lateral hypothalamic area orexin-A influence the firing activity of gastric distension-sensitive neurons and gastric motility in rats", *Neuropeptides*. 2016; 57, 45-52.
- Hara, J., Yanagisawa, M., and Sakurai, T. "Difference in obesity phenotype between orexin-knockout mice and orexin neuron-deficient mice with same genetic background and environmental conditions", *Neurosci Lett*. 2005; 380, 239-242.
- Haynes, A.C., Jackson, B., Chapman, H., Tadayyon, M., Johns, A., Porter, R.A., and Arch, J.R. "A selective orexin-1 receptor antagonist reduces food consumption in male and female rats", *Regul Pept*. 2000; 96, 45-51.
- Heinonen, M.V., Purhonen, A.K., Makela, K.A., and Herzig, K.H. "Functions of orexins in peripheral tissues", *Acta Physiol (Oxf)*. 2008; 192, 471-485.
- Herman, J.P., and Cullinan, W.E. "Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis", *Trends Neurosci*. 1997; 20, 78-84.
- Herman, J.P., Figueiredo, H., Mueller, N.K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M.M., Choi, D.C., and Cullinan, W.E. "Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness", *Front Neuroendocrinol*. 2003; 24, 151-180.
- Hirota, K., Kushikata, T., Kudo, M., Kudo, T., Smart, D., and Matsuki, A. "Effects of central hypocretin-1 administration on hemodynamic responses in young-adult and middle-aged rats", *Brain Res*. 2003; 981, 143-150.
- Holstege, G. "The emotional motor system", *Eur J Morphol*. 1992; 30, 67-79.
- Holstege, G., Bandler, R., and Saper, C.B. "The emotional motor system", *Prog Brain Res*. 1996; 107, 3-6.
- Holzer, P., Michl, T., Danzer, M., Jocic, M., Schicho, R., and Lippe, I.T. "Surveillance of the gastrointestinal mucosa by sensory neurons", *J Physiol Pharmacol*. 2001; 52, 505-521.
- Huang, S.C., Dai, Y.W.E., Lee, Y.H., Chiou, L.C., and Hwang, L.L. "Orexins Depolarize Rostral Ventrolateral Medulla Neurons and Increase Arterial Pressure and Heart Rate in Rats Mainly via Orexin 2 Receptors", *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2010; 334, 522-529.
- Huether, G. "The central adaptation syndrome: psychosocial stress as a trigger for adaptive modifications of brain structure and brain function", *Prog Neurobiol*. 1996; 48, 569-612.
- Huether, G., Doering, S., Ruger, U., Ruther, E., and Schussler, G. "The stress-reaction process and the adaptive modification and reorganization of neuronal networks", *Psychiatry Res*. 1999; 87, 83-95.
- Hunt, J.N. "Mechanisms and disorders of gastric emptying", *Annu Rev Med*. 1983; 34, 219-229.
- Hyman, S.E. "How adversity gets under the skin", *Nat Neurosci*. 2009; 12, 241-243. 67

- Ida, T., Nakahara, K., Murakami, T., Hanada, R., Nakazato, M., and Murakami, N. "Possible involvement of orexin in the stress reaction in rats", *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 270, 318-323.
- Imaki, T., Naruse, M., Harada, S., Chikada, N., Nakajima, K., Yoshimoto, T., and Demura, H. "Stress-induced changes of gene expression in the paraventricular nucleus are enhanced in spontaneously hypertensive rats", *J Neuroendocrinol.* 1998; 10, 635-643.
- Ishiguchi, T., Tada, H., Nakagawa, K., Yamamura, T., and Takahashi, T. "Hyperglycemia impairs antro-pyloric coordination and delays gastric emptying in conscious rats", *Auton Neurosci.* 2002; 95, 112-120.
- Jaszberenyi, M., Bujdoso, E., Pataki, I., and Telegdy, G. "Effects of orexins on the hypothalamic-pituitary-adrenal system", *J Neuroendocrinol.* 2000; 12, 1174-1178.
- Jones, M.P., Dilley, J.B., Drossman, D., and Crowell, M.D. "Brain-gut connections in functional GI disorders: anatomic and physiologic relationships", *Neurogastroenterol Motil.* 2006; 18, 91-103.
- Kalin, N.H., Takahashi, L.K., and Chen, F.L. "Restraint stress increases corticotropin-releasing hormone mRNA content in the amygdala and paraventricular nucleus", *Brain Res.* 1994; 656, 182-186.
- Kihara, N., Fujimura, M., Yamamoto, I., Itoh, E., Inui, A., and Fujimiya, M. "Effects of central and peripheral urocortin on fed and fasted gastroduodenal motor activity in conscious rats", *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001; 280, G406-419.
- Kirchgeßner, A.L. "Orexins in the brain-gut axis", *Endocr Rev.* 2002; 23, 1-15.
- Kirchgeßner, A.L., and Liu, M. "Orexin synthesis and response in the gut", *Neuron.* 1999; 24, 941-951.
- Kobashi, M., Furudono, Y., Matsuo, R., and Yamamoto, T. "Central orexin facilitates gastric relaxation and contractility in rats", *Neurosci Lett.* 2002; 332, 171-174.
- Komaki, G., Matsumoto, Y., Nishikata, H., Kawai, K., Nozaki, T., Takii, M., Sogawa, H., and Kubo, C. "Orexin-A and leptin change inversely in fasting non-obese subjects", *Eur J Endocrinol.* 2001; 144, 645-651.
- Konturek, P.C., Brzozowski, T., and Konturek, S.J. "Stress and the gut: pathophysiology, clinical consequences, diagnostic approach and treatment options", *J Physiol Pharmacol.* 2011; 62, 591-599.
- Koob, G.F., and Bloom, F.E. "Corticotropin-releasing factor and behavior", *Fed Proc.* 1985; 44, 259-263.
- Korczynski, W., Ceregrzyn, M., Matyjek, R., Kato, I., Kuwahara, A., Wolinski, J., and Zabielski, R. "Central and local (enteric) action of orexins", *J Physiol Pharmacol.* 2006; 57 Suppl 6, 17-42.
- Krowicki, Z.K., Burmeister, M.A., Berthoud, H.R., Scullion, R.T., Fuchs, K., and Hornby, P.J. "Orexins in rat dorsal motor nucleus of the vagus potentially stimulate gastric motor function", *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002; 283, G465-472. 68

- Kukkonen, J.P., Holmqvist, T., Ammoun, S., and Akerman, K.E. "Functions of the orexinergic/hypocretinergic system", *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002; 283, C1567-1591.
- Kuru, M., Ueta, Y., Serino, R., Nakazato, M., Yamamoto, Y., Shibuya, I., and Yamashita, H. "Centrally administered orexin/hypocretin activates HPA axis in rats", *Neuroreport.* 2000; 11, 1977-1980.
- Larauche, M., Mulak, A., and Tache, Y. "Stress and visceral pain: from animal models to clinical therapies", *Exp Neurol.* 2012; 233, 49-67.
- Lee, C., and Sarna, S.K. "Central regulation of gastric emptying of solid nutrient meals by corticotropin releasing factor", *Neurogastroenterol Motil.* 1997; 9, 221-229.
- Lenz, H.J., Burlage, M., Raedler, A., and Greten, H. "Central nervous system effects of corticotropin-releasing factor on gastrointestinal transit in the rat", *Gastroenterology.* 1988a; 94, 598-602.
- Lenz, H.J., Raedler, A., Greten, H., Vale, W.W., and Rivier, J.E. "Stress-induced gastrointestinal secretory and motor responses in rats are mediated by endogenous corticotropin-releasing factor", *Gastroenterology.* 1988b; 95, 1510-1517.
- Lewis, M.W., Hermann, G.E., Rogers, R.C., and Travagli, R.A. "In vitro and in vivo analysis of the effects of corticotropin releasing factor on rat dorsal vagal complex", *J Physiol.* 2002; 543, 135-146.
- Lopez, M., Senaris, R., Gallego, R., Garcia-Caballero, T., Lago, F., Seoane, L., Casanueva, F., and Dieguez, C. "Orexin receptors are expressed in the adrenal medulla of the rat", *Endocrinology.* 1999; 140, 5991-5994.
- Lu, X.Y., Bagnol, D., Burke, S., Akil, H., and Watson, S.J. "Differential distribution and regulation of OX1 and OX2 orexin/hypocretin receptor messenger RNA in the brain upon fasting", *Horm Behav.* 2000; 37, 335-344.
- Luiten, P.G., ter Horst, G.J., Karst, H., and Steffens, A.B. "The course of paraventricular hypothalamic efferents to autonomic structures in medulla and spinal cord", *Brain Res.* 1985; 329, 374-378.
- Lund, P.E., Shariatmadari, R., Uustare, A., Detheux, M., Parmentier, M., Kukkonen, J.P., and Akerman, K.E. "The orexin OX1 receptor activates a novel Ca²⁺ influx pathway necessary for coupling to phospholipase C", *J Biol Chem.* 2000; 275, 30806-30812.
- Marcus, J.N., Aschkenasi, C.J., Lee, C.E., Chemelli, R.M., Saper, C.B., Yanagisawa, M., and Elmquist, J.K. "Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain", *J Comp Neurol.* 2001; 435, 6-25.
- Martinez, V., Barquist, E., Rivier, J., and Tache, Y. "Central CRF inhibits gastric emptying of a nutrient solid meal in rats: the role of CRF2 receptors", *Am J Physiol.* 1998; 274, G965-970.
- Martins, P.J., D'Almeida, V., Pedrazzoli, M., Lin, L., Mignot, E., and Tufik, S. "Increased hypocretin-1 (orexin-a) levels in cerebrospinal fluid of rats after short-term forced activity", *Regul Pept.* 2004; 117, 155-158. 69

Masere C, N.Y., Zheng J, Babygirija R, Ludwig K, Takahashi T. "Chronic restraint stress has no more stimulatory effects on colonic motility in rats. ", *Neurosci Lett*. 2009; 453, 147-150.

Mayer, E.A. "The neurobiology of stress and gastrointestinal disease", *Gut*. 2000; 47, 861-869.

McCall, R.B. "Effects of putative neurotransmitters on sympathetic preganglionic neurons", *Annu Rev Physiol*. 1988; 50, 553-564.

Mobarakeh, J.I., Takahashi, K., Sakurada, S., Nishino, S., Watanabe, H., Kato, M., Naghdi, N., and Yanai, K. "Enhanced antinociception by intracerebroventricularly administered orexin A in histamine H1 or H2 receptor gene knockout mice", *Pain*. 2005; 118, 254-262.

Mondal, M.S., Nakazato, M., Date, Y., Murakami, N., Yanagisawa, M., and Matsukura, S. "Widespread distribution of orexin in rat brain and its regulation upon fasting", *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 256, 495-499.

Mondal, M.S., Nakazato, M., and Matsukura, S. "Orexins (hypocretins): novel hypothalamic peptides with divergent functions", *Biochem Cell Biol*. 2000; 78, 299-305.

Monnikes, H., Schmidt, B.G., Raybould, H.E., and Tache, Y. "CRF in the paraventricular nucleus mediates gastric and colonic motor response to restraint stress", *Am J Physiol*. 1992; 262, G137-143.

Nakade, Y., Tsuchida, D., Fukuda, H., Iwa, M., Pappas, T.N., and Takahashi, T. "Restraint stress delays solid gastric emptying via a central CRF and peripheral sympathetic neuron in rats", *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005; 288, R427-432.

Nakade, Y., Tsuchida, D., Fukuda, H., Iwa, M., Pappas, T.N., and Takahashi, T. "Restraint stress augments postprandial gastric contractions but impairs antropyloric coordination in conscious rats", *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006; 290, R616-624.

Nambu, T., Sakurai, T., Mizukami, K., Hosoya, Y., Yanagisawa, M., and Goto, K. "Distribution of orexin neurons in the adult rat brain", *Brain Res*. 1999; 827, 243-260.

Nieuwenhuys, R. "The greater limbic system, the emotional motor system and the brain", *Prog Brain Res*. 1996; 107, 551-580.

Nozu, T., Kumei, S., Takakusaki, K., Ataka, K., Fujimiya, M., and Okumura, T. "Central orexin-A increases colonic motility in conscious rats", *Neurosci Lett*. 2011; 498, 143-146.

Nozu, T., Tuchiya, Y., Kumei, S., Takakusaki, K., Ataka, K., Fujimiya, M., and Okumura, T. "Endogenous orexin-A in the brain mediates 2-deoxy-d-glucose-induced stimulation of gastric motility in freely moving conscious rats", *Journal of Gastroenterology*. 2012; 47, 404-411.

O'Connor, T.M., O'Halloran, D.J., and Shanahan, F. "The stress response and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: from molecule to melancholia", *QJM*. 2000; 93, 323-333. 70

- Okumura, T., and Namiki, M. "Vagal Motor Neurons Innervating the Stomach Are Site-Specifically Organized in the Dorsal Motor Nucleus of the Vagus Nerve in Rats", *Journal of the Autonomic Nervous System*. 1990; 29, 157-162.
- Paxinos, C.W.a.G. "The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 3rd edition", Academic Press, San Francisco. 1997.
- Peyron, C., Tighe, D.K., van den Pol, A.N., de Lecea, L., Heller, H.C., Sutcliffe, J.G., and Kilduff, T.S. "Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems", *J Neurosci*. 1998; 18, 9996-10015.
- Randeva, H.S., Karteris, E., Grammatopoulos, D., and Hillhouse, E.W. "Expression of orexin-A and functional orexin type 2 receptors in the human adult adrenals: implications for adrenal function and energy homeostasis", *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86, 4808-4813.
- Ripley, B., Fujiki, N., Okura, M., Mignot, E., and Nishino, S. "Hypocretin levels in sporadic and familial cases of canine narcolepsy", *Neurobiol Dis*. 2001; 8, 525-534.
- Ross, C.A., Ruggiero, D.A., and Reis, D.J. "Projections from the nucleus tractus solitarius to the rostral ventrolateral medulla", *J Comp Neurol*. 1985; 242, 511-534.
- Russell, S.H., Small, C.J., Dakin, C.L., Abbott, C.R., Morgan, D.G., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. "The central effects of orexin-A in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in vivo and in vitro in male rats", *J Neuroendocrinol*. 2001; 13, 561-566.
- Saad, R.J., and Chey, W.D. "Review article: current and emerging therapies for functional dyspepsia", *Aliment Pharmacol Ther*. 2006; 24, 475-492.
- Sakamoto, F., Yamada, S., and Ueta, Y. "Centrally administered orexin-A activates corticotropin-releasing factor-containing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and central amygdaloid nucleus of rats: possible involvement of central orexins on stress-activated central CRF neurons", *Regul Pept*. 2004; 118, 183-191.
- Sakurai, T. "Orexins and orexin receptors: implication in feeding behavior", *Regul Pept*. 1999; 85, 25-30.
- Sakurai, T. "The role of orexin in motivated behaviours", *Nat Rev Neurosci*. 2014; 15, 719-731.
- Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R.M., Tanaka, H., Williams, S.C., Richardson, J.A., Kozlowski, G.P., Wilson, S., Arch, J.R., Buckingham, R.E., Haynes, A.C., Carr, S.A., Annan, R.S., McNulty, D.E., Liu, W.S., Terrett, J.A., Elshourbagy, N.A., Bergsma, D.J., and Yanagisawa, M. "Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior", *Cell*. 1998; 92, 1-696.
- Samson, W.K., Bagley, S.L., Ferguson, A.V., and White, M.M. "Hypocretin/orexin type 1 receptor in brain: role in cardiovascular control and the neuroendocrine response to immobilization stress", *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007; 292, R382-387.
- Samson, W.K., and Resch, Z.T. "The hypocretin/orexin story", *Trends Endocrinol Metab*. 2000; 11, 257-262. 71

- Sapolsky, R.M., Armanini, M.P., Packan, D.R., Sutton, S.W., and Plotsky, P.M. "Glucocorticoid feedback inhibition of adrenocorticotrophic hormone secretagogue release. Relationship to corticosteroid receptor occupancy in various limbic sites", *Neuroendocrinology*. 1990; 51, 328-336.
- Selye, H. 1998. "A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936", *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 10, 230-231.
- Shahid, I.Z., Rahman, A.A., and Pilowsky, P.M. "Orexin A in rat rostral ventrolateral medulla is pressor, sympatho-excitatory, increases barosensitivity and attenuates the somato-sympathetic reflex", *Br J Pharmacol*. 2012; 165, 2292-2303.
- Shirasaka, T., Nakazato, M., Matsukura, S., Takasaki, M., and Kannan, H. "Sympathetic and cardiovascular actions of orexins in conscious rats", *Am J Physiol*. 1999; 277, R1780-1785.
- Siegel, J.M., Moore, R., Thannickal, T., and Nienhuis, R. "A brief history of hypocretin/orexin and narcolepsy", *Neuropsychopharmacology*. 2001; 25, S14-20.
- Sinen, O., Bulbul, M., and Izgut-Uysal, V.N. "The Role of Endogenous Central Orexin-A in Gastric Emptying in Rats", *Acta Physiologica*. 2015; 215, 25-25.
- Smart, D., Jerman, J.C., Brough, S.J., Rushton, S.L., Murdock, P.R., Jewitt, F., Elshourbagy, N.A., Ellis, C.E., Middlemiss, D.N., and Brown, F. "Characterization of recombinant human orexin receptor pharmacology in a Chinese hamster ovary cell-line using FLIPR", *Br J Pharmacol*. 1999; 128, 1-3.
- Stricker-Krongrad, A., and Beck, B. "Modulation of hypothalamic hypocretin/orexin mRNA expression by glucocorticoids", *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 296, 129-133.
- Sutcliffe, J.G., and de Lecea, L. "The hypocretins: excitatory neuromodulatory peptides for multiple homeostatic systems, including sleep and feeding", *J Neurosci Res*. 2000; 62, 161-168.
- Szuran, T.F., Pliska, V., Pokorny, J., and Welzl, H. "Prenatal stress in rats: effects on plasma corticosterone, hippocampal glucocorticoid receptors, and maze performance", *Physiol Behav*. 2000; 71, 353-362.
- Tache, Y., and Bonaz, B. "Corticotropin-releasing factor receptors and stress-related alterations of gut motor function", *J Clin Invest*. 2007; 117, 33-40.
- Tache, Y., Maeda-Hagiwara, M., and Turkelson, C.M. "Central nervous system action of corticotropin-releasing factor to inhibit gastric emptying in rats", *Am J Physiol*. 1987; 253, G241-245.
- Tache, Y., Martinez, V., Million, M., and Wang, L. "Stress and the gastrointestinal tract III. Stress-related alterations of gut motor function: role of brain corticotropin-releasing factor receptors", *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001; 280, G173-177.
- Takahashi, N., Okumura, T., Yamada, H., and Kohgo, Y. "Stimulation of gastric acid secretion by centrally administered orexin-A in conscious rats", *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 254, 623-627. 72.

- Travagli, R.A., and Anselmi, L. "Vagal neurocircuitry and its influence on gastric motility", *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016; 13, 389-401.
- Trivedi, P., Yu, H., MacNeil, D.J., Van der Ploeg, L.H., and Guan, X.M. "Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain", *FEBS Lett*. 1998; 438, 71-75.
- Tsigos, C., and Chrousos, G.P. "Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress", *J Psychosom Res*. 2002; 53, 865-871.
- Tsujino, N., and Sakurai, T. "Role of orexin in modulating arousal, feeding, and motivation", *Front Behav Neurosci*. 2013; 7, 28.
- Tung, L.W., Lu, G.L., Lee, Y.H., Yu, L., Lee, H.J., Leishman, E., Bradshaw, H., Hwang, L.L., Hung, M.S., Mackie, K., Zimmer, A., and Chiou, L.C. "Orexins contribute to restraint stress-induced cocaine relapse by endocannabinoid-mediated disinhibition of dopaminergic neurons", *Nat Commun*. 2016; 7, 12199.
- Uramura, K., Funahashi, H., Muroya, S., Shioda, S., Takigawa, M., and Yada, T. "Orexin-a activates phospholipase C- and protein kinase C-mediated Ca²⁺ signaling in dopamine neurons of the ventral tegmental area", *Neuroreport*. 2001; 12, 1885-1889.
- Vassallo M, C.M., Phillips SF, Brown ML, Chapman NJ, Thomforde GM. "Transit through the proximal colon influences stool weight in the irritable bowel syndrome.", *Gastroenterology*. 1992; 102, 102-108.
- Welberg, L.A., and Seckl, J.R. "Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain", *J Neuroendocrinol*. 2001; 13, 113-128.
- Williams, C.L., Villar, R.G., Peterson, J.M., and Burks, T.F. "Stress-induced changes in intestinal transit in the rat: a model for irritable bowel syndrome", *Gastroenterology*. 1988; 94, 611-621.
- Willie, J.T., Chemelli, R.M., Sinton, C.M., and Yanagisawa, M. "To eat or to sleep? Orexin in the regulation of feeding and wakefulness", *Annu Rev Neurosci*. 2001; 24, 429-458.
- Winsky-Sommerer, R., Yamanaka, A., Diano, S., Borok, E., Roberts, A.J., Sakurai, T., Kilduff, T.S., Horvath, T.L., and de Lecea, L. "Interaction between the corticotropin-releasing factor system and hypocretins (orexins): a novel circuit mediating stress response", *J Neurosci*. 2004; 24, 11439-11448.
- Xiao, F., Jiang, M., Du, D., Xia, C., Wang, J., Cao, Y., Shen, L., and Zhu, D. "Orexin A regulates cardiovascular responses in stress-induced hypertensive rats", *Neuropharmacology*. 2013; 67, 16-24.
- Yabana, T., and Yachi, A. "Stress-induced vascular damage and ulcer", *Dig Dis Sci*. 1988; 33, 751-761.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Osman	Uyruğu	T.C.
Soyadı	SİNEN	Tel no	0536 467 6392
Doğum tarihi	03.01.1990	e-posta	osmansinen@akdeniz.edu.tr

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	700.Yıl Süper Lisesi	2008
Lisans	Pamukkale Üniversitesi (Biyoloji)	2013
Yüksek Lisans		
Doktora		

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Araş. Gör.	Akdeniz Üniversitesi	2014-

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YDS	73,75

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Strese Bağlı Bozulan Gastrointestinal Motilitede Apelin ve Kolesistokinin İlişkisinin Beyin-Barsak Ekseninde Araştırılması	Tübitak-1001	2015-2017
Nöropeptit-S'in Parkinson Hastalığındaki Tedavi Edici ve Koruyucu Etkilerinin Araştırılması	Tübitak-1003	2016-2018
Strese Bağlı Bozulan Mide Motilitesinde Santral Oreksin-A'nın Rolü	BAP	2015-2017
Maternal Separasyon ile Oluşturulan Deneysel İrritabl Bağırsak Sendromu	BAP	2016-2018

Modelinde Nöropeptit-S'in Araştırılması	Santral Rolünün		
---	--------------------	--	--

Burslar-Ödüller:

- Poster Sunumu Üçüncülük Ödülü, Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 41. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2015

Yayınlar ve Bildiriler:

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

- Bülbül M., **Sinen O.**, Birsen İ., Uysal V.N., " Peripheral apelin-13 administration inhibits gastrointestinal motor functions in rats: the role of cholecystokinin through CCK1 receptor-mediated pathway", *Neuropeptides*, DOI: 10.1016/j.npep.2016.12.001
- Bülbül M., **Sinen O.**, Gemici B., Uysal V.N., "Opposite effects of central oxytocin and arginine vasopressin on changes in gastric motor function induced by chronic stress.", *Peptides*, S0196-9781(16)30215-7, 2016
- Bülbül M., Izgut-Uysal V.N., **Sinen O.**, Birsen I., Tanrıöver G., "Central apelin mediates stress-induced gastrointestinal motor dysfunction in rats", *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol.310, pp.G249-G261, 2016.
- Bülbül M., **Sinen O.**, Uysal V.N. "The Effect of Central Neuropeptide-S on Gastrointestinal Motor Dysfunction Induced by Maternal Separation", *Acta Physiologica*, Volume:215, Pages: 58-58, 2015, (Özet).
- **Sinen O.**, Bülbül M., Uysal V.N., "The Role of Endogenous Central Orexin-A in Gastric Emptying in Rats", *Acta Physiologica*, Volume:215, Pages: 25-25, 2015, (Özet).
- **Sinen O.**, Bülbül M., Birsen İ., Uysal V.N., "The Role of Central Oxytocin in Chronic Homotypic Stress-induced Gastric Motor Adaptation", *Acta Physiologica*, Volume:218, Pages: 23-23, 2016, (Özet).

- Bülbül M., **Sinen O.**, Birsen  ., Uysal V.N., “The Role of Central Arginine Vasopressin in Colonic Motor Maladaptation Induced by Chronic Heterotypic Stress”, Acta Physiologica, Volume:218, Pages: 61-61, 2016, ( zet).
- Birsen  ., Bülbül M., **Sinen O.**, Uysal V.N. “Central Apelin Inhibits Gastric Motility via APJ Receptor-mediated Vagal Efferent Pathway” Acta Physiologica, Volume:218, Pages: 24-24, 2016, ( zet).
- Bülbül M., **Sinen O.**, Uysal V.N.,  zsoy  ., Akkoyunlu G., Parlak H., Özkan A., Birsen  ., Ağar A., “The Protective Effect of Central Exogenous Neuropeptide-S on Parkinson’s Disease”, Acta Physiologica, Volume:218, Pages: 75-75, 2016, ( zet).

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler :

- **Sinen O.**, Bülbül M., Uysal V.N., "Peripheral Apelin Inhibits Gastrointestinal Motor Functions via CCK-dependent Pathway", Experimental Biology 2016, San Diego, ABD, 2-6 Nisan 2016, pp.34-34
- Bülbül M., **Sinen O.**, Uysal V.N., "Central Exogenous Neuropeptide-S Ameliorates Stress-Induced Impaired Gastric Emptying through Orexin-Mediated Pathway in Rats", Experimental Biology 2016, San Diego, ABD, 2-6 Nisan 2016, pp.34-34

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

- Bülbül M., **Sinen O.**, Uysal V.N. “Santral Nöropeptit-S'in Maternal Separasyona Bağlı Oluşan Gastrointestinal Motor Disfonksiyona Etkisi”. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 41. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Çanakkale, Türkiye, 9-13 Eylül 2015.
- **Sinen O.**, Bülbül M., Uysal V.N., “Sıçanlarda Endojen Santral Oreksin-A'nın Mide Boşalımındaki Rolü”. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 41. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Çanakkale Türkiye, 9-13 Eylül 2015.
- Bülbül M., **Sinen O.**, Birsen  ., Uysal V.N., “Kronik Heterotipik Stres Modeliyle Oluşturulan Kolonik Motor Maladaptasyonda Santral Arjinin Vazopressin'in

Rolü”. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 42. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Düzce, Türkiye, 5-8 Eylül 2016, ss:95-95.

- **Sinen O.**, Bülbül M., Birsen İ., Uysal V.N., “Kronik Homotipik Strese Bağlı Gelişen Gastrik Motor Adaptasyonda Santral Oksitosin’in Rolü”. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 42. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Düzce, Türkiye, 5-8 Eylül 2016, ss:45-45.
- Birsen İ., Bülbül M., **Sinen O.**, Uysal V.N. “ Santral Apelin Gastrik Motiliteyi APJ Reseptörü-aracılı Vagal Efferent Yolak Üzerinden İnhibe Eder”. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 42. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Düzce, Türkiye, 5-8 Eylül 2016, ss:45-45.
- Bülbül M., **Sinen O.**, Uysal V.N., Özsoy Ö., Akkoyunlu G., Parlak H., Özkan A., Birsen İ., Ağar A., “Santral Ekzojen Nöropeptit-S’in Parkinson Hastalığı’na Karşı Koruyucu Etkisi”. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 42. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Düzce, Türkiye, 5-8 Eylül 2016, ss:107-107.