



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BEYİN SAPI ve HİPOTALAMUS ARASINDAKİ
KATEKOLAMİNERJİK BAĞLANTININ DAVRANIŞSAL
ROLÜNÜN İNCELENMESİ**

GİZEM FİLİZ

TIBBİ FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Dr.Öğr.Üye. MUHAMMED İKBAL ALP

İSTANBUL-2019



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BEYİN SAPI ve HİPOTALAMUS ARASINDAKİ
KATEKOLAMİNERJİK BAĞLANTININ DAVRANIŞSAL
ROLÜNÜN İNCELENMESİ**

GİZEM FİLİZ

TIBBİ FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Dr.Öğr.Üye. MUHAMMED İKBAL ALP

İSTANBUL-2019

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()
Anabilim Dalı : Tıbbi Fizyoloji
Tez Sahibi : Gizem FİLİZ
Tez Başlığı : Beyin Sapı ve Hipotalamus Arasındaki Katekolaminerjik Bağlantının Davranışsal Rolünün İncelenmesi
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kavacık Yerleşkesi
Sınav Tarihi : 02 Ağustos 2019

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Dr.Öğr.Üyesi Muhammed İkbâl ALP

Kurumu

İstanbul Medipol Üniversitesi

İmza



Sınav Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Gürkan ÖZTÜRK

İstanbul Medipol Üniversitesi



Prof.Dr. Güler ÖZTÜRK

İstanbul Medeniyet Üniversitesi



Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 08./08./2019 tarih ve 2019.../25... - 03... sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nesrin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü V.



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 içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Gizem FİLİZ



TEŞEKKÜR

Bu çalışma İstanbul Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Restoratif Araştırma Merkezi'nin sağladığı destek ve olanaklarla yapılmıştır. Bilimsel araştırmalara sağladığı imkanlar için sayın hocalarım Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK ve Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ'a,

Ekiplerine katılmamı sağlayıp yüksek lisans eğitimim boyunca tez çalışmamda büyük katkıları olan, akademik her konuda benden yardımlarını esirgemeyip bilgi ve tecrübelerini aktarıp beni bilimin sihirli dünyasıyla tanıştıran hocalarım Doç. Dr. Deniz ATASOY ve Dr. Nilüfer SAYAR ATASOY' a,

Yol göstericiliği, destek ve yardımları için Dr. Muhammed İkbâl ALP ve Dr. Mehmet Şerif AYDIN'a,

Çalışmamın her aşamasında yardımını esirgemeyip yanımda olan çalışma arkadaşlarım Utku SOĞUKPINAR başta olmak üzere; Yavuz YAVUZ, Pelin DİLSİZ, İskalen Cansu TOPÇU, Merve ÖNCÜL, İltan AKLAN, Fulya KÖKSALAR ALKAN ve Edanur ATEŞ ÖZ'e

Bu çalışmanın tüm zorlu süreçlerinde ve her konuda maddi ve manevi yardım ve desteklerini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Ayşe Server SEZER, Zeynep ALADAĞ, Safiye SERDENGEÇTİ, Rabia BULUN ve Sevginur BOSTAN'a,

Aramızda mesafeler olsa da her ihtiyacım olduğunda her şeyi bir kenara bırakıp desteklerini esirgemeyen ve her daim yanımda olan dostlarım Fatmanur OCAKÇI ve Merve YAVUZ' a,

Ve onların yardımı olmadan buralara gelmem imkansızdı. Benim her kararımdayanımda olup, bana olan inançları sonsuz olan canım ailem babam Kenan FİLİZ, annem Sevgi FİLİZ ve kardeşim İzel FİLİZ'e teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
RESİMLER LİSTESİ	ix
TABLolar LİSTESİ.....	x
1.ÖZET.....	1
2.ABSTRACT.....	3
3.GİRİŞ ve AMAÇ	5
4.GENEL BİLGİLER	7
4.1.Beslenme Davranışının Fizyolojisi	7
4.2.Stres ve Anksiyete	9
4.3.Beyin Sapının Fonksiyonel Anatomisi.....	11
4.3.1.Orta beyin (Mesencephalon).....	12
4.3.2.Pons.....	13
4.3.3.Myelencephalon (Medulla oblongata).....	15
4.3.3.1.Nükleus Traktus Solitarius	16
4.4.Hipotalamus.....	17
4.5.Katekolaminler	18
4.5.1. Dopamin.....	18
4.5.2. Nörepinefrin (Nöradrenalin).....	19
4.5.3. Epinefrin (Adrenalin).....	20
4.6.Hücre Tipi Spesifik Transgen İfadesi ve Transgenik Fare Modeli	20
4.7.Optogenetik Manipülasyon	22
5. Materyal ve Metot.....	24
5.1.Materyal.....	24
5.2.Metot	27
5.2.1. Deney hayvanları	27
5.2.2. Genotipleme.....	28
5.2.3.1. DNA eldesi	28
5.2.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)	28
5.2.2.3. Agaroz jel elektroforezi ve görüntülemesi.....	30
5.2.3. Rekombinant adeno-asosiye (rAAV) virüs üretme.....	31
5.2.3.1. Plazmit DNA eldesi	31
5.2.3.2. DNA izolasyonu	32

5.2.3.3. 293AAV Hücre transfeksiyonu	32
5.2.3.4. Pürifikasyon	32
5.2.4. İntrakranial rekombinant adeno asosiye virüs enjeksiyonu	33
5.2.5. TH nöronlarının sinyal haritasının belirlenmesi	34
5.2.6. Davranış Testleri	35
5.2.6.1. TH nöron aktivasyonunun beslenme üzerindeki etkisi	35
5.2.6.2. NTS' in PVH bölgesi üzerindeki anksiyete etkisi	35
5.2.7. Doku Fiksasyonu ve Kesit Alma	36
5.2.8. İmmünohistokimyasal antikor boyanması	37
5.2.9. Mikroskopik görüntüleme ve analiz	37
5.2.10. İstatistiksel Analizler	38
6. BULGULAR	39
6.1. Deney Grupları ve Genotipleme	39
6.2. Nükleus Traktus Solitarius'daki TH nöronlarının morfolojik görüntüsü	39
6.3. Hipotalamusun NTS ile katekolaminerjik bağlantı yollarının belirlenmesi	40
6.4. NTS' ten PVH giden projeksiyonun besin tüketimiyle ilişkisi	41
6.5. NTS' ten PVH' e gelen nöronlarda anksiyetlik rolü	44
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	50
8. KAYNAKÇA	53
9. ETİK KURUL ONAYI	60
10. ÖZGEÇMİŞ	62

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

Semboller	Açıklamalar
Cre	Causes of Recombination
TH-cre	TH transgenik faresi
TH	Tirosin Hidroksilaz
Lox	Locus of Crossing
FLEX	Flip-Excision
Raav	Rekombinant Adeno-Asosiye Virüs
AAV	Adeno-Asosiye Virüs
ChR2	Channelrhodopsin-2
A/P	Anterior/Posterior
D/V	Dorsal/Ventral
M/L	Medial/Lateral
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
GFP	Yeşil Floresan Protein
NTS	Nucleus Traktus Solitarius
NE	Norepinefrin
NaCl	Sodyum Klorür
HCl	Hidroklorik Asit
NaOH	Sodyum Hidroksit
KCl	Potasyum Klorür
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
EtOH	Etil Alkol
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFA	Paraformaldehit
TAE	Tris-Asetat-EDTA
i.p.	Intraperitoneal
NaHCO ₃	Sodyum Bikarbonat
NaHPO ₄	Sodyum Fosfat

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1.1. Yeme davranışını kontrol eden mekanizmanın şematik gösterimi	8
Şekil 4.2.1. Hipotalamusda bulunan paraventriküler çekirdeğin uyarımı ile stres üzerinde oluşan etkinin şematik gösterimi (30)	10
Şekil 4.3.1. Beyin sapının ön yüzden görünümü (34).....	12
Şekil 4.3.3.1.1. Fare beyninde Nükleus Traktus Solitarius bölgesinin sagittal gösterimi (42).....	16
Şekil 4.3.3.1.2. Fare beyninde Nükleus Traktus Solitarius bölgesinin koronal gösterimi (42).....	16
Şekil 4.4.1. Fare beyninde hipotalamus bölgesinin sagittal gösterimi (42)	17
Şekil 4.4.2. Fare beyninde hipotalamus bölgesinin koronal gösterimi (42).....	17
Şekil 4.5.1. Katekolamin Biyosentez Yolağı	18
Şekil 4.6.1. Cre-LoxP Sistemi (50)	21
Şekil 4.6.2. Hücre tipine özgü transgen ifadesi (50).....	21
Şekil 4.7.1. Optogenetik nöron aktivitesi manipülasyonu (50).....	23
Şekil 6.4.1. TH nöron aktivasyonu gündüz döngüsü FLEX-ChR2 ve FLEX-tdTom enjeksiyonu olan fare gruplarının 6 saatlik besin tüketimi değişimi	43
Şekil 6.4.2. TH nöron aktivasyonu gece döngüsü FLEX-ChR2 ve FLEX-tdTom enjeksiyonu olan fare gruplarının 6 saatlik besin tüketimi değişimi	44
Şekil 6.4.1.1. Nükleus Traktus Solitarius bölgesine ChR2-eYFP enjeksiyonu ve Paraventriküler nükleus bölgesine takılan ferulün şematik gösterimi	45
Şekil 6.4.1.2. TH nöronlarının aktivasyonu ile aktif yer tercihi analizi a) ChR2 ve tdTom gruplarının uyarılmış alanda geçirdiği zaman miktarı b) ChR2 ve tdTom gruplarının uyarımın olduğu bölgesine yapılan ortalama ziyaret sayısı değerleri	46
Şekil 6.4.1.3. ChR2 ve tdTom farelerinin 30 dakikalık protokol sırasında izlediği yol (sol) ve ortalama ısı haritası	46
Şekil 6.4.1.4. TH nöronlarının aktivasyonu sırasında açık alan testi a) FLEX-ChR2 ve FLEX-tdTom gruplarının merkezde kalma süresi b) FLEX-ChR2 ve FLEX-tdTom gruplarının test süresince aldığı yol	47
Şekil 6.4.1.5. ChR2 ve tdTom farelerinin 10 dakikalık protokol sırasında izlediği yol (sol) ve ortalama ısı haritası	47

Şekil 6.4.1.6. Yükseltilmiş artı alan testinde TH nöronlarının aktivasyonu sırasında açık kolda kalma zamanı.....	48
Şekil 6.4.4.7. ChR2 ve tdTom farelerinin 10 dakikalık protokol sırasında ortalama ısı haritası	49



RESİMLER LİSTESİ

Resim 4.2.1.1. Orta beynin enine kesiti (36)	13
Resim 4.2.2.1. Pons'un alt bölümünden bir enine kesit (40)	14
Resim 4.2.2.2. Pons'un üst bölümünden bir enine kesit (40)	15
Resim 6.1.1. C57BL/6 ve TH-cre faresinin genotipleme sonucu	39
Resim 6.2.1. NTS'deki rAAV-FLEX-tdTomato virüsünün enjeksiyonu	40
Resim 6.3.1. NTS'ten Hipotalamusun PVN bölgesine gelen nöron projeksiyonu	40
Resim 6.4.1. Nükleus Traktus Solitarius bölgesine yapılan FLEX-ChR2-eYFP enjeksiyonu	41
Resim 6.4.2. Nükleus Traktus Solitarius bölgesinde Paraventriküler hipotalamusa gelen ChR2-eYFP projeksiyonu	42

TABLolar LİSTESİ

Tablo 5.1.1. DeneYlerde Kullanılan Malzemeler	25
Tablo 5.1.2. DeneYlerde Kullanılan Gereçler	25
Tablo 5.2.2.2.1. Transgenik PCR karışımı.....	29
Tablo 5.2.2.2.2. Kontrol PCR karışımı	29
Tablo 5.2.2.2.3. Gerekli olan primer dizileri.....	30
Tablo 5.2.2.2.4. PCR protokolü	30





1. ÖZET

BEYİN SAPI ve HİPOTALAMUS ARASINDAKİ KATEKOLAMİNERJİK BAĞLANTININ DAVRANIŞSAL ROLÜNÜN İNCELENMESİ

Besin alımı hayatta kalmak için kritik bir önem taşımaktadır. Ancak beslenme miktarı ve beslenme zamanının fizyolojik dengelere uygun olmayışı bir takım olumsuz etkilere yol açabilmektedir. Yemek yeme arzusunun kalori gereksiniminden, lezzetli yiyeceklerin görünüşüne, günün saatinden, sosyal yaşamdaki olaylar ve duygudurum ile ilgili bağlamlara kadar birçok nedeni olabilmektedir. Bu sebeple iştahı düzenleyen sinir devrelerini ve bu devreler içerisinde çalışan sinaptik mekanizmaları anlamak vücut homeostazının korunmasında önemlidir. Yapılan bu çalışmada, beyin sapında bulunan Tirozin hidroksilaz ifade eden nöronların yoğun olduğu Nükleus Traktus Solitarius (NTS) bölgesinin, vücudun iç dengesinin düzenlenmesinden sorumlu olan hipotalamus bölgesinde bulunan Paraventriküler çekirdeğin (PVN) üzerindeki beslenme ve stres davranışına olan etkisi incelenmiştir. Paraventriküler bölgesinin, nükleus traktus solitarius bölgesinden katekolaminerjik projeksiyonlar morfolojik olarak karakterize edilip, yoğun bir şekilde afferent nöronal sinyaller aldığı bulunmuştur. Beyin sapı terminallerinden gelen bu bilginin hipotalamus üzerinde etkisinin tam olarak ne olduğunun hücre tipi spesifik yeni bir nörostimülasyon tekniği olan optogenetik metodla analiz edilmesi araştırmamızın odak noktasını oluşturmaktadır. Bunun için TH (Tirozin hidroksilaz) transgenik fare gruplarında optogenetik teknik kullanılarak NTS'den PVN'e gelen katekolaminerjik projeksiyonlar uyarılarak davranış kayıtları alınmıştır. Bu bağlantılardan PVN'e odaklanılarak NTS'den PVN'e gelen katekolaminerjik projeksiyonların nörepinefrin salgılamasıyla besin alımını artırıcı etki oluşturdukları tesbit edilmiştir. Çalışmanın diğer bir kolunda ise ilgili bölgedeki nörepinefrin salınımının stres üzerinde olan etkisi incelenmiştir. Yapılan stres testleri sonucuyla da stresle ilgili bir bağlantısının olabileceği düşünülmüştür. Bu çalışmayla NTS terminallerinden gelen bilginin paraventriküler hipotalamus üzerinde oreksijenik bir etkisinin olduğu, bununla birlikte stres yollarıyla da muhtemel bir bağlantısı olabileceğine dair önemli bulgular elde edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Hipotalamus, Optogenetik, Nükleus Traktus Solitarius, Paraventriküler Nükleus, Stres, Besin Alımı



2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE BEHAVIORAL ROLE OF CATECHOLAMINERGIC CONNECTION BETWEEN BRAIN STEM AND HYPOTHALAMUS

Food intake is critical to survival. However, the amount of nutrition and the non-compliance of the feeding time with physiological balances can lead to some negative effects. The desire to eat can have many causes, from the caloric requirement to the appearance of delicious food, the time of day, to the contexts of events and moods in social life. For this reason, it is important to understand the nerve circuits that regulate appetite and the synaptic mechanisms that work in these circuits in maintaining body homeostasis. In this study, the effect of the Nucleus Tractus Solitarius (NTS) region in which the tyrosine hydroxylase expressing neurons in the brainstem is concentrated on the nutrition and stress behavior on the Paraventricular nucleus (PVN), which is responsible for the regulation of the internal balance of the body, was examined. Catecholaminergic projections of the paraventricular region from the nucleus tract solitarius were morphologically characterized and received intense afferent neuronal signals. The focus of our research is to analyze the exact effect of this information from the brain stem terminals on the hypothalamus by optogenetic method, a new cell-type specific neurostimulation technique. For this, behavioral recordings were obtained by stimulating catecholaminergic projections from NTS to PVN using optogenetic technique in TH (Tyrosine hydroxylase) transgenic mouse groups. From these connections, focusing on PVN, catecholaminergic projections from NTS to PVN have been found to increase nutrient uptake by secretion of neuropeptide. In another arm of the study, the effect of neuropeptide release on stress was investigated. As a result of the stress tests, it was thought that there might be a connection about stress. In this study, it has been shown that the information from the NTS terminals has an orexigenic effect on the paraventricular hypothalamus, but may also have a possible correlation with the stress pathways.

Key words: Hypothalamus, Optogenetics, Nucleus Tractus Solitarius, Paraventricular Nucleus, Anxiety, Food intake



3. GİRİŞ ve AMAÇ

Enerji dengesi, çevresel sinyalleri sürekli izleyen özel merkezi devreler tarafından sıkı bir şekilde düzenlenmektedir. Son yıllarda keşfedilen beyin bölgesi ve bu bölgelerde bulunan hücre tipi sayısındaki artış bir fonksiyonun arka planında hangi nöronal döngülerin nasıl işlendiği konusunda daha ayrıntılı bilgiler edinmemizi sağlamıştır. Bu durum açlık ve tokluğu kontrol eden sinyallerin arkasındaki nöronal mekanizmaların da keşfine yol açmıştır (1). Bu açlık ve tokluk sinyallerindeki bozulmalar obezite gibi beslenme bozuklukları yanısıra bir çok metabolik hastalık ile de ilişkili olması açısından önem arz etmektedir (2).

Beynin hipotalamus bölgesi beslenme ve enerji dengesinin kontrol edildiği özelleşmiş sinir ağlarını barındırmaktadır. Hipotalamus, yaşamımızı sürdürmemiz için gerekli sinyallerin kontrol edildiği bir merkezdir. Yapılan araştırmalarda hipotalamus çekirdeklerinden arkuat çekirdek (ARC) ve beyin sapında bulunan Nükleus Traktus Solitarius (NTS) enerji dengesi ile ilişkili sinyalleri alarak yiyecek arama ve tüketimini düzenleyen iki önemli beyin alanı olarak gösterilmiştir (3). Beyin sapına gelen bilgiler hipotalamusta değerlendirilip oluşan cevap üretilen hormonlar ile vücuda iletilir (4). Hipotalamustaki bu hormonların düzenlenmesinde etkili muhtemel yollardan biri de katekolaminlerjik yollardır. Beyindeki katekolaminlerjik yolların belirlenmesinde katekolamin salınımından sorumlu olan tirozin hidoksilaz enzimi önemli bir rol oynar. TH enzimi ile belirlenmiş katekolamin yoğunlaşmasının olduğu bölgelerden biri olan ARC'te katekolamin salınımının besin alımını artırıcı etkisi gösterilmiştir (5)(6).

Son yıllarda periferden gelen sinyalleri toplayan NTS ve besin alımının regülasyonundan sorumlu hipotalamus bölgelerinin arasında farklı hücre tiplerine göre ortaya çıkan farklı davranışsal bağlantıların olabileceğine yönelik çalışmalar mevcuttur (7). Beslenme regülasyonun ana düzenleyicilerinden ARC besin alımını artırıcı ya da azaltıcı yönde işlev gösterirken, NTS'in vagal tokluk sinyali yollayarak beslenmeyi durdurucu yönde etki gösterdiği bilinmektedir (3). Yapılan çalışmalar NTS'den hipotalamusa ulaşan hormonal ve nöronal bağlantıların oldukça az bir kısmın oreksijenik olduğunu ortaya koymaktadır (5)(8).

Yeni bir teknik olan optogenetik uyarım sayesinde, tek bir hücre grubunun organizmanın davranışını ve fizyolojisini nasıl etkilediğini belirlemek artık mümkündür. Bu teknik ile tirozin hidroksilaz nöronlarının işlevsel ve bağlantısal özellikleri bulunarak paraventriküler hipotalamus ve nükleus traktus solitarius bölgesi arasındaki katekolaminerjik bağlantıda açıklanamayan bilgi boşluklarının kapsamlı bir şekilde analiz edilmesi amaçlanmaktadır.



4. GENEL BİLGİLER

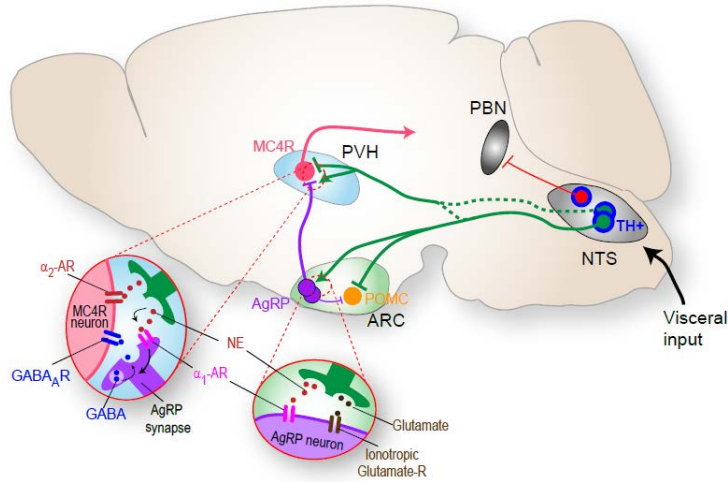
4.1. Beslenme Davranışının Fizyolojisi

Homeostas, vücudumuzda alınan enerjinin harcanan enerjiye eşit olduğu bir denge durumudur. Vücudumuz canlılığını bu iç denge sayesinde devam ettirmektedir. Bu iç dengenin bozulması bir çok sistemde negatif etkiler ortaya çıkarıp patolojik süreçlere yol açmaktadır. Vücut ağırlığının sağlıklı sınırlar içinde tutulması da bu denge halinin sürdürülmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Sağlıklı bir insanda alınan enerji harcanan enerjiye eşittir ve denge durumundadır. Ancak besin alımının azalması vücut ağırlığının azalmasına, besin alımının artması vücut ağırlığında bir artışa yol açar (9). Vücut ağırlığının artışı başta obezite olmak üzere bir çok metabolik, kardiyovasküler ve endokrin hastalığın ortaya çıkmasına sebep olur (10). Bu nedenle besin alımındaki enerji dengesinin korunması sağlıklı bir yaşam için kritik öneme sahiptir. Yapılan birçok çalışma bu dengenin sağlanmasında hipotalamusta bulunan açlık ve tokluktan sorumlu nöron gruplarının önemini ortaya koymaktadır (9).

Hipotalamus, periferik organlardan sürekli sinyal alarak besin alımı davranışını düzenler ve metabolizma hızına göre bir cevap oluşturarak yaşamın devamlılığı için gerekli fonksiyonları yönetir. Hipotalamusa gastrointestinal sistemden gelen bu besinle ilişkili fizyolojik sinyallerin birleşimi besin alımın kontrolünde önemlidir. Tokluk durumunda yağ dokusundan salgılanan leptin hormonu besin alımının inhibisyonunu sağlarken, açlık durumunda mideden salgılanan ghrelin hormonunu açlık hissine yol açmak suretiyle besin alımını artırır (11). Hipotalamus bu fizyolojik değişimlerin yönetiminden sorumlu çekirdekler barındırmaktadır. Lateral hipotalamik çekirdeklerinin uyarımı besin alımında artışa yol açarken, ventromediyal çekirdeğinin uyarımının beslenme davranışını azalttığı bilinmektedir. Bu sebeple lateral çekirdek açlık merkezi olarak, ventromediyal çekirdek ise tokluk merkezi olarak görev alır (12). Bu iki merkez sekonder projeksiyon merkezleri olarak adlandırılır ve her ikisi de besin alımının ana düzenleyicisi olan Arkuat çekirdekteki Agouti-ilişkili peptid (AgRP) ve Proopiomelanocortin (POMC) salgılayan

nöronlardan aktive edici ve inhibe edici sinyaller almaktadır (2). Ayrıca hipotalamusta bu merkezlerin dışında paraventriküler ve dorsomediyal çekirdeklerin de besin alımında görevleri vardır. Yapılan çalışmalar dorsomediyal çekirdeğin besin alımında azalmaya (13) paraventriküler çekirdeğin ise besin alımında artışa (14) neden olduğunu göstermektedir.

Sindirilen gıdalarla ilgili bilgiler mide ve ince bağırsaktan salgılanan kolesistokinin (CCK) ve serotonin (5HT) hormonun vagus sinirinin afferent yolunu uyarması ile arka beyin bölgesine iletilmektedir. Arka beyin bölgesinde bulunan Nükleus Traktus Solitarius çekirdeği vagus sinirinden gelen bu uyarıyı alan merkezlerden birisidir (15). NTS'un vagus siniri tarafından uyarılması CCK, gama aminobütirik asit (GABA) ve norepinefrin gibi birçok nörotransmitteri serbest bırakmak sureti ile besin alımının baskılanması ile sonuçlanır (16). Yapılan son çalışmalar NTS de bulunan CCK nöronlarının beslenmeyi baskılayıcı etkisini PVN'deki melanokortin-4 reseptörü (MC4R) barındıran nöronlar aracılığıyla sağladığı bilinmektedir (17). Aynı zamanda PVN'de yapılan çalışmalarda da bu bölgeye enjekte edilen nörepinefrinin besin alımında artışa yol açtığı belirtilmiştir (18). NTS'deki nörepinefrin sentezleyen nöronların anoreksijenik bir etkisi olduğu bilinmektedir. NTS'den Parabrakial Nükleusa (PBN) olan nörepinefrin projeksiyonların uyarılmasında da anoreksijenik bir etki ortaya çıktığı gösterilmiştir (19).



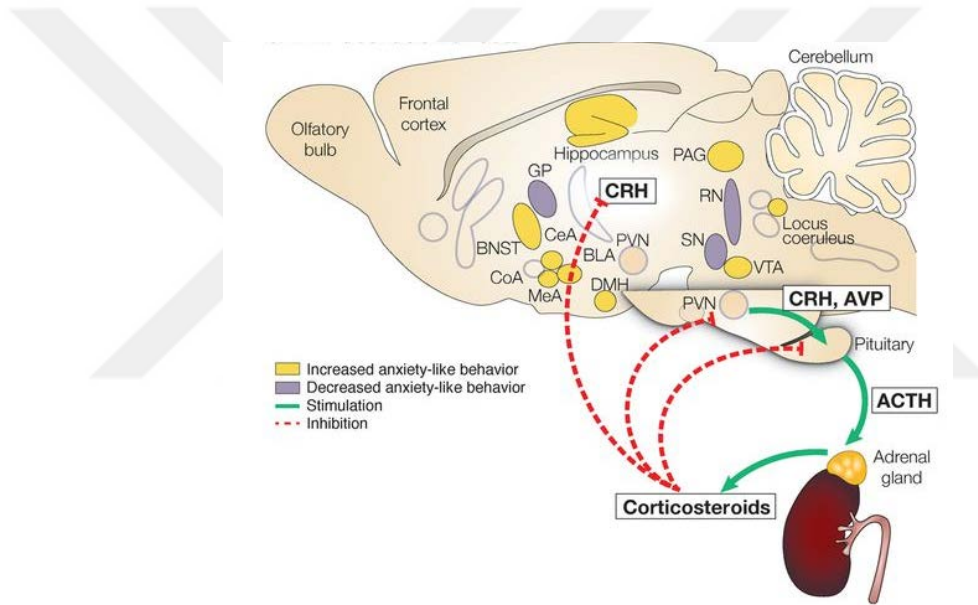
Şekil 4.1.1. Yeme davranışını kontrol eden mekanizmanın şematik gösterimi

4.2. Stres ve Anksiyete

Besin alımı sadece vücudun enerji regülasyonu ile ilgili olmayıp birçok psikolojik durum değişiklikleri ile de ilişkili süreçleri yönetmektedir (20). Beslenme regülasyonu üzerine yapılan nöral döngü çalışmaları beslenmeyi yöneten sinir hücresi bağlantılarının aynı zamanda bir takım stereotipik davranış değişiklikleri ile de ilişkili olduğunu göstermektedir (21). Yine bazı çalışmalar bu döngüleri kognitif süreçlerle de ilişki içinde çalıştığını ortaya koymaktadır (22). Lokomotor aktivite değişiklikleride beslenme ile ilişkili görülen davranışsal değişiklikler arasındadır (23). Buradan da anlaşılacağı gibi besin alımı ile ilgili süreçlerde sadece açlık ve tokluğa bağlı metabolik ve yeme davranışı ile ilgili değişiklikler değil bir çok davranışsal sonuçları tetikleyen süreçler işlemektedir. Beslenme ile ilişkili bu davranışsal değişikliklerden biri de stres ve anksiyetik etkilerdir. Açlığın anksiyeteyi tetiklediği uzun zamandır gözlemlenen bir bulgudur (24). Bununla birlikte hayatta kalım için bu kadar önemli bir faktör olan besin alımının düzenlenmesinin bir takım teşvik edici psikolojik süreçlerle desteklenmiş olması da manidardır (25). Yapılan birçok çalışma beslenmenin anksiyete ile ilişkisini ortaya koymaktadır (26). Stres vücudumuzda belli başlı nöroendokrin sistemler tarafından yönetilen fizyolojik bir süreçtir. Stresin vücudumuzdaki yönetim sistemi özellikle hipotalamus-hipofiz ve adrenal medulla üzerinden işleyen bir nöroendokrin yolakla yönetilmektedir. Hipotalamusta salgılanan salgılatıcı hormonlar temel olarak hipofiz bezinde uyarıcı hormonların kana geçişini sağlayarak periferdeki hedef endokrin bezlerin yönetimi sağlamaktadır. Paraventricüler çekirdeğin uyarısı ile salgılanan bir hipotalamik hormon olan kortikotropin serbestleştirici hormon (CRH) hipofiz bezinden adrenokortikotropik hormon (ACTH) salınımını sağlayarak adrenal bezin medullasında yerleşmiş bulunan bezlerin uyarılması ile kortizol salınımını desteklemektedir (27).

Stres hormonu olarak da bilinen kortizol vücudun zorlu stres koşulları ile mücadele edebilmesi için bir takım düzenlemeler yapar. Kortizolun kısa süreli salınımı vücuttaki kısa süreli homeostatik bozuklukların giderilmesinde etkili iken kronik salınımı strese bağlı ortaya çıkan bir çok hastalığın mekanizmasını oluşturur.

Böbrek üstü bezinden salgılanan kortizol etkisini vücudun çeşitli bölgelerinde dağılmış olan glukokortikoid reseptörleri (GR) vasıtasıyla gösterir. GR'ler periferik ve merkezi organlarda yaygın bir şekilde yerleşmiştir. Böylece kortizolün karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasından, immun fonksiyonuna, davranışsal etkilerinden kardiyovasküler etkilerine kadar birçok sistemi kapsayan etkileri GR'lerin yaygın yerleşimi sayesinde mümkün olmaktadır (28). Glukokortikoid reseptörlerin yoğun bulunduğu bölgelerden birisi de NTS dir. Yapılan çalışmalar NTS'de glukoid reseptör taşıyan hücrelerin adrenerjik hücrelerle korelasyon gösterdiğini ortaya koymaktadır (29). NTS'in stres ile ilişkisi bilinmekle beraber kortizol reseptörü taşıyan bu katekolaminerjik nöronların etkisi bilinmemektedir.



Şekil 4.2.1. Hipotalamusda bulunan paraventricüler çekirdeğin uyarımı ile stres üzerinde oluşan etkinin şematik gösterimi (30)

Katekolaminler ise adrenal medulla ve beyin dokusunda sempatik sinir uçlarından tiroksin hidroksilaz enzimi sayesinde salgılanır. Katekolamin ailesi üç çeşit olup bunlar; dopamin, nöradrenalin (Nörepinefrin) ve adrenalalin (Epinefrin)'dir. Katekolaminlerin salgılanma miktarı ait olduğu reseptör ailelerine bağlanarak, hipoglisemi, miyokard infaktı ve egzersiz gibi stres altında olduğu durumlarda artış gösterir. Nöroepinefrin sempatik nöronlardan salgılanan önemli bir hormondur. Bu hormon tirozin adlı aminoasittin önce DOPA, dekarboksilaz enzimi ile dopamine ve

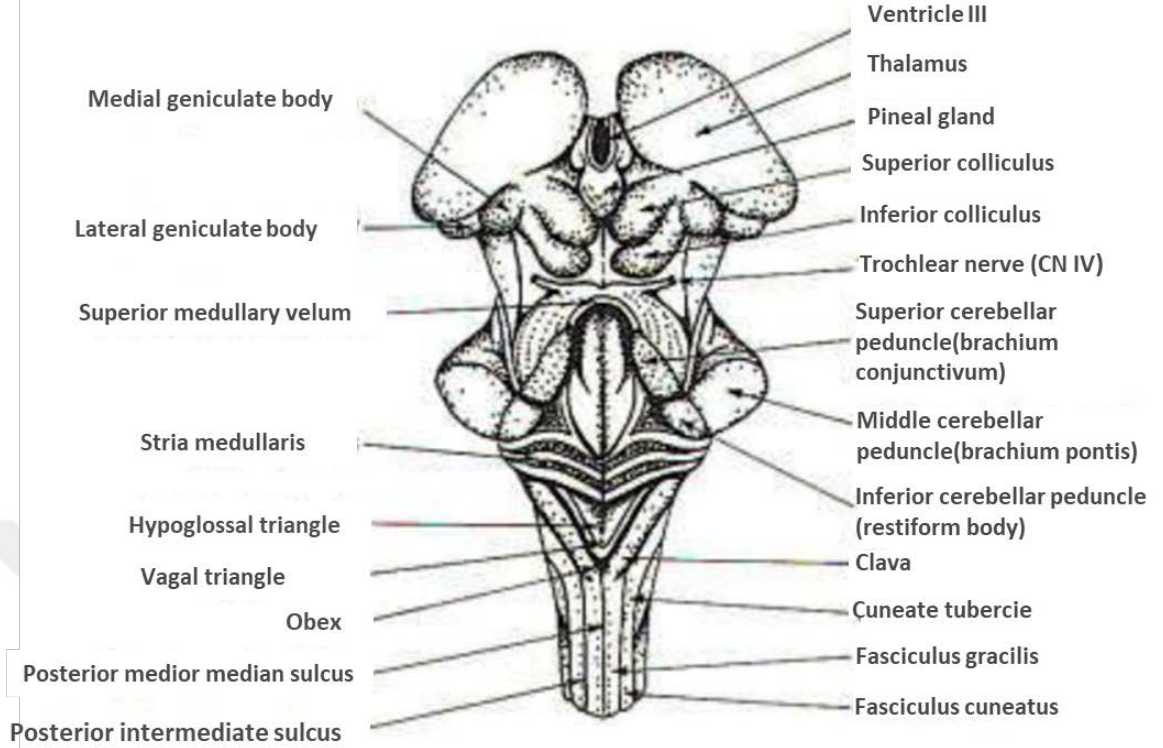
daha sonra dopamin β -hidroksilaz enzimiyle nörepinefrine katalizlenmesi ile elde edilir (31).

Bu çalışmanın odak noktası beyin sapı çekirdeklerinden biri olan NTS'in hipotalamusa projeksiyon yaptığı bilinen katekolaminerjik nöronların besin alımı, stres ve anksiyete ile ilişkili fonksiyonlardaki etkisini göstermektir.

4.3. Beyin Sapının Fonksiyonel Anatomisi

Beyin sapı, içerisinde kraniyal sinirlerin çekirdeklerini barındıran önemli bir merkezi sinir sistemi bölgesidir. Mesencephalon, pons ve medulla oblongata olmak üzere üç bölümden oluşur. Truncus cerebri veya beyin rakı olarak da adlandırılır. Embriyonel gelişim sırasında hemisferlerin fazla büyümeleri sayesinde gizlenmiş şekilde yer almaktadır. Diencephalona rostral, medulla spinalisenin ise kaudal olarak uzantısı vardır. Üst ve alt sinir sistemini merkezlerini birbirine bağlar. Bu sayede koku haricinde periferden gelen bütün duyuların ve perifere giden bütün talimatların geçiş noktasındadır. (32).

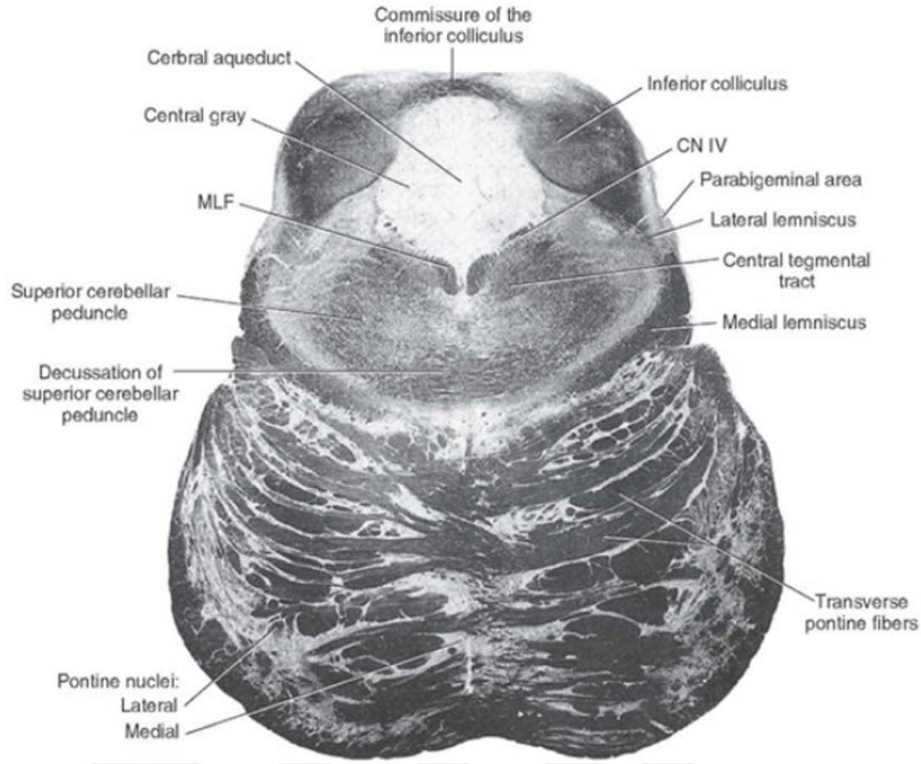
Dört haftasını tamamlamış bir embriyoda iki temel yapı halinde bulunur. Bunlar; Metencephalon (pons, cerebellum) ve Myelencephalon (medulla oblongata)'dir. Arka beyin yapı olarak omuriliğin beynin içerisine girmiş hali gibidir. Genel olarak çoğu cranial sinirlerin beyin sapıyla bağlantısı vardır ve bu sinirlere ait çekirdekler de bu kısımda bulunmaktadır (33).



Şekil 4.3.1. Beyin sapının ön yüzden görünümü (34)

4.3.1. Orta beyin (Mesencephalon)

Mesencephalon arkada cerebellum, aşağıda pons ve yukarısında diencephalonu bulunduran yaklaşık 2 cm uzunluğunda olan bir bölgedir. Mesencephalon enine iki yarıdan oluşur. Üçüncü ventrikülün devamı olan aquaeductus cerebrinin iki yanında uzanan mesencephalon tabakalı bir yapıya sahiptir. Ön tabakada üst ve alt merkezleri bağlayan görme ile ilişkili yollarla da bağlantı içinde çalışan crus cerebri ile arka kısımda büyük oranda retiküler formasyon işlevlerinden sorumlu tegmentum denilen tabakalar bulunur. Aquaeductus cerebrinin arkasında ise tectum adı verilen bölgede ikisi işitme ikisi de görme ile ilgili integrasyondan sorumlu kavşak noktaları teşkil eden dört adet colliculus yer alır (35).

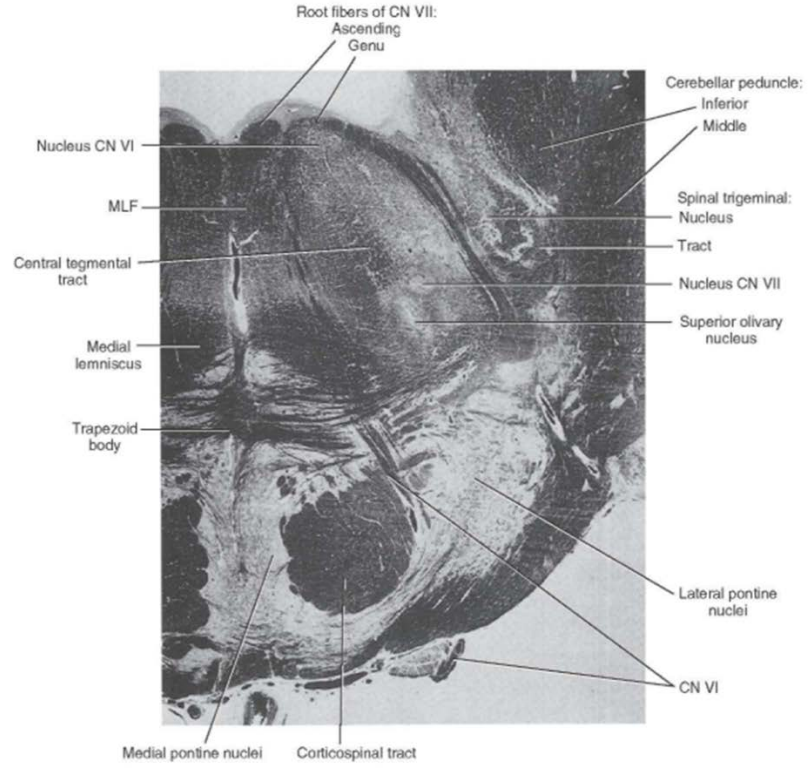


Resim 4.3.1.1. Orta beyinin enine kesiti (36)

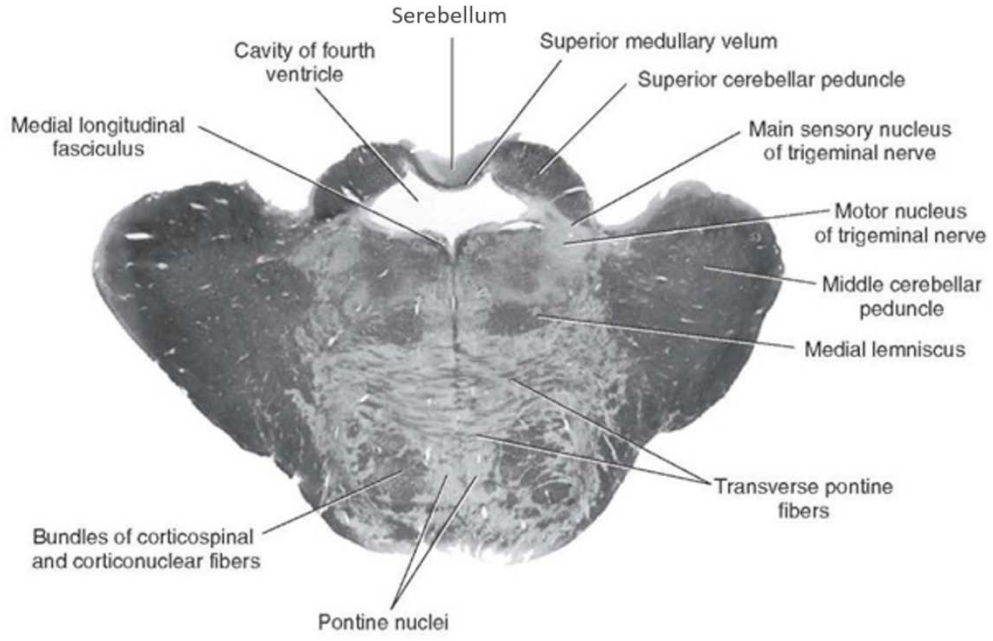
4.3.2. Pons

Üst kısmında mesencephalondan başlayıp alt kısmında medulla oblongataya uzanan 2,5 cm boyunda beyin sapı kısmıdır. Bu beyin bölümü cerebellum ile beyin sapı arasındaki bağlantıda köprü görevi gördüğü için Latince de köprü anlamına gelen pons ismi verilmiştir. Yani beyine gelen ve çıkan sinyalleri hem alır hem de dağıtır (37). Ön yüzünün orta kısmında sulcus basilaris yer alır ve cerebellumla ponsu birbirine bağlayan pedunculus cerebellaris medius ile devam eder. Bu bağlantılar beyin ile beyincik arasındaki etkileşimde ponsu bir kavşak haline getirir. Ponsun arka yüzünde ise medulla oblongata ile kesintisiz şekilde uzanır, yan ve ön yüzünde medulla oblongata sulcus bulbopontinusla ayrılmıştır (37,38).

Pons, uyku/uyanıklık döngüsünü, idrar kesesinin kontrolünü, yüz ifadelerini ve yüzdeki hisleri kontrol etmede, yutkunmanın kontrolünde ve denge kontrolünde bu kontrolü sağlayan çekirdekler bulundurur (34,39).



Resim 4.3.2.1. Ponsun alt bölümünden bir enine kesit (40)



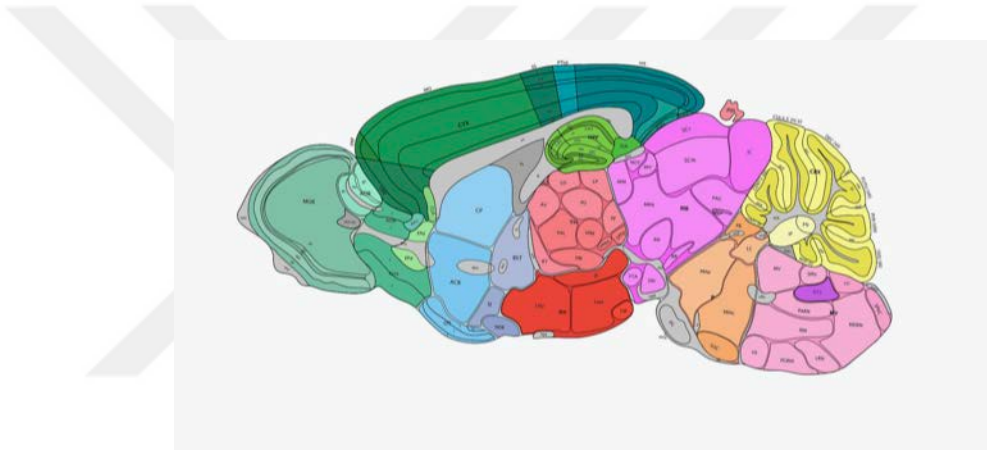
Resim 4.3.2.2. Ponsun üst bölümünden bir enine kesit (40)

4.3.3. Myelencephalon (Medulla oblongata)

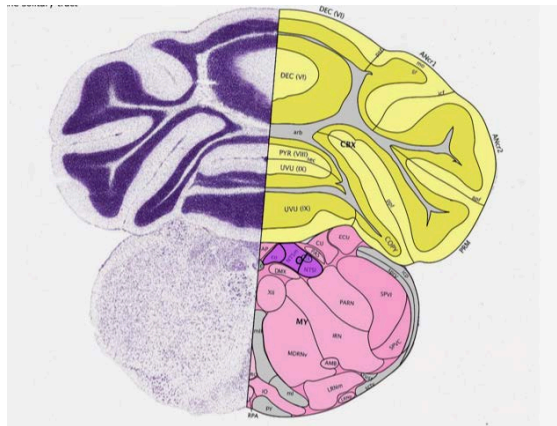
Beyin sapının kuyruk kısmında yer alan medulla oblongatanın alt kısmında medulla spinalis, üst kısmında ise pons yer alır. Omurilik ve beyin arasındaki afferent ve efferent uyarıları iletir. Aynı zamanda beyin sapı içerisinde birbirine bağlı nöron kümeleri ağı denilen retiküler formunun oluşmasına sebep olur. Bu kümeler sayesinde nöronların aksonları beyin sapının altında ve üstünde yer alan uzak mesafeler arasında iletişim sağlamaktadır. Medulla oblongata kalp ritmi, damar genişlemesi, solunum sayısı gibi otonom fonksiyonların ve yutma, kusma, tükürük salınımı gibi beslenmeyle ilişkili otonom reflekslerin yönetildiği çekirdekleri de bulundurmaktadır. Medulla oblongatada bu fonksiyonları icra eden bir çok çekirdek vardır. Medulla oblongata barındırdığı beslenme reflekslerinde görev alan sinir ağları nedeniyle besin alımının yönetimi ile ilgili merkezlerle sıkı bağlantılar içindedir. Besin alımını yöneten merkezlerle bağlantı içinde olan bu çekirdeklerden birisi de Nucleus Tractus Soliteriustur. (34).

4.3.3.1. Nükleus Traktus Solitarius

Nervus glossopharyngeus, nervus facialis ve nervus vagusun viseral afferent ve efferent iletilerini taşıyan aksonları ponstan omuriliğe kadar uzanan tractus solitarius' u oluşturur (34). Nükleus traktus solitarius bölgesinde ise bu traktusa ait nöronların gövdeleri bulunur. NTS nöronları, glutamat ve gama aminobütirik asit (GABA) ve nöromodülatörler, norepinefrin, ve CCK (Kolesistokinin) gibi birçok ileticiyi serbest bırakır. Noradrenerjik norepinefrin salınımını gerçekleştiren NTS nöronları, tirozin hidroksilaz ve dopamin b-hidroksilaz (DBH) enzimleriyle özgün olarak işaretlenebilmektedir (19,41).



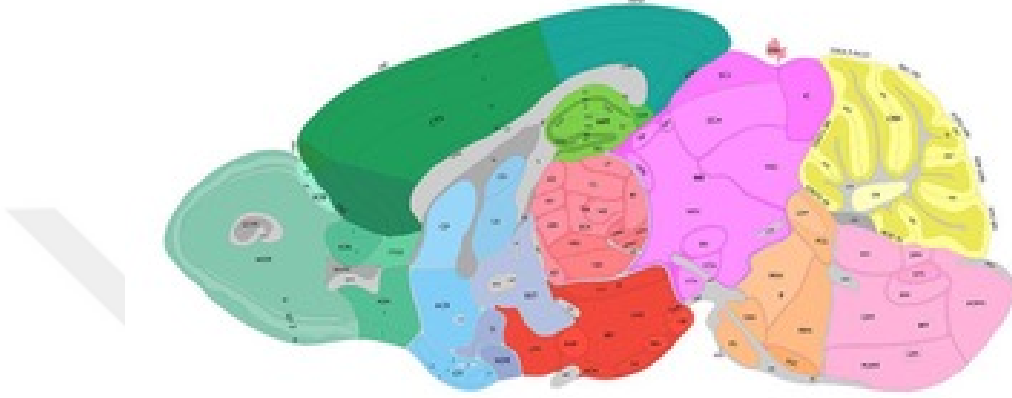
Şekil 4.3.3.1.1. Fare beyinde Nükleus Traktus Solitarius bölgesinin sagittal gösterimi (NTS bölgesi koyu mor rengi ile gösterilmiştir.)(42)



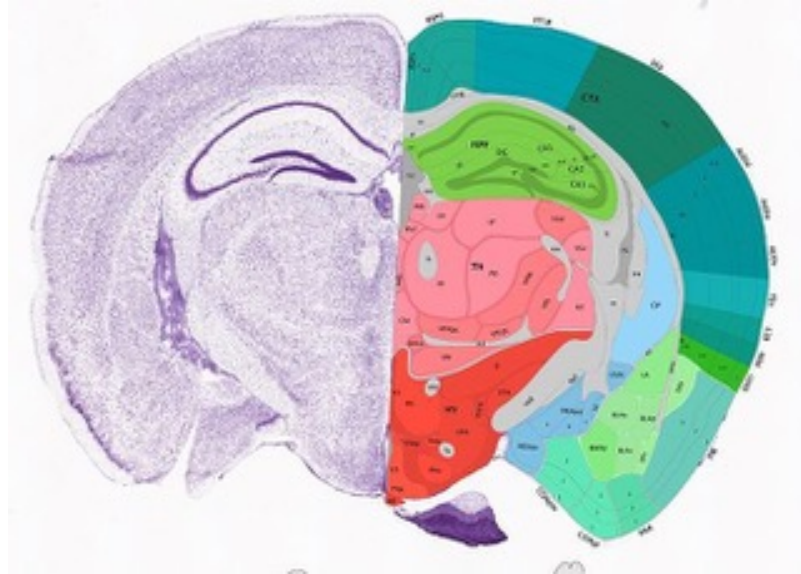
Şekil 4.3.3.1.2. Fare beyinde Nükleus Traktus Solitarius bölgesinin koronal gösterimi(NTS bölgesi koyu mor ile gösterilmiştir.)(42)

4.4. Hipotalamus

Diensefalonun kısımlarından biri olan hipotalamus, sulcus hypothalamicus'un altındaki kısmı ile birlikte üçüncü ventrikülün tabanında yer alır. Anatomik olarak anteriorde, aşağıdan yukarı doğru optik kiyazma, süperiorda talamus, lateralde temporal lob ve posteriorde ise mamiller cisimleri ile sınırlandırılmıştır (34).



Şekil 4.4.1. Fare beyninde hipotalamus bölgesinin sagittal gösterimi (Hipotalamus bölgesi kırmızı rengi ile gösterilmiştir)(42)



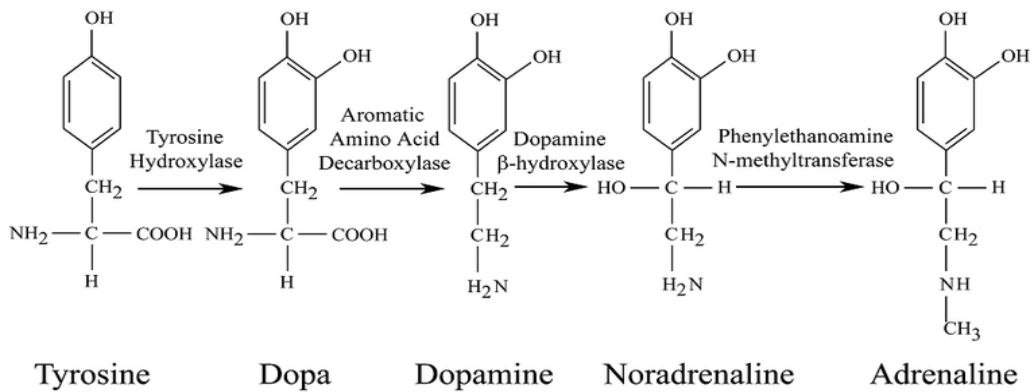
Şekil 4.4.2. Fare beyninde hipotalamus bölgesinin koronal gösterimi (Hipotalamus bölgesi kırmızı rengi ile gösterilmiştir)(42)

Hipotalamus, çeşitli sinir lifi ve çekirdekten oluşan önemli bir beyin alanıdır. Nöronal bağlantıları sayesinde sirkadyen ritim, vücut sıcaklığını kontrol altında tutma, yemek yeme ve su içme gibi günlük aktivitelerde, üreme fonksiyonlarında ve uyku-uyanıklık gibi önemli işlevlerin kontrol edildiği bölgedir. Ayrıca endokrin sistemde vücudun farklı yerlerinde yerleşmiş bezlerin hormon sentezinde görev alan yönetici hormonlarında kontrolü hipotalamusta gerçekleştirilmektedir (12).

4.5. Katekolaminler

Dopamin, nöradrenalin (Nörepinefrin) ve adrenalin (Epinefrin) her üçü de bir amin grubu ve katekol halkası bulundurmalarından dolayı bunlar katekolaminler olarak isimlendirilmiştir. Katekolaminler kan-beyin bariyerini aşamaz ve beyinde lokal olarak sentezlenirler (43). Vücutta nörotransmittör ve hormon olarak işlev gösteren katekolaminler tirozin aminoasitinden türetilir.

Ayrıca sinir sisteminde görev alan önemli bir nörotransmitter olarak da bilinir. Katekolaminlerin biyosentezdeki hızı, bu sentezde yer alan enzim aktivitesindeki artışın bir sonucudur. Bu enzimlerden de en çok aktive edilip ifadenmesi gerçekleşen enzim tirozin hidroksilazdır. İlk adımda akson terminallerinin tirozini almasıyla, bu sentez yolundaki tiroksin hidroksilaz enzimi tarafından tirozini katalizlenerek dihidroksi-fenilalanine (DOPA)'a çevrilir. Daha sonra terminallerde bulunan enzimlere göre dopamin, nöradrenalin ve adrenalinden biri salgılanır (44).



Şekil 4.5.1. Katekolamin Biyosentez Yolu

4.5.1. Dopamin

Merkezi sinir sisteminde katekolaminler sınıfında yer alan dopamin, substantiya nigradan dorsal striatuma kadar dopaminerjik yolları bulundurur. Bu yollar substantiya nigra (SN), ventral tegmental alan (VTA) ve medial hipotalamusun arkuat çekirdeğindedir. Dopamin motor ve duysal koordinasyonda, hareketlerin başlatılmasında ve ödül algısı ile ilişkilidir. Ayrıca kan-beyin bariyerini geçemez bu sebeple de doğrudan merkezi sinir sistemini etkileyemez. Beyinde dopamin, etkisini birçok reseptörü aktive ederek dopamin salınımı sağlayan bir nörotransmitterdir. Bu reseptörler D1 ve D2 reseptörleridir. Son zamanlarda moleküler klonlama çalışmalarıyla bu reseptörlere ek olarak D3, D4 ve D5 reseptörlerinin varlığı ortaya konulmuştur. D3 ve D4 birincil etki mekanizmaları ve yapısına göre D2-benzeri iken, D5 reseptörü ise D1- benzeri olarak adlandırılır (45).

4.5.2. Nörepinefrin (Nöradrenalin)

Nörepinefrin, adrenal medulla ve beyin dokusunda sempatik sinir uçlarından salgılanan diğer adı nöroadrenalin olarak da bilinen bir hormondur. Bu hormon tirozin adlı aminoasitin önce DOPA, dekarboksilaz enzimi ile dopamine ve daha sonra dopamin β -hidroksilaz enzimiyle nörepinefrine katalizlenmesi ile elde edilir. Nörepinefrin lifleri, locus coeruleus, neokorteks, talamus, amigdala, hipokampus, hipotalamus ve omuriliğe projeksiyon yapar. İşlevlerini ise kendilerine ait reseptörlere bağlanarak yerine getirirler. Bu reseptörler adrenerjik reseptör grubundan olup α (alfa) ve β (beta) olmak üzere iki kısımdan oluşur. Alfa reseptörü kendi içinde $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ olarak ayrılırken, beta reseptörü ise $\beta 1$, $\beta 2$ ve $\beta 3$ olarak üçe ayrılır. Katekolaminler nöromodülatör görevlerini G-proteini aracılığıyla ikinci haberci sistemini kullandığı cAMP, fosfoditilinozitol metabolitlerine ve iyon kanallarına bağlanarak yerine getirir (7).

Paraventriküler hipotalamusta (PVH), bu reseptörlerden iki tanesinin bulunduğu bilinmektedir. Bu reseptörler $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ reseptörleridir. PVH'de $\alpha 1$ -adrenoseptörlerin aktivasyonu yemeyi baskımlarken, $\alpha 2$ -adrenoseptörler yemeyi artırır (46).

Homeostazis (vücutun iç dengesi), belirgin miktardaki hormonların gün boyunca belirli düzeyde kalmasını sağlar. Stresin ise bu dengeyi bozucu bir yönde etkisinin olduğu bilinmekte ve stres anında nöroepinefrin salınımının sinyal yollarında önemli bir etkisinin olduğu bilinmektedir (47). Nöroepinefrin vücutun birçok fonksiyonunu kontrol eder ve sempatik sinir sisteminin çoğu nöronunda bulunur. Bu bölgeler başlıca amigdala, hipokampus, hipotalamus ve ponsdur (48).

4.5.3. Epinefrin (Adrenalin)

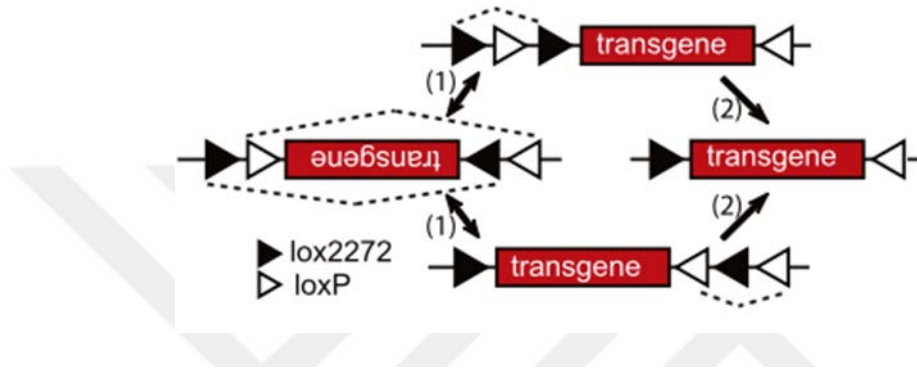
Epinefrin, adrenal medulladan nöroepinefrinin feniletanolamin-N-metiltransferaz enzimiyle katalizlenmesi sonucu salgılanır. Etkilerini kendilerine ait reseptörler olan adrenerjik grup reseptörlerine bağlanarak yerine getirirler. Bu reseptörler yukarıda da değinildiği gibi α ve β reseptör aileleridir. Stres durumlarında kanda hızla artan bu nedenle de stres hormonu olarak da bilinen adrenalin, adrenalenden salgılandıktan sonra iskelet kası ve karaciğere giderek süratle metabolize olur (49).

4.6. Hücre Tipi Spesifik Transgen İfadesi ve Transgenik Fare Modeli

Nöron aktivitesi ve davranış arasındaki nedensel ilişki, beyindeki hücre tiplerinin fonksiyonunu anlamak için önemlidir. Bu spesifik hücre tiplerinin fonksiyonunun belirlenmesinde ise moleküler aracılı hücre tipine ait manipülasyon gerekir. Örneğin, sadece TH nöron grubuna ait olan nöronu işaretlenip geride kalan nöron gruplarını saf dışı bırakacak metotlara ihtiyaç vardır. Böylelikle nöro-teknolojide moleküler tanımlı hücre tiplerinin haritalandırılmasında, manipülasyonunda ve izlenmesinde kayıt altına alınabilecek bilgilere ışık tutar. Aksi durumunda ise aynı anda birçok nöron grubu işaretlenecek ve beyindeki istediğimiz spesifik hücre tipi için verimli sonuç alınamayacaktır. Bunun için ise hücre tipine özgü transgen ifadesi kullanılarak nöronal alt popülasyonlar belirlenir (50).

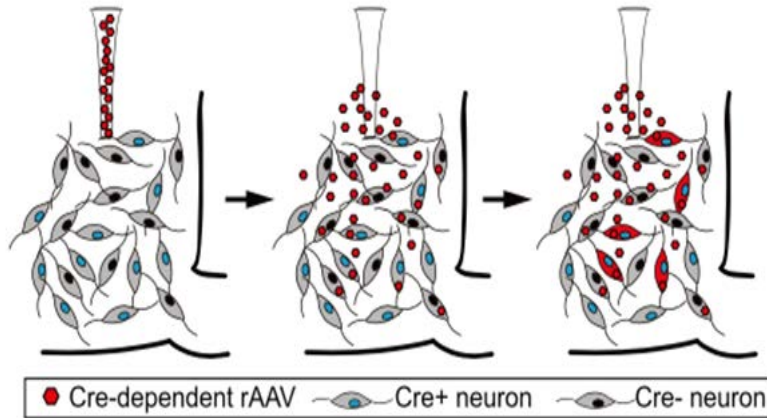
Bölgeye özgü rekombinasyonu sağlamak için cre (causes of recombination) rekombinaz enzimi kullanılır. Cre rekombinaz, P1 bakteriyofajında Lox olarak

adlandırılan 34 baz çiftlik bir gen dizisi olan LoxP (locus of crossing) tanıma bölgesini tanır. LoxP ve Lox2272 heterotipik rekombinasyon bölgeleridir. Cre yokluğunda bu rekombinasyon bölgelerindeki transgen kodlama bölgesi ters bir şekilde durur ve transgen ekspresyona kapalı konumdadır. Ancak cre rekombinaz enzimi aynı DNA dizisi üzerinde ve zıt yönlerdeki LoxP bölgelerini tanır ve DNA'yı düz çevrilir ise transgen ekspresyona açık konuma gelir (Şekil 4.5.1) (50).



Şekil 4.6.1. Cre-LoxP Sistemi (50)

Moleküler tanımlı hücre tiplerini, sinir devrelerini tanımak ve manipüle etmek için cre enzimini ifade eden hücre tipine özgü transgen ifadesi kullanılıp buna özgü transgenik fareler üretilmektedir. Bu nedenle farelere intrakraniyal olarak verilen adeno-asosiyasyon virüsü (rAAV)'de bulunan Lox dizisi sadece cre enzimine sahip olan hücreleri işaretleyip, geride kalan hücrelerde işaretleme yapmayacaktır (Şekil 4.5.2) (49).



Şekil 4.6.2. Hücre Tipine Özgü Transgen İfadesi (50)

Bu çalışmada ise cre enzimini bulunduran Tg(Th-cre)1Tmd/J transgenik fareler, TH nöronlarının fonksiyonunun belirlenmesi için kullanılmıştır. Ayrıca LoxP dizileri de adeno-asosiy virüs ile transgenik farelere verilmiştir.

4.7. Optogenetik Manipülasyon

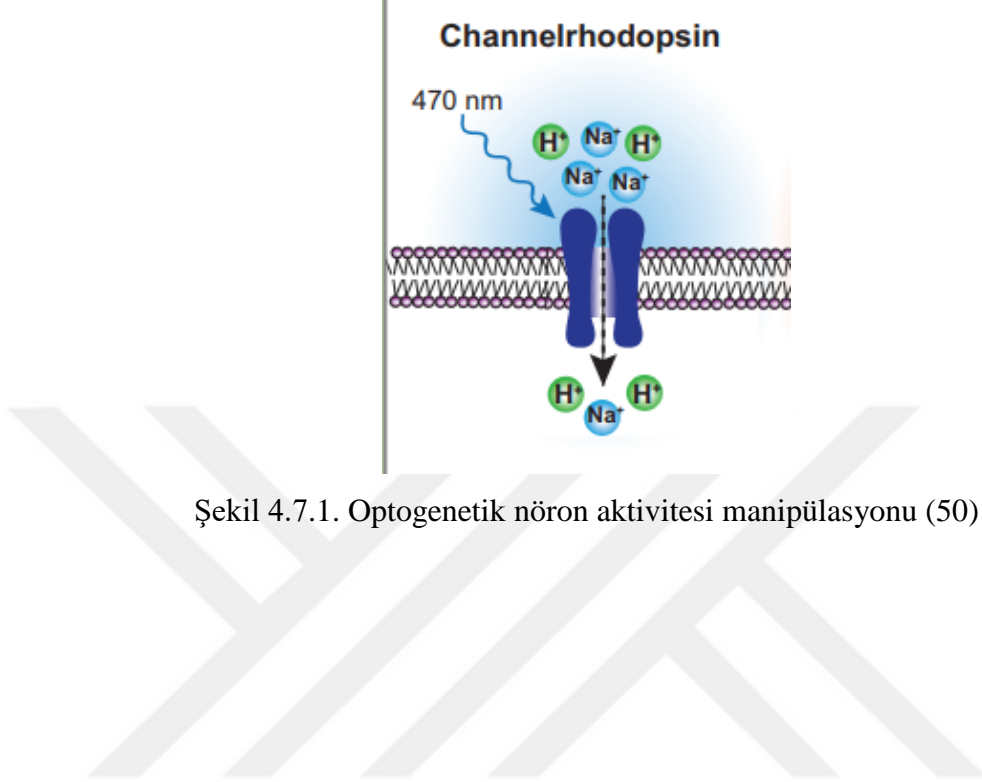
Genetik yaklaşımlar, moleküler tanımlı nöronal hücre tiplerinin davranışla ilişkisini karakterize etme yönünde ilerleme sağlamıştır. Ancak moleküler olarak tanımlı bu hücre tipleri arasındaki bağlantıların işlevsel özellikleri hakkında çok az bilgi bilinmektedir. Bu sınırlama birden fazla hücre tipi ve beraberindeki projeksiyonlarının birbirine karışması, seçici aktivasyon konusunda belirli yöntemlerin olmamasından kaynaklanmaktadır.

Moleküler tanımlı nöron stimülasyonu mikrobiyal opsinlerin katılımıyla gerçekleşmektedir. Opsinler ışığa duyarlı bir iyon kanalı olup milisaniye gibi kısa bir sürede nöron aktivitesi üzerinde kontrol sağlayan iyon pompalarıdır (51).

Son zamanlarda kullanılan channelrhodopsin-2 (ChR2) hem nöronları hem de aksonlarını aktive etmek için alternatif bir yaklaşımdır. Bu teknikte fotostimülasyon kullanılarak moleküler tanımlı hücre popülasyonlarının bağlantıları haritalandırılır. (51,52). ChR2 ışığa duyarlı bir katyon kanalıdır. Bu kanal tek değerli ve iki değerli katyonlar için büyük bir geçirgenlik oluşturmak üzere bir foton emilimi sonrasında hızlı bir şekilde açılarak hücreyi polarize edip ve hücreyi aktive eder. Bu aktivasyon kısa mavi ışık darbeleriyle (1-10 ms) optik uyarılma yapılır. Işık aktivasyonu kapatıldığında ise bu sefer tam tersi bir durum gerçekleşip katyon akışı hücrenin dışına doğru olur ve hücre depolarize olup eski haline geri döner (53).

Hipotalamik devrelerde yiyecek arayışı ve tüketiminin güdüsel ve ödüllendirici yönlerinde sorumlu olan hücre tipleri optogenetik aktivasyonun zamansal hassasiyetinden yararlanılarak araştırılmıştır (54).

Bu çalışmada TH nöronlarının beslenme ve stres üzerindeki rolünü belirlemek için ChR2 iyon kanalı kullanılarak nöron aktivasyonu gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.7.1. Optogenetik nöron aktivitesi manipülasyonu (50)

5. Materyal ve Metot

5.1. Materyal

Tablo 5.1.1. Deneyleerde Kullanılan Malzemeler

Biyolojik Materyaller ve Kimyasallar	Ürün kodu	Marka
anti-TH primer antikoru	ab112	Abcam
anti-cFos primer antikoru	2250S	Cell Signaling
Keçi anti-Tavşan Immunoglobulin G Alexa-Fluor 488 ikincil antikoru	A11008	Life Technologies
PCR için kullanılan primerler		Sentegen
Keçi Serumu	G9023	Sigma-Aldrich
OneShot Stbl-3 Kompetant <i>E.coli</i> hücre hattı	C737303	Life Technologies
LB Agar	A8523-500G	Biomatik
Glasiyal Asetik Asit	537020	Sigma-Aldrich
293AAV hücre hattı	AAV-100	Cell BioLabs
LB Broth	A8523-500G	Biomatik
Etanol	46139	Sigma-Aldrich
AAV plazmitleri		Addgene
Sodyum Pirüvat ($C_3H_3NaO_3$)	P5280	Sigma-Aldrich
Agaroz	A9539	Sigma-Aldrich
Paraformaldehit	15127	Sigma-Aldrich
Glutamax-I	35050-061	Gibco
Sodyum Klorür (NaCl)	S7653	Sigma-Aldrich
Potasyum Klorür (KCl)	P9541	Sigma-Aldrich
DMEM High Glucose	WS319005CL	Multicell
Benzonase	E8263	Sigma-Aldrich
Fosfat Tamponlu Tuz (PBS)	311-010-CL	Multicell
Fenol Kırmızısı	600-070-IG	Capricorn
OptiPrep™ Density Gradient Medium	D1556	Sigma-Aldrich
Tripsin (0,25%) in DPBS	CPTRY2B	Capricorn
Polyethylenimine Branched	SG408727	Sigma-Aldrich
EndoFree Plasmid maxi kit	12362	Qiagen
D-Sorbitol High Purity	BMA2450	Sigma-Aldrich
SafeView	G108	Alfagen
Gel Loading Dye Purple (6X)	B7024 S	NEB
Taq PCR Kit	E5000 S	NEB

Fluoromount Mounting Medium	F4680	Sigma-Aldrich
LMA Agaroz	8060	Reducta
Triton X-100	X100	Sigma-Aldrich
Trizma® HCl	T3253	Sigma-Aldrich

Tablo 5.1.2. Deneylerde Kullanılan Gereçler

Kullanılan Gereçler	Ürün Kodu	Marka
OptiSeal Santrifüj Şişeleri	7600302	Thermo Scientific
Mikromotor		Istanbul Dis
Peristaltik Pompa	21-176-2A	Deposu Fisher
Çalkalayıcı	BR2000	Scientific
		Benchmark
0,2 mL PCR tüp	123.01.002	Scientific
Ear Tag	52-4717	Isolab
MicroPunch	340140	Harvard Apparatus
Drummond Wiretrol™ II Kalibre Mikropipet		Harvard Apparatus
Peristaltik Pompa	21-176-2A	Minstar
		Fisher Scientific
0,2 mL PCR tüp	123.01.002	Isolab
dH2O Cihazı	ZRQSV8W	Millipore
Çalkalayıcı	Benchmark Scientific	BR2000
dH ₂ O Cihazı	ZRQSV8W	Millipore
Manyetik Karıştırıcı	H400HSB	Benchmark
		Scientific
pH metre	pH7110	Isolab
Santrifüj	Biocen 22R	Orto Alsera
Multi-Therm Çalkalayıcı	H5000-HC	Benchmark
		Scientific
Vorteks	BV1000	Benchmark
		Scientific
PowerPac™ Universal Power Supply	1645070	BioRAD
Amicon Ultra-15 Centrifugal Filtre	UFC910024	Millipore
Portatif Anestezi Cihazı		Beyza Medikal

Eppendorf® LoBind Microcentrifuge Tube	Z666505	Sigma-Aldrich
One-axis Oil Hydraulic Micromanipulator	MO-10	Narishige
ChemiDoc™ MP System		BioRAD
Konfokal Mikroskop	LSM-780	Zeiss
Konfokal Mikroskop	Lsm-800	Zeiss
Tartı	EX124-US	Ohaus Explorer
Mikropipet Çekici	P-1000	Advance Instruments
Spectrometre cihaz		BioRAD
SliceScope Pro3000	Pro300	Scientifica
Vibratom	VT1000S	Leica
Monokrom Kamera	WAT-902H	Watec Cameras
Programmable Perfusion System		Scientifica
Ultrasonikatör		Bandelin Sonarex
Hava Kompresörü	DN200/8/6	Stanley
Digital Storage Osiloskop	TDS2001C	Tektronix
Stereo Mikroskop	Discovery V8	Zeiss

5.2. Metot

PCR yöntemi ile genotipleri belirlenen Th-cre transgenik farelere intrakraniyal olarak farklı rekombinant adeno-asosiyale virüsleri verildi ve ifadenmesi için zaman tanındı. NTS bölgesinden PVH bölgesine giden sinaptik bağlantıyı görebilmek için NTS bölgesine FLEX-tdTomato virüsü verildi. TH-cre antikoruyla boyama yapıldı ve NTS bölgesinden PVH bölgesine giden akson uzantıları haritalandırıldı. Böylece hipotalamusa gelen ana katekolaminerjik girdi kaynağı belirlendi. NTS ve PVH' nin açlık ve tokluğa duyarlı bir bölge olabileceği düşünöldü. Bunun için NTS' e FLEX-Chr2 virüsü verildi ve PVH' ine fiber yerleştirildi. Gıda tüketimindeki artış ile Chr2 virüsünün aktif ettiği TH nöron sayısı oranına bakıldı. Benzer şekilde fareler akşam aktif oldukları için bir de akşam deneyinde farelerin foto uyarım sonucunda besin tüketimi miktarına bakıldı. Çalışmanın diğer kolunda ise NTS bölgesinin PVH' a yaptığı sinaptik bağlantının anksiyete üzerindeki etkisinin incelenmesi için açık alan testi, yükseltilmiş artı alan ve aktif alan tercihi test deneyleri yapılarak analiz edildi.

5.2.1. Deney hayvanları

Jackson Laboratuvarı'ndan bu çalışma için B6.Cg-7630403G23RikTg(Th-cre)1Tmd/J transgenik fareleri getirilmiştir. Th-cre diye kısa adıyla da bilinen bu fare ırkı, Th-cre erkek yabanıl ırk fare, dişi Th-cre fareler veya C57BL/6 yabanıl tip fareler ile çaprazlanarak üretimi yapıldı. Üretimi yapılan yavrular 21 ile 28 güne ulaştığında yavruların kulaklarından anestezi altında doku örneği alınarak genotiplendi. Genotipleme sonucuna göre ise dişi ve erkek Th-cre transgenik fareleri ayrıldı. Bu farelerin bakımı ve üretimi İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırma Merkezi tarafından (MEDİTAM) gerçekleştirilmiş olup, deney prosedürleri İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İMÜ-HADYEK) tarafından onaylanmıştır.

5.2.2. Genotipleme

Üretimi yapılan yavru fareler 3-4 haftalık erişkinliğe ulaştığında genotiplendi. Genotipleme sonucuna göre deney aşamaları için transgenik erkek ve dişi fareler 6-12 haftalığa geldiklerinde davranışsal çalışmalar için kullanıldı.

5.2.3.1. DNA eldesi

3-4 haftalık erişkinliğe ulaşan fareler kısa bir süreliğine anestezi altına alındı. Yavru farelerin anestezi altında olup olmadığını anlamak için el ve ayaklarına hafifçe bastırıldı. Fareler hiçbir şekilde tepki vermediyse anestezi altında olduğu bilgisine ulaşıldı. Anestezi altındaki farelerin bir kulağına hayvanı isimlendirebilmek için kulak küpesi takıldı. Yavru farelerin diğer kulağından ise kulak delici bir pens ile doku örneği alındı. Alınan doku örnekleri 0,2 mL'lik içerisinde 75 µL 25mM NaOH/EDTA olan PCR tüplerine konuldu. T100™ Thermal Cycler PCR cihazında tüpler 98°C'de 1 saat boyunca ısıtıldı. Ardından PCR tüplerine 75 µL 40 mM Tris/HCl eklendi. 4000 RPM'de 3 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonucunda tüpün süpernatant kısmında bulunan DNA yeni tüplere aktarıldı.

5.2.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Yeni bir tüpe aktarılan DNA aşağıdaki tabloda belirtilen malzemelerle karıştırılıp PCR programı için uygun hale getirildi. DNA örnekleri için kontrol ve transgenik fare grupları için ayrı PCR karışımı hazırlandı. Son olarak negatif kontrol için bir tüp içerisinde DNA eklenmeden bırakıldı ve tüplerin son hacmi ddH₂O ile 12 µL' ye tamamlandı.

Tablo 5.2.2.2.1. Transgenik PCR karışımı

Gereç	Son Konsantrasyon
10X Reaksiyon tampon çözeltisi	1X
Transgenik geri primer	0,5 μ M
Transgenik ileri primer	0,5 μ M
Taq Polimeraz	1,25 unit/50 μ l PCR
dNTP Solüsyon Karışımı	200 μ M
ddH ₂ O	
DNA	

Tablo 5.2.2.2.2. Kontrol PCR karışımı

Gereç	Son Konsantrasyon
10X Reaksiyon tampon çözeltisi	1X
Kontrol geri primer	0,5 μ M
Kontrol ileri primer	0,5 μ M
Taq Polimeraz	1,25 unit/50 μ l PCR
dNTP Solüsyon Karışımı	200 μ M
ddH ₂ O	
DNA	

Sentegen firmasından TH-cre yavru fareleri için primerler satın alındı ve Tablo 5.2.2.2.3’da olduğu gibi primerin dizaynı yapıldı.

Tablo 5.2.2.2.3. Gerekli olan primer dizileri

Primer	Dizi 5' → 3'
Transgenik geri primer	ATC GAC CGG TAA TGC AGG CAA
Transgenik ileri primer	GAA AAG ATA AGG CCT TCA AGT GCT
Kontrol geri primer	GAT CTT TCT GCA GTA TCT TCC TTC
Kontrol ileri primer	GAA AAG ATA AGG CCT TCA AGT GCT

Son olarak primerleri de eklenen PCR karışımları Tablo 5.2.2.2.4'deki PCR protokolüne göre T100TM Thermal Cycler cihazına konuldu.

Tablo 5.2.2.2.4. PCR Protokolü

Döngü	Sıcaklık	Süre
1	95°C	1 dakika
	95°C	30 saniye
37	60°C	30 saniye
	68°C	1 dakika
1	72°C	5 dakika

5.2.2.3. Agaroz jel elektroforezi ve görüntülemesi

20 mM Glasiyal asetik asit, 40Mm Tris, 1 Mm pH:7,6 EDTA, 100 µL'lik 1X TAE tampon çözeltisine eklendi. Çözeltinin rengi şeffaf olana kadar 200°C'de kaynatıldı. Şeffaflaşan bu çözeltiye 5µL Safeview eklendi. Çözelti biraz soğuyup jel kıvamına geldikten sonra elektroforez kasedinin içerisine döküldü ve yükleme tarakları konuldu. 1X'lik TAE tampon çözeltisi soğuduktan sonra yükleme tarakları çıkartıldı. Kuyucuklardan ilkine 5µL belirteç yüklendi. Diğer kuyucuklara ise 1µL yükleme boyası ile karıştırılan 9µL PCR ürünü yüklendi.

Elektroforez de 100V'da 20-25 dakika boyunca yürütüldü. Yürüyen örnekler BioRAD ChemiDoc cihazında görüntülendi. Çıkan baz çiftine göre hangi farelerin transgenik hangilerinin transgenik olmadığı belirlendi.

5.2.3. Rekombinant adeno-asosiye (rAAV) virüs üretme

rAAV üretmek için gereken pAAV-EF1a-double floxed-hChR2(H134R)-EYFP-WPRE-HGHpA ve pAAV-FLEX-tdTomato plazmitlerini <http://www.addgene.org/> adresinden satın alındı. Stb13 *E. Coli* transformasyonu ile gelen plazmitler, bakteriyel sürüntü halinde getirildi.

5.2.3.1. Plazmit DNA eldesi

LB agarı ile 35 g/L oranında H₂O ile karıştırılmış çözelti otoklav cihazıyla steril hale getirildi.

Bu karışım soğuduktan sonra 100 µg/mL oranında ampisilin eklenerek antibiyotiğe karşı direnç sağlandı. 10 cm'lik petri kaplarına LB agarı petrinin 2/3'ünü dolduracak şekilde dökülüp donmaya bırakıldı. Agar katılaştıktan sonra plazmitler agara yaydırıldı ve gece boyu petriler 37°C'de bekletildi. Oluşan bakteri kolonileri öze yardımıyla toplandı. Önceden sterilize edilen 20 g/L oranında LB sıvı besisi yerine aktarımı yapıldı. 37°C de sıvı besisi yerinde ve 250 RPM koşullarında bakteriler çoğalmaya bırakıldı. 18 saat zaman diliminin sonunda bakteriler logaritmik olarak çoğaldı ve çoğalması için 18 saat beklendi. Bu süre diliminde bakteriler logaritmik olarak çoğaldı. Çoğalıp yeterli sayıya ulaşan bakteriler 6000 RPM'de ve 4°C sıcaklığında 15 dakika santrifüj edildi, süpernatant kısmı atıldı ve bakterilerin olduğu alt kısımda kalan çökeltiler -80°C'de donduruldu. Bu işlem ana vektör olan pAAV-FLEX-tdTomato, pAAV-EF1a-double floxed-hChR2(H134R)-EYFP-WPRE-HGHpA yardımcı vektör 2/1 ve yardımcı vektör helper olmak üzere 4 farklı plazmit için tekrar edildi.

5.2.3.2. DNA izolasyonu

Dondurulan bakteri çökeltileri çözdürüldü. Qiagen Endofree Plasmid Kiti (Qiagen, 12362) kullanılarak DNA izole edildi. SpektraMax cihazı ile DNA konsantrasyonları tayin edildi. Yardımcı vektör 2/1,yardımcı vektör helper ve ana vektör için bu işlemler tekrar yapıldı.

5.2.3.3. 293AAV Hücre transfeksiyonu

Cell BioLabs firmasından Rekombinant adeno-asosiyé virüs üretimi için 293AAV hücre hattı (Cell BioLabs, AAV-100) sipariş edildi.10X10 cm'lik petri kaplarında 106 293AAV hücresi 37°C, %5 CO₂, %20 O₂ koşullarında olan inkübatörde büyütüldü. Hücreler yaklaşık %70'lik doluluk oranına ulaştığında pasajlanarak transfeksiyon için hazırlandı. Tranfeksiyon için steril bir tüp içerisinde 12 µg ana vektör (pAAV-FLEX-tdTomato veya pAAV-EF1a-double floxed-hChR2(H134R)-EYFP-WPRE-HGHpA),20 µg yardımcı vektör 2/1 ve 24 µg yardımcı vektör helper, transfeksiyon medyumunu (Opti-MEM) ve transfeksiyon ajanı olan polietilen de eklenerek bir karışım hazırlandı. Hazırlanan bu karışım yeterli doluluk oranına sahip hücrelerin üzerine eklendi. Bu hücreler 3 gün boyunca 37°C, %5 CO₂, %20 O₂ koşullarında inkübatörde bekletildi.

Toplanan hücreler 4°C 1100 RPM'de 5 dakika boyunca edildi ve oluşan çökeltiler -80°C'de donduruldu.

5.2.3.4. Pürifikasyon

Hücrelerin bulunduğu dondurulmuş çözelti 150mM NaCl, 20mM Tris pH 8,0'lik 9 mL liziz çözelti ile karıştırıldı. Hücreler 3 defa boyunca tekrar edilen önce soğuk (%70 EtOH ve kuru buz karışımı), ardından 37°C su banyosunda 2 dakika boyunca bekletildi. Yapılan bu işlemin ardından 3 dakika boyunca hücreler sonikatörde tutulup, virüslerin açığa çıkması sağlandı. 1mM MgCl₂ ve 250 U/mL Benzonase (Sigma E8263-25K) pürifiye işlemi için virüs karışımına eklendi. 4000 RPM 4°C'de

20 dakika boyunca santrifüj edildi ve gradiyent oluşturmak için solüsyonlar hazırlandı. Gradiyent oluşumu için %25'lik çözelti (0,05 mL 1M MgCl₂, 20 mL Iodixanol, 5 mL 10x PBS, 0,125 mL 1M KCl, 0,1 mL 0,5% fenol kırmızısı ve 50 mL kadar H₂O), %40'lık çözelti (1 M MgCl₂, 33,3 mL Iodixanol, 5mL 10x PBS, 0,125 mL 1 M KCl, 5 M NaCl ve 50 mL H₂O) ve %60'lık çözelti (0,05 mL 1 M MgCl₂, 50 mL Iodixanol, 0,125ml 1 M KCl ve 0,025 mL 0,5% fenol kırmızısı) hazırlandı. Optiseal tüpleri ultrasantrifüj için kullanılarak (Beckman 361625) sırasıyla 3 mL %60'lık çözelti, 5 mL %40'lık çözelti, 6 mL %25'lik çözelti, 6 mL %17'lik çözelti olacak şekilde damlalar halinde eklendi. Virüslerin ayrıştırılması için 90 dakika boyunca 18°C'de 60000 RPM'de santrifüj edildi. Bu işlemten sonra %40'lık çözeltinin bulunduğu katmandan virüsler şırınga ile toplandı. Öncesinde hazırlanan 1x'lik saklama tamponu (50 g D-Sorbitol, 1 L: 100 mL, 42,4 mL %5 NaCl ve 10x PBS) ile 100K filtrelili Amicon kolonlarına (Millipore, UFC910024) %40'lık çözelti katmanı eklenip, 15mL'ye 1x'lik tampon çözeltisi ile tamamlandı. 15 mL'ye tamamlanan çözelti 30 dakika 4°C 3500 RPM'de santrifüj edildi. 1x'lik saklama tampon çözeltisi eklenmesi işlemi 2 kez yapıldı. En son ise filtrenin üzerinde biriken virüsler toplanıp, -80°C'de muhafaza edildi.

5.2.4. İntrakranial rekombinant adeno asosiye virüs enjeksiyonu

Bir aylık erkek ve dişi TH-cre fareler intrakraniyal virüs enjeksiyonu için stereotaksik çerçeveye sabitlenmeden önce anestezik madde koklatılarak vücut ağırlıkları ölçüldü. Farenin kafası stereotaksik çerçeveye sabitlendikten sonra Betadin ile temizlendi ve bistüri ile istenilen açıklığa kadar kesildi. Kafatası kulak çubuğuna dökülen az miktarda hidrojen peroksit ile kemiklerin belirgin hale getirilmesi sağlandı. Kafatasına sürülen fazla hidrojen peroksit temiz kulak çubuğu ile temizlendi. Kafatasının da düz olduğundan emin olduktan sonra SteREO Discovery V8 mikroskop ile koordinatlar belirlendi. Stereotaksik çerçevede olan Narishige mikromanipulator ile kafatasında beynin Bregma bölgesine gelindi ve buradaki tüm koordinat değerleri sıfırlandı. Beyin sapındaki Nükleus Traktus Solitarius bölgesi için koordinat düzleminde Anterior/Posterior (A/P) : -7,00 mm ve Medial/Lateral (M/L) : ± 0,50 mm koordinatlarına gidildi. PVN bölgesi için ise A/P :

-0.60 mm ve M/L : ± 0.25 mm koordinatlarına gidildi ve freze ile tam bu noktalara delik açıldı.

Stereotaksik çerçevede beyin içerisine adeno-asosiyeye virüs vermek için kullanılan cam pipetler Sutter P-1000 Mikropipet puller cihazı kullanılarak yapıldı. Bu cihaz sayesinde cam pipetler ısı ile incelik ve virüslerin kafatasına verilmesi için mikro inceliklerine ulaşır. Hazırlanan bu mikropipetlerin içerisine virüsün daha kolay halde çekilebilmesinin sağlanması için mineral yağ çekildi ve Narishge enjektöre takıldı. Z koordinatı beyin yüzeyinde sıfırlandı. NTS için belirlenen koordinata Dorsal/Ventral (D/V) : -3,00 mm, PVN için ise Dorsal/Ventral (D/V) : -4.10 mm koordinatlarında beyin içerisine doğru girildi. NTS bölgesine adeno asosiyeye virüs Narishge enjektör sayesinde 80 nL'lik enjeksiyon yapıldı. Virüs dağılımını sağlamak amacıyla 10 dakika beklendi. Farenin beyninden pipet çıkarıldı ve kafa derisi dikildi. PVH koordinatına ise optogenetik uyarımı için optik fiber (çapı 200 μ m, NA=0,50 Thorlabs) takıldı. PVH için yukarıda söylendiği gibi Dorsal/Ventral (D/V) : -4.10 koordinatına yerleştirildi. Daha sonra bu fiberler akrilik ile sabitlendi. Fareler operasyon sonrasında 1 haftalık gözlem altında tutuldu. NTS koordinatlarına rAAV2/1-CAG-FLEX-tdTomato ve rAAV2/1-EF1a-FLEX-hChR2(H134R)-eYFP ve aynı zamanda ARC ferül takılan fareler optogenetik uyarım, doku fiksasyonu ve immünohistokimyasal boyama yapılması için kullanıldı.

5.2.5. TH nöronlarının sinyal haritasının belirlenmesi

Nükleus Traktus Solitarius bölgesine unilateral olarak rAAV-FLEX-tdTomato virüsü enjekte edildi ve 2 hafta virüsün enfekte olması için beklendi. Fareler bölüm 5.2.7'te belirtildiği gibi sakrifiye edildi ve beyinleri çıkartılıp fiksasyonu yapıldı. Beyin 75 μ m'lik VT1000S vibratomuyla kesitlere ayrıldı ve anterior bölgeden posteriora doğru kesilen kesitler konfokal mikroskopu ile görüntülendi. Alınan kesitlere göre PVH bölgesindeki akson yoğunluklarına bakıldı.

5.2.6. Davranış Testleri

5.2.6.1. TH nöron aktivasyonunun beslenme üzerindeki etkisi

TH nöronlarını aktive etmek için 1 aylık TH-Cre transgenik fareler deney ve kontrol grubu olarak iki kısma ayrıldı. Deney grubundaki farelere rAAV2/1-EF1a-FLEX-hChR2(H134R)-eYFP virüsü enjekte edildi kontrol grubu farelerine ise rAAV2/1-CAG-FLEX-tdTomato virüsü enjekte edildi. İki haftalık iyileşme sürecinin ardından, fareler tekli kafeslerine alındı ve 3-4 gün boyunca alıştırdı. Ardından günlük tükettiği besin miktarı gözlemlendi. Her iki gruptaki farelerin günlük besin tüketimleri stabil hale geldiğinde beslenme deneyine başlandı. Besin tüketimleri sabah 08:00' da başlayan gündüz döngüsü, ışıkla uyarımdan önce 2 saat boyunca besin tüketim miktarı kaydedildi. Fiber ışık kaynağıyla uyarım sırasında 473 nm'lik bir diyot lazeri (Doric Lenses Inc., Quebec) ve bu lazerin fiber ucundan 10-15 mW'lik çıkan ışıkla PVH bölgesi 2 saat boyunca uyarıldı. Bu çalışmada ki uyarım 4 saniyede 1 tekrarlayan 10Hz'di. Uyarımdan sonra da tekrar 2 saat besin tüketimine bakıldı. Her hayvanda bu protokol akşam, gündüz ve fiber ışık verilmeden tekrarlandı.

5.2.6.2. NTS' in PVH bölgesi üzerindeki anksiyete etkisi

Davranış testlerine başlamadan önce fareler test odasına getirildi ve bir saat ortama alışmaları için beklendi. Bu davranış deneyleri ile her iki grubun lokomotor aktivitesi ve kaygı ile ilgili davranışlarını değerlendirmek için yapılmıştır.

5.2.6.2.1. Açık Alan Testi

NTS^{TH:ChR2} → ARC ve NTS^{TH:tdTom} → ARC fareleri 40 × 40 × 40 cm' lik boyutlarında dört odalı bir platforma sırayla koyuldu. Her hayvan dört odalı platformun ortalarında kalacak şekilde koyuldu. Farelere test odasında 10 dakika boyunca 10 Hz' lik lazerli uyarım verildi. CCD kamerası ve ANY-maze programı ile izlendi.

5.2.6.2.2. Yükseltilmiş Artı Alan Testi

Yükseltilmiş artı alan testinde, iki açık kolu (5 x 35 cm) ve iki kapalı kolu (5 x 35 x 20 cm) olan labirent, 35 cm yüksekliğindedir. NTS^{TH:ChR2} ve NTS^{TH:tdTom} farelerine test odasında platformun tam ortasına ve baş kısımları açık kola bakacak şekilde yerleştirilip 10 dakika ve 10 Hz'lik uyarım verildi. Test CCD kamerası ile kaydedildi ve ANY-maze yazılımı ile analizi yapıldı.

5.2.6.2.3. Aktif Alan Tercih Testi

NTS^{TH:ChR2} → ARC ve NTS^{TH:tdTom} → ARC fareleri 25 × 50 × 25 cm 'lik boyutlarında iki odalı bir platforma sırayla koyuldu. Platformun bir odasında lazerli uyarım diğer odasında ise herhangi bir uyarım olmayacak şekilde ayarlandı. Fareler 30 dakika boyunca ANY-maze programı tarafından CCD kamera ile izlendi. Bu program sayesinde odaların her iki tarafında da harcanan zaman kaydedildi.

5.2.7. Doku Fiksasyonu ve Kesit Alma

Deney bitiminde rAAV2/1-EF1a-FLEX-hChR2(H134R)-eYFP ve rAAV2/1-CAG-FLEX-tdTomato enjeksiyonu yapılan farelere anestezi altında kardiyak perfüzyonu yapıldı. Perfüzyon sırasında fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ve paraformaldehit fiksatif (PFA) aşamalarından geçirildi. Kardiyak perfüzyonu bittikten sonra çıkarılan beyinler 4 saat boyunca %4'lük PFA çözeltisi içerisine 4°C'de bekletildi. 4 saatin sonunda gece boyunca 4°C'de sükröz çözeltisinin içerisinde beklemeye bırakıldı. Beyinler 48 saat sükrözde bırakıldıktan sonra VT1000S vibratomuyla kesilme işlemi gerçekleştirildi. Kesim fosfat tamponlu tuz çözeltisi içerisinde 75 µm kalınlığında kesildi.

5.2.8. İmmünohistokimyasal antikor boyanması

Vibrotom cihazıyla beyin kesitleri alınan rAAV2/1-EF1a-FLEX-hChR2(H134R)-eYFP ve rAAV2/1-CAG-FLEX-tdTomato enjeksiyonu yapılan farelerin beyin kesitleri arasından PVH ve NTS bölgelerini içerenler seçildi. Beyin kesitleri fosfat tamponlu sıvı içerisine alındı. Boyamanın önceliği olan bloklama solüsyonu hazırlandı. Bloklama solüsyonu için 1x PBS'te 0,1% Triton-X-100 ve %15'lik keçi serumu kullanıldı. Beyin kesitleri fosfat tamponlu sıvı çözeltisinden arındırıldı ve hazırlanan bloklama solüsyonunda bir saat boyunca çalkalayıcı üzerinde 4°C'de bekletildi. Bir saatin ardından primer antikor için bloklama solüsyonunun içerisine 1:5000 oranında anti-TH primer antikor (ab112, abcam) konuldu. Primer antikorların bulduran solüsyon beyin kesitlerinin üzerine yavaş yavaş eklendi. Negatif kontrol için de ayrılan beyinlerin üzerine antikorlu solüsyon eklenmedi. Ertesi gün 3 kez 15'er dakika boyunca fosfat tamponlu tuz çözeltisi ile yıkandı. Sekonder boyama için 1x PBS'te 0,1% Triton-X-100 ve %15 keçi serumu içeren bloklama solüsyonuna 1:5000 oranında Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor® 488 (A-11008, Thermo Scientific) antikor beyin kesitlerine eklendi. Çalkalayıcı da 1 saat 4°C'de çalkalanma işlemi yapıldı. Tekrar 3 kez ve 15'er dakika yıkama işlemi yapıldı. Kesitler konfokal mikroskopunda görüntülenebilir hale gelmesi için lama alındı ve kuruyan beyin kesitleri mounting medium eklenip lamel ile üzerleri kapandı.

5.2.9. Mikroskopik görüntüleme ve analiz

İmmünohistokimya boyamasının yapılmasının ardından Zeiss LSM 800 ve LSM 780 konfokal mikroskopları kullanılarak beyin kesitlerinin görüntülenmesi yapıldı. Kırmızı rAAV-FLEX-tdTomato floresan boncuklarını görüntülemek için 568 nm, yeşil anti-TH sekonder antikorunun görüntülenmesi için ise 488 nm dalga boyu kullanıldı. LSM 800 ve LSM 780 konfokal mikroskopları ile çekimi yapılan nöron görüntüleri ImageJ programına aktararak nöron sayım analizleri yapıldı.

5.2.10. İstatistiksel Analizler

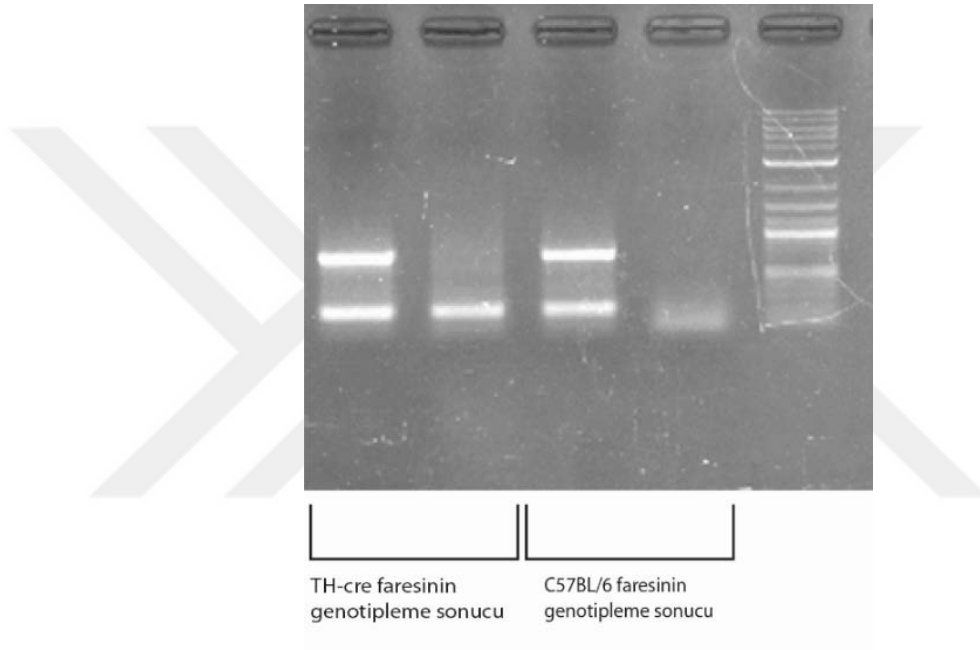
GraphPad Prism (RRID;SCR_002798, GraphPad, San Diego, CA) programı istatistiksel analizler için kullanılmıştır. Bu programın sonucuna göre elde edilen sonuçların anlamlılıkları Student's t-test ile değerlendirilmiştir. $p < 0,05$; *, $p < 0,01$; **, $p < 0,001$; *** olarak gösterildi ve $p > 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamsız olarak kabul edildi. Tüm sayısal değerler \pm standart hata olarak gösterildi.



6. BULGULAR

6.1. Deney Grupları ve Genotipleme

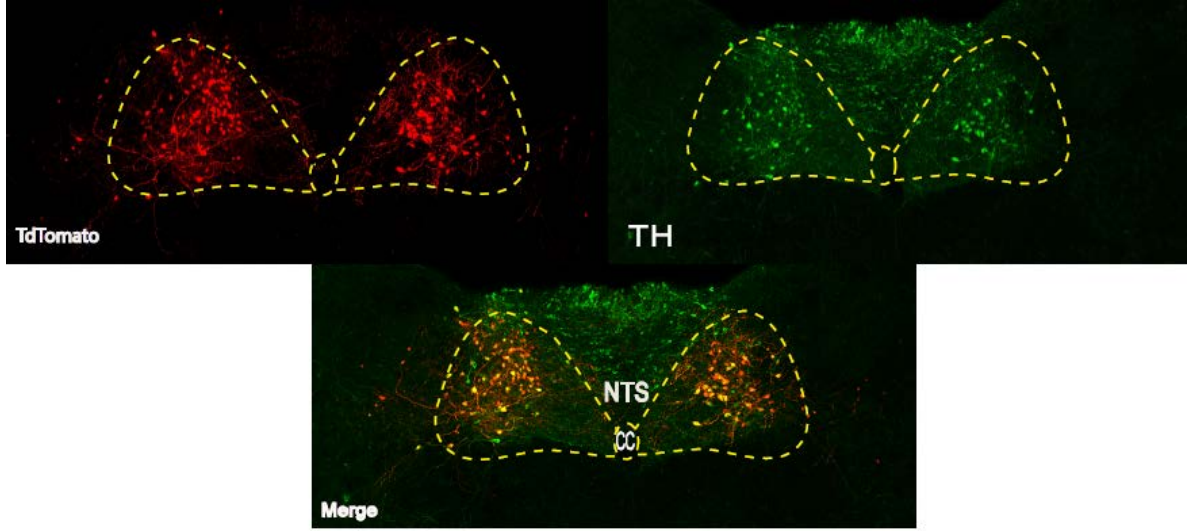
Bu davranışsal çalışmalar için 6-12 haftalık Th-cre erkek ve dişi transgenik hayvanlara yapılmıştır. Genotipleme sonucuna göre transgenik olmayan fareler deneye dahil edilmedi.



Resim 6.1.1. C57BL/6 ve TH-cre faresinin genotipleme sonucu

6.2. Nükleus Traktus Solitarius'daki TH nöronlarının morfolojik görüntüsü

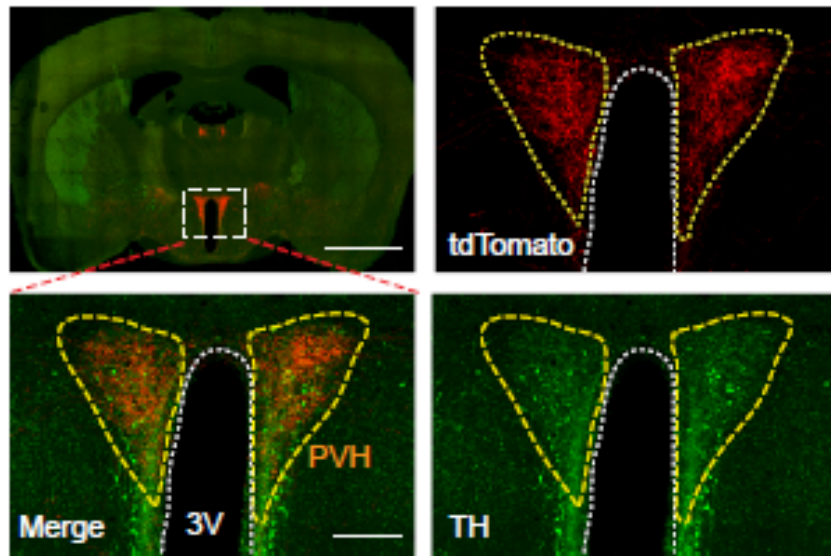
Tirozin Hidroksilaz nöronlarının NTS bölgesindeki varlığının tespiti için TH-Cre transgenik farelere rAAV-FLEX-tdTomato virüsü enjekte edildi ve bu bölgeye ait beyin kesitleri toplandı. Kesitler anti-TH antikoru ile işaretlendi.



Resim 6.2.1. NTS'deki rAAV-FLEX-tdTomato virüsünün enjeksiyonu

6.3. Hipotalamusun NTS ile katekolaminerjik bağlantı yollarının belirlenmesi

Hipotalamusa gelen ana katekolaminerjik girdinin (input) NTS beyin bölgesinden gelen sinyal olup olmadığını anlamak için cre bağımlı transgenik hayvanın NTS bölgesine cre spesifik rAAV2-CAG-FLEX-tdTomato-WPRE virüs verildi. PVN bölgesi anti-TH antikoruna (yeşil) ile işaretlendi.

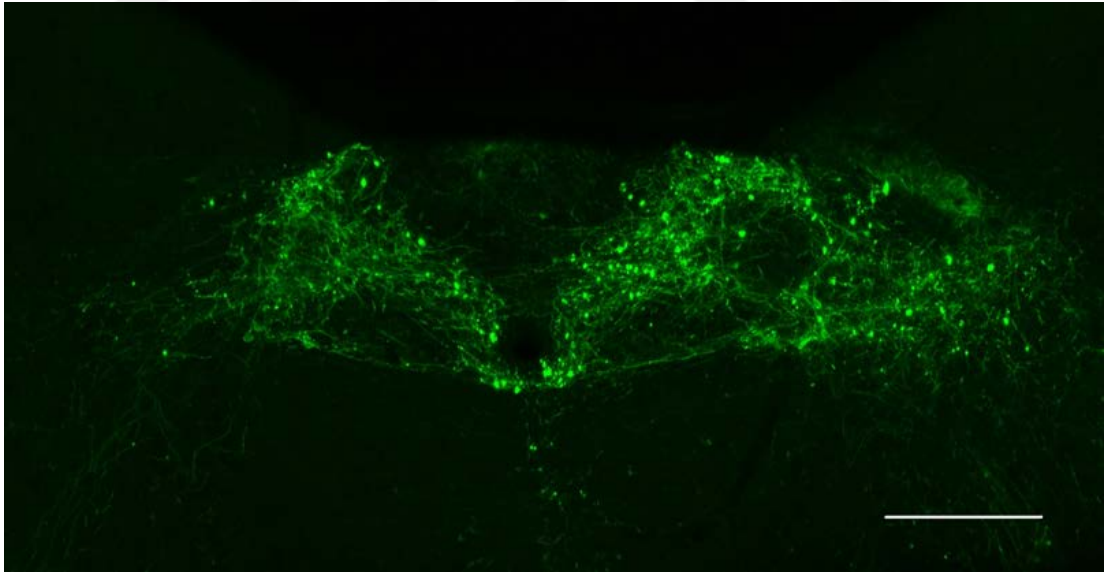


Resim 6.3.1. NTS'ten hipotalamusun PVN bölgesine gelen nöron projeksiyonu

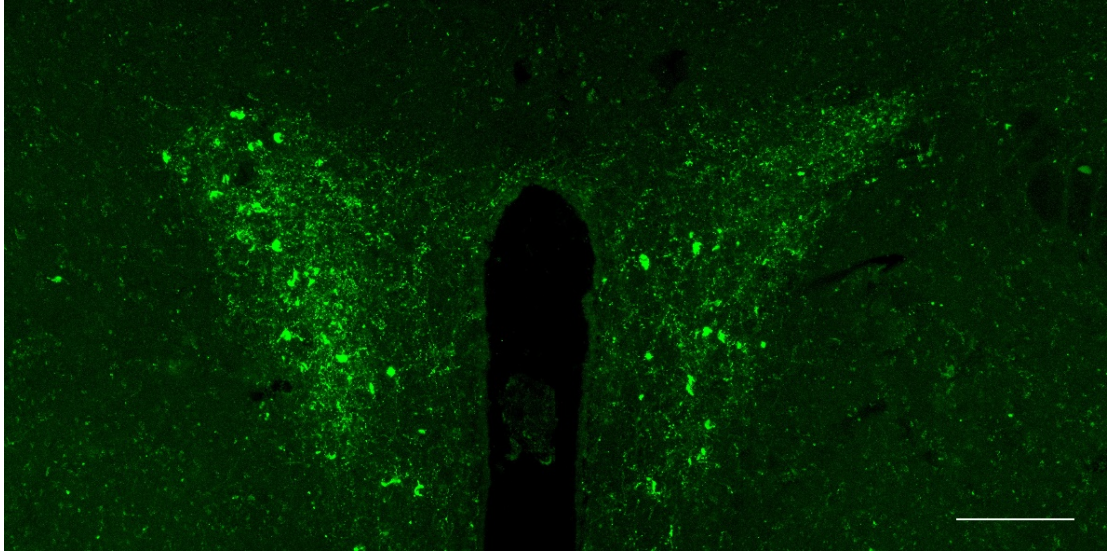
Bu deney sonucuna göre NTS bölgesinden PVN'e gelen yoğun projeksiyonlar gözlemlendi ve beyin sapındaki NTS bölgesinde bulunan TH nöronlarının hipotalamusta ile katekolaminerjik bir bağlantı kurduğu düşünüldü.

6.4. NTS' ten PVH giden projeksiyonun besin tüketimiyle ilişkisi

NTS'den paraventriküler çekirdeğe gelen katekolaminerjik nöronlarının etkisi ile açlık ve tokluk mekanizmalarıyla ilgili bir bölge olup olmadığına bakıldı. Bilateral ve intrakraniyal olarak NTS bölgesine bir grup rAAV2-EF1 α -FLEX-ChR2-eYFP ve kontrol grubu olarak rAAV2/1-CAG-FLEX-tdTomato enjeksiyonu yapıldı. PVN bölgesinin üzerine ise fotouyarm için fiber yerleştirildi. Daha sonra TH-cre transgenik fareleri davranış odasına alındı.

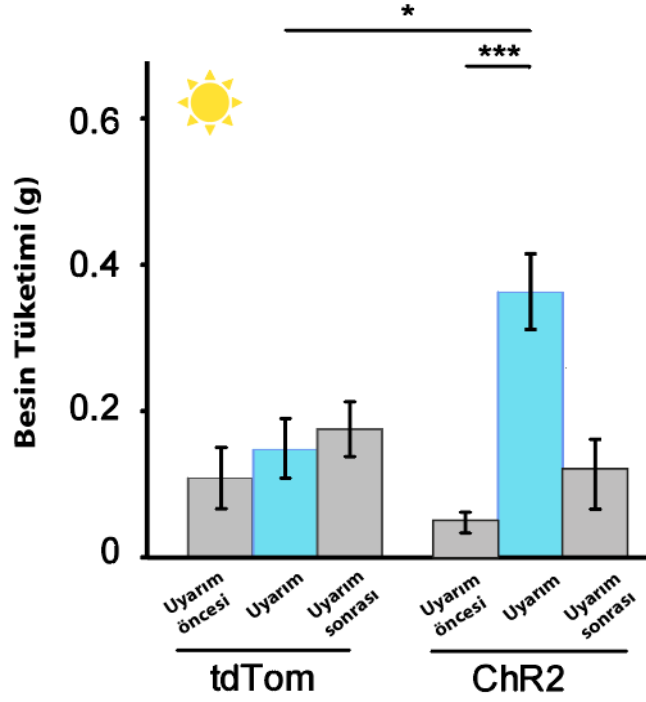


Resim 6.4.1. Nükleus Traktus Solitarius bölgesine yapılan FLEX-ChR2-eYFP enjeksiyonu



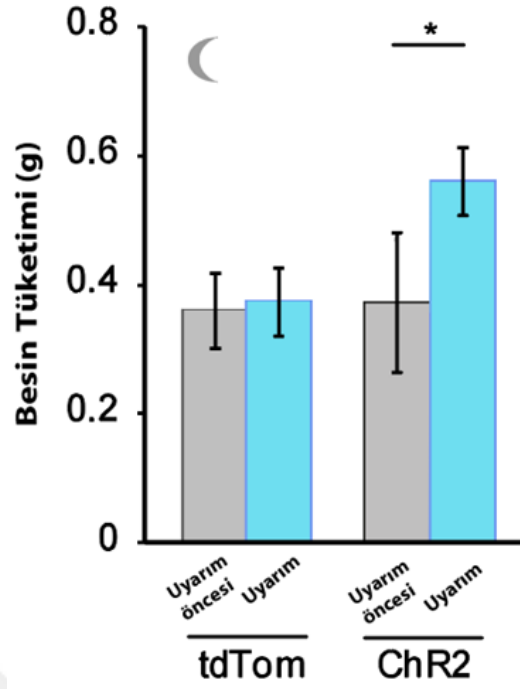
Resim 6.4.2. Nükleus Traktus Solitarius bölgesinde Paraventriküler hipotalamusa gelen ChR2-eYFP projeksiyonu

Yapılan analizlerle gündüz döngüsünde TH nöron aktivasyonunun analiz sonuçlarına göre oreksijenik bir etki yaptığı düşünüldü. rAAV-FLEX-tdTomato'nun besin tüketimi uyarım öncesinde 0,108 g uyarım sırasında 0,148 g olarak ölçüldü. rAAV2-FLEX-ChR2' un besin tüketimi uyarım öncesinde 0,04g, uyarım sırasında 0,35 g olarak ölçüldü. Deney grubundaki tüm farelerin 6 saatlik besin tüketimi ilişkisi değerlendirildi. Gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı farka rastlandı ($p < 0,05$)



Şekil 6.4.1. TH nöron aktivasyonu gündüz döngüsü FLEX-ChR2 ve FLEX-tdTom enjeksiyonu olan fare gruplarının 6 saatlik besin tüketimi değişimi

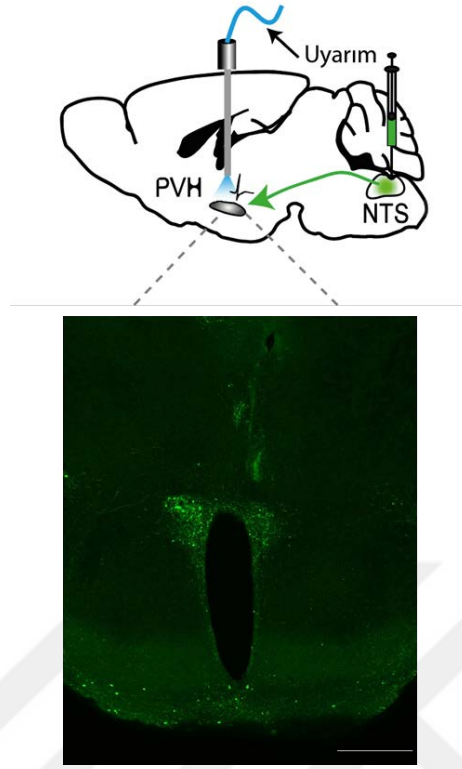
Gece döngüsünde ise TH nöron aktivasyonunun analiz sonuçlarına göre, rAAV-FLEX-tdTomato'nun besin tüketimi uyarım öncesinde 0,28, uyarım sırasında 0,37 olarak ölçüldü. rAAV2-FLEX-ChR2' un besin tüketimi uyarım öncesinde 0,03, uyarım sırasında 0,56 olarak ölçüldü. Uyarım öncesi ve uyarım sırasına göre kıyaslama yapılırsa, her iki grupta da besin tüketiminde anlamlı farklılıklar görüldü. ($p < 0,05$)



Şekil 6.4.2. TH nöron aktivasyonu gece döngüsü FLEX-ChR2 ve FLEX-tdTom enjeksiyonu olan fare gruplarının 6 saatlik besin tüketimi değişimi

6.5. NTS' ten PVH' e gelen nöronlarda anksiyetikklik rolü

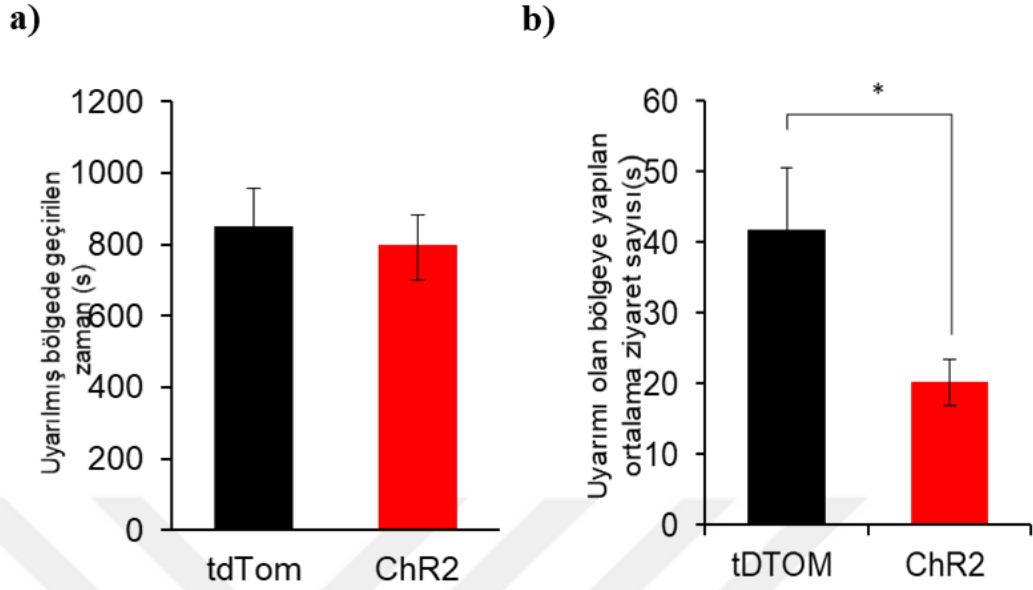
TH nöronlarının aktivasyonu durumundaki değişimini gözlemleyebilmek için transgenik Th-cre farelerin NTS bölgesine intrakraniyal olarak cre bağımlı rAAV2-EF1 α -FLEX-ChR2-eYFP virüsü enjeksiyonu yapıldı ve PVN üzerine de fiber yerleştirildi.



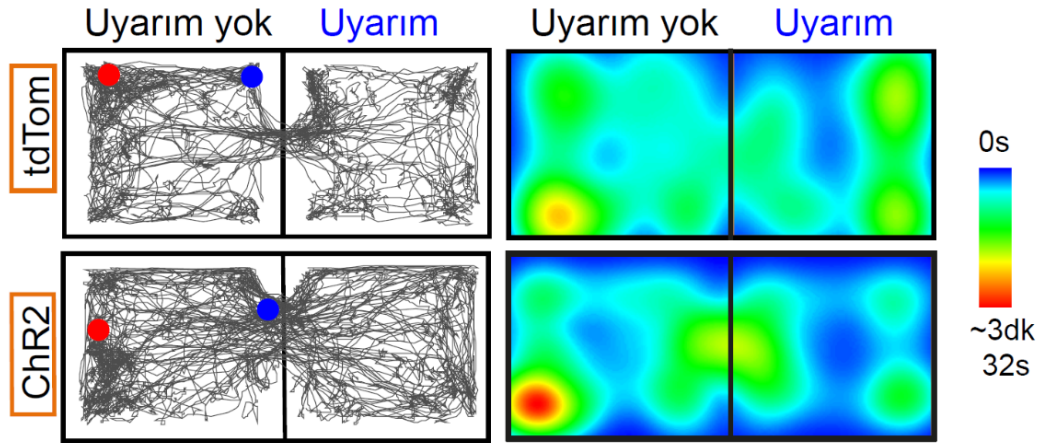
Şekil 6.4.1.1. Nükleus Traktus Solitarius bölgesine ChR2-eYFP enjeksiyonu ve paraventriküler nükleus bölgesine takılan ferülün şematik gösterimi

PVN'in fotostimülasyonu ile NTS'den gelen nöronların bu bölge üzerindeki anksiyatiklik etkisinin olup olmadığına bakıldı.

Aktif alan davranış testi için rAAV2/1-EF1a-FLEX-hChR2(H134R)-eYFP ve rAAV2/1-CAG-FLEX-tdTomato enjekte edilen hayvanlar test odasına getirildi ve deneye başlamadan önce hayvanların bu ortama alışması için belirli bir süre beklendi. Ardından 30 dakikalık deney protokolü izlendi. Bu testin sonucunda, FLEX-ChR2 virüsünü taşıyan fareler, kontrol grubu olarak FLEX-tdTom virüsünü bulunduran farelere kıyasla uyarımlı olan bölgeyi daha az tercih etti ve ışıkla uyarımdan kaçma tepkisi gösterdikleri gözlemlendi. Bu teste göre TH-cre transgenik hayvanlarının NTS bölgesinden PVN'e yaptığı aksonal uzantılarla bu bölgede anksiyete ile bir bağlantısının olabileceği düşünüldü.



Şekil 6.4.1.2. TH nöronlarının aktivasyonu ile aktif yer tercihi analizi a) ChR2 ve tdTom gruplarının uyarılmış alanda geçirdiği zaman miktarı b) ChR2 ve tdTom gruplarının uyarımın olduğu bölgesine yapılan ortalama ziyaret sayısı değerleri



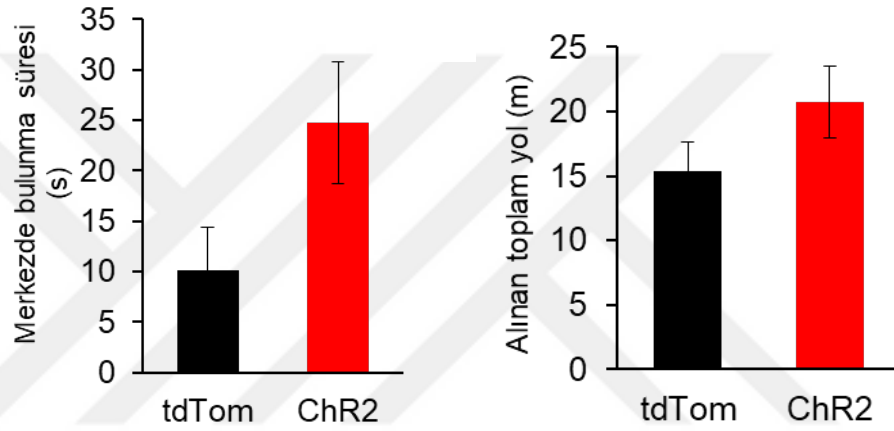
Şekil 6.4.1.3. ChR2 ve tdTom farelerinin 30 dakikalık protokol sırasında izlediği yol (sol) ve ortalama ısı haritası (sağ)

Açık alan testinde rAAV2/1-EF1a-FLEX-hChR2(H134R)-eYFP ve rAAV2/1-CAG-FLEX-tdTomato enjekte edilen hayvanlar test odasına getirildi ve deneye

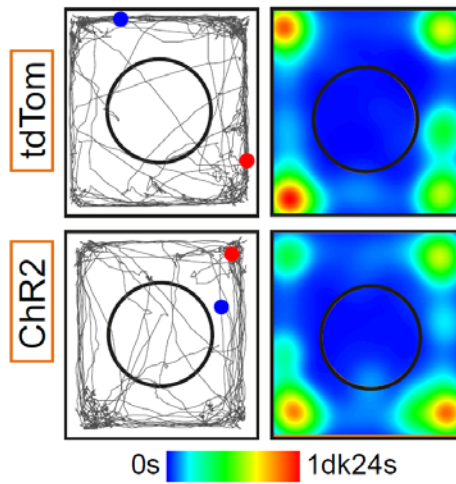
başlamadan önce bir süre bu ortama alışmaları için süre verildi. Ardından fareler test odalarının tam ortasına konulacak şekilde deneye başlandı ve 10 dakikalık deney protokolü izlendi. FLEX-ChR2 virüsü enjekte edilen grup test odasının merkezinde FLEX-tdTom grubuna göre daha fazla bulundu ve test odasında daha fazla yol aldı. Bunun testin sonucunda FLEX-ChR2 ve FLEX-tdTom virüsleri bulandıran iki grup arasında anlamlı bir farklılığa rastlanmadı.

a)

b)

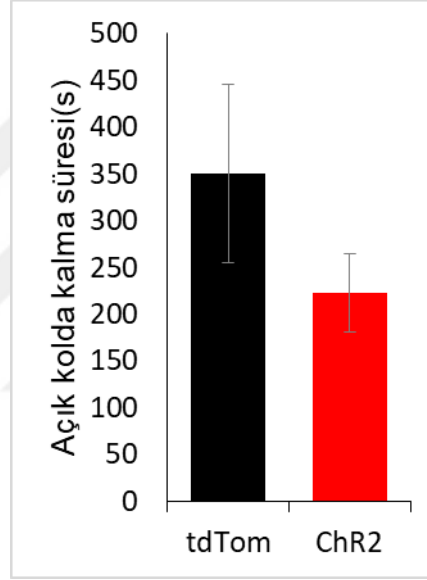


Şekil 6.4.1.4. TH nöronlarının aktivasyonu sırasında açık alan testi a) FLEX-ChR2 ve FLEX-tdTom gruplarının merkezde kalma süresi b) FLEX-ChR2 ve FLEX-tdTom gruplarının test süresince aldığı yol

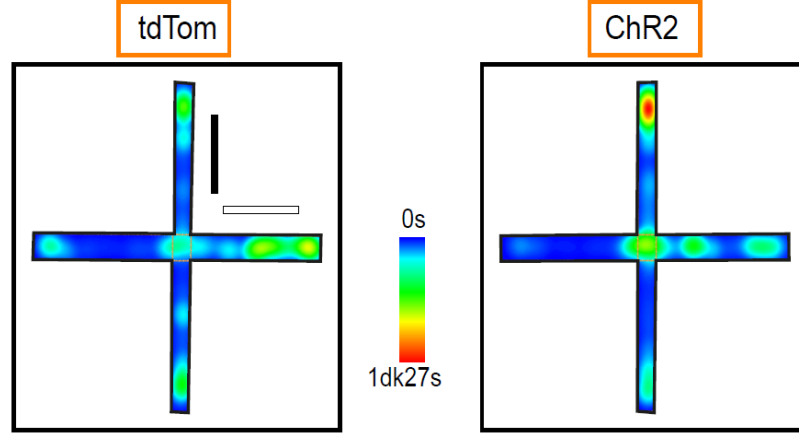


Şekil 6.4.1.5. ChR2 ve tdTom farelerinin 10 dakikalık protokol sırasında izlediği yol (sol) ve ortalama ısı haritası (sağ)

Yükseltilmiş artı alan testinde, rAAV2/1-EF1a-FLEX-hChR2(H134R)-eYFP ve rAAV2/1-CAG-FLEX-tdTomato enjekte edilen hayvanlar test odasına getirildi ve deneye başlamadan önce fare gruplarının bu ortama alışması için bir süre beklendi. Ardından testin tam ortasına ve açık koluna bakacak şekilde fare grupları yerleştirildi. Deney süresince 10 dakikalık bir protokol izlendi. Bu deneyin sonucunda FLEX-ChR2 virüsü enjekte edilen fare grubu ve FLEX-tdTom virüsü enjekte edilen fare grubunun açık kollarda kalma süresi benzerdi. İki grup arasında anlamlı bir fark ortaya çıkmadı.



Şekil 6.4.1.6. Yükseltilmiş artı alan testinde TH nöronlarının aktivasyonu sırasında açık kolda kalma zamanı



Şekil 6.4.1.7. ChR2 ve tdTom farelerinin 10 dakikalık protokol sırasında ortalama ısı haritası

Davranış deneylerinin sonucunda ise açık alan testi, yükseltilmiş artı alan testi ve aktif alan testi sonucuna göre farelerin aktivitesinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu da bu yolun stres davranışlarında herhangi bir etkisinin bulunmadığını göstermiştir.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yeme eyleminin hangi anda başladığını belirlemek zordur. Bu zorluk; yemek yeme arzusunun, kalori gereksiniminden lezzetli yiyeceklerin görünüşüne ve kokusuna hatta günün saati, sosyal olaylar ve duygudurum değişiklikleri gibi birçok nedene bağlı olmasından kaynaklanmaktadır (55). Başlıca duygudurum değişikliklerinden biri olan ve santral sinir sisteminden kaynaklanan stres faktörlerin vücutta fizyolojik ve endokrin değişikliklere sebebiyet verdiği bilinmektedir. Çeşitli araştırmalar sonucunda sıçanlarda vücut ağırlığında artışına neden olan stresörlerin glukokortikoid düzeyinin artmasına sebep olduğu ve bu glukokortikoid artışına bağlı olarak da sistemik etkilerin ortaya çıktığı bilinmektedir (56). Limbik sistemdeki duygudurum değişikliklerinden sorumlu olan bölgeler hipotalamus, talamus ve amigdalada bulunmaktadır (57).

Hipotalamus özel merkezi devreler tarafından sıkı bir şekilde düzenlenen ve enerji dengesinin kontrolünden sorumlu merkez olarak bilinmektedir. Buraya gelen bilgiye bir cevap oluşturulur ve hormonal yollar ile vücuda iletilir (4). Bizim incelediğimiz bu hormonal yollardan biri de katekolamin sınıfında bulunan nörepinefrindir.

Beyin sapında bulunan NTS bölgesi ise vücudun enerji dengesi ile ilişkili sinyalleri alan yiyecek arayışı ve tüketimini düzenleyen önemli bir beyin alanıdır. Ayrıca anksiyete bağlı duygudurum bozukluklarında en fazla nöroadrenalin ve serotonin hormonlarındaki değişikliklerin rol aldığı düşünülmektedir (58). Bu nedenle bu çalışma da beyin sapında artış gösteren nörepinefrine bağlı sinyallerin PVN'daki oreksijenik ve stres artırıcı etkisi için bu iki bölge arasındaki sinyalizasyona bakıldı.

Yemek yeme arzusunun bir başka deyişle iştahı ve bununla bağlantılı sinir devrelerini ve bu devrelerle çalışan sinaptik mekanizmaları anlamak önemlidir. Son yirmi yılda çok sayıda beyin bölgeleri ve farklı işlevleri kontrol eden hücre tipleri bulunmuştur. Neyse ki, viral vektörlerin ve bu vektörlerle uyumlu çalışan transgenik farelerin kullanımıyla, nörona özgün yeni sinirbilim teknolojileri geliştirilerek, farklı

nöron tiplerinin aktivitesini ve bunların davranışsal sonuçlarını ölçerek belli bir davranışı ortaya çıkaran afferent-efferent bağlantıları haritalanmak artık mümkündür (59). Spesifik nörostimülasyon teknolojileri kullanılarak Nükleus Traktus Solitarius bölgesine FLEX-ChR2-eYFP virüsü enjekte edildi ve PVN'a olan akson projeksiyonu gözlemlendi. Bu nöron gruplarının ise NTS' den gelen TH nöron alt grubuna ait olup olmadığını anlamak için yeşil floresan işaretli beyin kesitlerine immünohistokimyasal boyama yapıldı ve böylelikle medial hipotalamusun NTS'den yoğun katekolaminerjik girdi aldığı gözlemlendi. Önceki çalışmalarda PVN'a yapılan nörepinefrin enjeksiyonuna bağlı olarak besin alımında artış olduğu gösterilmiş (46,59) yine daha yakın zamanda yapılan bir mikroenjeksiyon çalışması da PVN'nin beslenme kontrolü için önemli bir bölge olabileceğini ortaya koymuştur (18). Bununla birlikte NTS'deki nörepinefrin sentezleyen nöronların anoreksijenik bir etkisi olduğu da bilinmektedir. Dahası NTS'den gelen ve PBN'a olan projeksiyon uyarıldığında anoreksijenik bir davranışın oluştuğunu gösteren çalışmalar vardır (19). Bu bilgilerden yola çıkarak, bu çalışmada NTS'den PVN'e gelen katekolaminerjik sinyal iletiminin nöronal aktivasyonu ile hem gece hem de gündüz döngülerinde farelerde besin alımındaki anlamlı bir artış tesbit edildi ($P<0.05$). Böylelikle literatürde ilk defa bu çalışmada PVN'un gece ve gündüz döngülerinde artan oreksijenik etkinin NTS'tan gelen katekolaminerjik bağlantı sayesinde olduğu tesbit edilmiştir. Beslenmeyle ilgili periferden gelen nöronal sinyallerin beslenme regülasyonuna etkisinde beyin sapının da etkili olduğunu artık biliyoruz. Besin henüz sindirim kanalında sindirilmeden vagus siniri üzerinden gelen bu uyarılar NTSin açlık sırasında uyarılan ilk merkezi sinir sistemi çekirdeklerinden biri olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmanın diğer bir kolunda ise FLEX-ChR2 ve kontrol grubundaki farelerin lokomotor aktivitesi ve stres ile ilgili davranışlarına bakıldı. Aktif alan testinin sonucuna göre ChR2 grubu, uyarım olan bölgede kontrol grubuna göre daha az zaman geçirmiş ve uyarım olan bölgeden kaçma davranışı göstermiştir. Ayrıca bu bölgeye yapılan ortalama ziyaret sayısındaki azalış dikkat çekicidir ($p<0,05$).

Açık alan testinde anksiyeteyle ilgili davranış iki faktöre bağlıdır. Bunlardan birincisi deney hayvanının bilmediği farklı bir ortamda bulunması ve geniş alanda yaşadığı korkudur (60). Deney sonuçlarında test alanının merkezinde bulunma süresi ve bu alanda aldıkları toplam yola bakıldığında, Chr2 grubunun kontrol grubuna göre merkezde bulunma süresi ve aldığı toplam yol miktarı daha fazladır. Bu davranış testinin verilerine göre anlamlı bir değişikliğe rastlanmamıştır ($p>0,05$).

Yükseltilmiş artı alan testinde deneğin strese bağlı olarak kontrol grubuna göre açık kolda daha az zaman geçirmesi beklenmektedir (61). Bizim sonuçlarımızda ise Chr2 grubu ile kontrol grubu arasında açık kolda geçirilen süre bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır ($p>0,05$).

Yapılan analizler gösterdi ki NTS'den gelip nöropefrin salınımı yapan tirozin hidroksilaz nöronlarının PVN üzerindeki nöronal projeksiyonunun optogenetik olarak uyarılması oreksijenik bir etkiye sahiptir. Ayrıca stres testlerinde elde edilen analiz sonuçları beraber değerlendirildiğinde göre açık alan testi ve artı alan testinde her iki grup arasında da anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemişken, aktif alan tercihi deneyinde FLEX-Chr2 grubu optogenetik uyarım bölümünde daha az vakit geçirir. Bu sonuç, NTS ile PVN arasındaki katekolaminerjik projeksiyonun vücutta stres durumunu regüle eden yollarla da bağlantılı olabileceğini ortaya koymuştur. Söz konusu sonuçlar ile birlikte TH fare modelinde nöropefrin hormonunun anahtar rol oynadığı nöronların davranışsal ve fizyolojik özelliklerini ilk kez sistematik ve kapsamlı bir şekilde karakterize etmeyi başardık. Elde edilen analiz sonuçlarıyla besin-enerji dengesine ve stres yollarına bağlı fizyolojik değişimlerin nasıl etkilendiğinin ve bu değişikliklerin hangi sinir ağı aktivitesine bağlı olarak gerçekleştiğinin bilinmesi sosyal ve yeme davranış bozukluklarının mekanizmasının daha iyi anlaşılmasında önemli bir rol oynaması muhtemeldir.

8. KAYNAKÇA

1. Andermann ML, Lowell BB. Toward a Wiring Diagram Understanding of Appetite Control. *Neuron*. 2017;95(4):757–78.
2. Sternson SM, Atasoy D. Agouti-related protein neuron circuits that regulate appetite. *Neuroendocrinology*. 2014;100:95–102.
3. Blevins, J.E., and Baskin, D.G. Hypothalamic-Brainstem Circuits Controlling Eating. *Front Eat Weight Regul*. 2010;63:133–40.
4. Grosse J, Heffron H, Burling K, Akhter M, Habib AM, Rogers GJ, et al. Insulin-like peptide 5 is an orexigenic gastrointestinal hormone. 2014;111(30):11133–8.
5. Douglas BYWW, Rubin RP. The mechanism of catecholamine release from the adrenal medulla and the role of calcium in stimulus-secretion coupling. From the Department of Pharmacology , Albert Einstein College of Medicine, Yeshiva University , Although evidence has existed for many. 1963;167(2):288–310.
6. Zhang X, Haven N. Hypothalamic arcuate nucleus tyrosine hydroxylase neurons play orexigenic role in energy homeostasis. 2016;19(10):1341–7.
7. Biphenyls CP. Enhanced AMPA receptor trafficking mediates the anorexigenic effect of endogenous glucagon like peptide-1 in the paraventricular hypothalamus. 2015;91(2):165–71.
8. Duerschmid C, He Y, Wang C, Li C, Bournat JC, Romere C, et al. Asprosin is a centrally-acting orexigenic hormone. 2018;23(12):1444–53.

9. Sohn, J. W. Network of hypothalamic neurons that control appetite. *BMB Rep.* 2015; 48 (4): 229-233.
10. Haslam DW, James WP. Obesity. *Lancet.* 2005;366(9492):1197-209.
11. Cummings DE, Overduin J. Gastrointestinal regulation of food intake. *J Clin Invest.* 2007;117(1):13-23.
12. Anand B.K. and Brobeck JR . Localization of a feeding center in the hypothalamus of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1952; 77(2): 323-324.
13. Mieda, M., S. C. Williams, J. A. Richardson, K. Tanaka and M. Yanagisawa. The dorsomedial hypothalamic nucleus as a putative food-entrainable circadian pacemaker. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(32): 12150-12155.
14. Sims, J. S. and J. F. Lorden. Effect of paraventricular nucleus lesions on body weight, food intake and insulin levels. *Behav Brain Res.* 1986; 22(3): 265-281.
15. Brookes SJ, Spencer NJ, Costa M, Zagorodnyuk VP. Extrinsic primary afferent signalling in the gut. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013;10:286–296.
16. Rinaman L. Ascending projections from the caudal visceral nucleus of the solitary tract to brain regions involved in food intake and energy expenditure. *Brain Res.* 2010;1350:18–34.
17. D'Agostino G, Lyons DJ, Cristiano C, Burke LK, Madara JC, Campbell JN, Garcia AP, Land BB, Lowell BB, Dileone RJ, et al. Appetite controlled by a cholecystokinin nucleus of the solitary tract to hypothalamus neurocircuit. *Elife.* 2016;5.

18. Leibowitz S.F., Sladek C, Spencer L,Tempel D. Neuropeptide Y, epinephrine and norepinephrine in the paraventricular nucleus: Stimulation of feeding and the release of corticosterone, vasopressin and glucose. *Brain Res.* 1988;(6): 905-912.
19. Roman CW, Derkach VA, Palmiter RD. Genetically and functionally defined NTS to PBN brain circuits mediating anorexia. *Nat Commun.* 2016;7:11905.
20. D. Benton, R.T. Donohoe. The effects of nutrients on mood. *Public Heal Nutrition.* 2:403–9.
21. M. Dietrich, M.R. Zimmer, J. Bober, T.L. Horvath. Hypothalamic Agrp Neurons Drive Stereotypic Behaviors Beyond Feeding. *HHS Public Access.* 160(6):1222–32.
22. M. R. Zimmer, A. E. Schmitz, M.O. Dietrich. Activation of Agrp neurons modulates memory-related cognitive processes in mice. *Pharmacol Res.* 141:303–9.
23. Mesaros A, Koralov SB, Rother E, Wunderlich FT, Ernst MB, Barsh GS, et al. Activation of Stat3 Signaling in AgRP Neurons Promotes Locomotor Activity. *Cell Metab.* 2008;7(3):236–48.
24. Yau YHC, Potenza MN. Stress and eating behaviors. *Minerva Endocrinol.* 2013;38(3):255–67.
25. Betley JN, Xu S, Cao ZFH, Gong R, Magnus CJ, Yu Y, et al. Neurons for hunger and thirst transmit a negative-valence teaching signal. *Nature.* 2015;521:180.
26. Murphy M, Mercer JG. Diet-Regulated Anxiety. *Int J Endocrinol.* 2013;2013:1–9.

27. A. Papadimitriou, K.N. Priftis. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroimmunomodulation*. 2009;16:265–71.
28. Walker B, Stewart P, et al. Edwards Enzyme Modulation of Access to Corticosteroid Receptors. *Princ Med Biol*. 1997;10:297–310.
29. Härfstrand A, Fuxe K, Cintra A, Agnati LF, Zini I, Wikström A-C, et al. Glucocorticoid receptor immunoreactivity in monoaminergic neurons of rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(December):9779–83.
30. Ina C, Armando NG, Dos Santos Claro PA, Silberstein S. et al. Endocrinology and the brain: corticotropin-releasing hormone signaling. *Endocr Connect*. 2017;6: 99-120
31. Grossman S.P. Eating or drinking elicited by direct adrenergic or cholinergic stimulation of hypothalamus. *Science*.1960; 132, 301–302.
32. Yıldırım, M. "Spinal Sinirler, Temel Nöroanatomi. 1." Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri (2000): 180-187.
33. Inamdar SD. A concept of the development of the mammalian rhombencephalon based on physical rotational forces. *Med Hypotheses*. 1995;44(4):251-3.
34. The Brain Stem. Available at:
<http://www.humanneurophysiology.com/brainstem.htm>. (Accessed: 18th May 2019).
35. Taner D, Sancak B, Akşit D, Cumhuri M, İlgi S, Kural E, Başar R, Önderoğlu S, Tuncel M, Çelik H, Sargon MF, Sürücü S, Taşcıoğlu B, Yener N, Durgun B, Atasever A, Ö. E. *Fonksiyonel Nöroanatomi*. (ODTÜ Yayınevi, 2015)

36. Brainstem III: The Midbrain (Organization of the Central Nervous System) Part 1. Available at: <http://what-when-how.com/neuroscience/brainstem-iii-the-midbrain-organization-of-the-central-nervous-system-part-1/>. (Accessed: 5th April 2019).
37. Yıldırım, M. Temel Nöroanatomi. 1. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri (2000): 101-106.
38. Zatoński, W. A., Mańczuk, M. & Pons, K. POLish-Norwegian Study (PONS): research on chronic non-communicable diseases in European high risk countries – study design. 18, 270–272 (2011).
39. Dere F. Nöroloji Atlası ve Ders Kitabı. 3.cilt, 3.baskı, Adana: Nobel Tıp Kitabevi, 2000: s.11-243.
40. Brainstem II: Pons and Cerebellum Part 2. Available at: <http://what-when-how.com/neuroscience/brainstem-ii-pons-and-cerebellum-part-2/>. (Accessed: 10th April 2019).
41. D’Agostino, G., Lyons, D.J., Cristiano, C., Burke, L.K., Madara, J.C., Campbell, J.N., Garcia, A.P., Land, B.B., Lowell, B.B., Dileone, R.J., and Heisler, L.K. *et al.* Appetite controlled by a cholecystokinin nucleus of the solitary tract to hypothalamus neurocircuit. *Elife* 5, 1–15 (2016).
42. Dong HW. Allen reference atlas : a digital color brain atlas of the C57Black/6J male mouse. Hoboken, N.J.: Wiley; 2008. ix, 366 p. p.
43. Moret, C. The importance of norepinephrine in depression. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 7, 9–13 (2011).

44. Martin, G.E., and Myers, R. D. Evoked release of [14C] norepinephrine from the rat hypothalamus during feeding. *Am. J. Physiol.* 229, 1547–1555 (1975).
45. Leibowitz SF, Jhanwar-Uniyal M, Dvorkin B, M. M. Distribution of α -adrenergic, β -adrenergic and dopaminergic receptors in discrete hypothalamic areas of rat. *Brain Res.* 233, 97–114 (1982).
46. Leibowitz, S. F. Adrenergic stimulation of the paraventricular nucleus and its effects on ingestive behavior as a function of drug dose and time of injection in the light-dark cycle. *Brain Res. Bull.* 3, 357–363 (1978).
47. McEwen, B. S., Mckittrick, C. R., Tamashiro, K. L. K., Sakai, R. R. & Sciences, B. The Brain on Stress: Insight from Studies Using the Visible Burrow System. *HHS Public Access* 47–56 (2016).
48. Leonard B.E. Noradrenaline in basic models of depression. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 7, (Suppl 1):11-16 (1997).
49. K. H. Berecek, and M. J. B. Evidence for a neurotransmitter role for epinephrine derived from the adrenal medulla. *Am. J. Physiology* 242, H593-601 (1982).
50. Sternson, S. M., Atasoy, D., Betley, J. N., Henry, F. E. & Xu, S. Review An Emerging Technology Framework for the Neurobiology of Appetite. *Cell Metab.* 23, 234–253 (2016).
51. Boyden, E.S., Zhang. F., Bamberg. E., Nagel. G., and Deisseroth, K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat. Neurosci.* 8, 1263–1268 (2005).
52. Petreanu L, Huber D, Sobczyk A, S. K. . Channelrhodopsin-2–assisted circuit mapping of long-range callosal projections. *Nat. Neurosci.* 10, 663–

668 (2007).

53. Aponte, Y., Atasoy, D., and Sternson, S.M. AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nat. Neurosci.* 14, 351-355 (2011)
54. Atasoy, D., Betley, J.N., Su, H.H., and Sternson, S.M. Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature* 488, 172-177 (2012).
55. Begg, D. P. & Woods, S. C. The endocrinology of food intake. *Nat. Rev. Endocrinol.* 9, 584 (2013).
56. Ulrich-lai, Y. M. et al. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *Am. J. Physiology Endocrinol. Metab.* 291, E965–973 (2006).
57. Brick J, E. C. *Drugs, the Brain, and Behavior: the Pharmacology of Abuse and Dependence.* *New York Haworth Med. Press* 3, (2000).
58. Dalery JM, Kopp N. *An introduction to neurotransmission in health and disease.* Oxford, England, Oxford University Press, s.278-294 (1990).
59. Wellman, P.J. Norepinephrine and the control of food intake. *Nutrition* 16, 837-842 (2000).
60. Prut I, B. C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 3–33 (2003).
61. Carobrez AP, B. L. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 1193–1205 (2005).

9. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İmü-Hadyek) Kararı

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
11/01/2019	01		Doç. Dr. Bilal Ersen KERMAN

“Beyin Sapı ve Hipotalamus Arasındaki Katekolaminerjik Bağlantının Davranışsal Rolünün İncelenmesi” başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “Oybirliği” ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 12 ay

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Turan DEMİRCAN	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Sultan Sibel ERDEM	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Mehmet OZANSOY	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Uzm.Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Fahriye ŞENBAHÇE	



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.24151
Konu : Etik Kurulu Kararı

05/07/2019

Sayın Gizem FİLİZ

Üniversitemiz Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu 14/01/2019 tarihli 01 karar no ile onay verilen “Beyin Sapı ve Hipotalamus Arasındaki Katekolaminerjik Bağlantının Davranışsal Rolünün İncelenmesi” isimli çalışmanızın danışman hocası “Doç. Dr. Bilal Ersen KERMAN” yerine “Dr. Muhammed İkbâl ALP” in olması hususunda isteğiniz uygun bulunmuş olup kayıt altına alınmıştır.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK
Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu
(İMÜ-HADYЕК) Başkanı

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 05.07.2019 tarihinde e-imzalanmıştır. Evrağımızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 73C68370XF kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi

Kavaçık Mah. Ekinciler Cad. No.19 Kavaçık Kavşağı - Beykoz
34810 İstanbul

Tel: 444 85 44
İnternet: www.medipol.edu.tr
Ayrıntılı Bilgi İçin : bilgi@medipol.edu.tr

10. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Gizem	Soyadı	FİLİZ
------------	-------	---------------	-------

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	Bülent Ecevit Üniversitesi Moleküler Biyoloji Ve Genetik	2017
Lise	Zonguldak Başöğretmen Atatürk Anadolu Lisesi	2012

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl – Yıl)

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	iyi	iyi	iyi

	Sayısal	Eşit ağırlık	Sözel
ALES Puanı	70,00	68,00	65,15
TOEFL IBT Puanı			

