



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ARKABEYİN KATEKOLAMİNERJİK NÖRONLARININ
HİPOTALAMUS İLE İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

İLKNUR ÇOBAN

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. DENİZ ATASOY

İSTANBUL-2018

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()
Anabilim Dalı : Sinirbilim
Tez Sahibi : İlknur ÇOBAN
Tez Başlığı : Arkabeyin Katekolaminerjik Nöronlarının Hipotalamus İle İlişkisinin İncelenmesi
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kavacık Yerleşkesi
Sınav Tarihi : 25.06.2018

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

Danışman

Doç.Dr.Deniz ATASOY

Kurumu

İstanbul Medipol Üniversitesi

İmza



Sınav Jüri Üyeleri

Prof.Dr.Ertuğrul KILIÇ

İstanbul Medipol Üniversitesi



Prof.Dr.Bayram YILMAZ

Yeditepe Üniversitesi



Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 26./06./2018 tarih ve 2018/.../25 - 13 sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



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.

İLKNUR ÇOBAN



TEŞEKKÜR

Ekibinde bulunmamı sağlayarak bu çalışmamı ve daha fazlasını yapmama olanak sağlayan, bilgi birikimini, yardımseverliğini ve sabrını esirgemeyen, akademi içerisindeki anlayış ve bakış açımın gelişmesini sağlayan sevgili danışmanım Doç. Dr. Deniz Atasoy'a,

Bu çalışmamın her aşamasında yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen sevgili ekibim Dr. Nilüfer Atasoy, Pelin Dilsiz, Merve Öncül, Özge Başer, Özlem Mutlu, Tayfun Ateş, İltan Aklan, Eşref Çelik, Edanur Ateş, İskalen Topçu ve Utku Soğukpınar'a,

Lisans eğitimime başladığım ilk günden bu yana yardımını asla esirgemeyen, asla sahip olamadığım ablam olarak maddi ve manevi her zaman yanımda olan ve sahip olduğu tüm tecrübesiyle bana yol gösteren Bircan Çoban'a,

Bu çalışma boyunca geçirdiğim tüm zorlu süreçlerde her zaman maddi ve manevi desteğini esirgmeden yanımda olup hem kişisel hem bilimsel farkındalığımı artıran ve sahip olduğu her şeyi benimle paylaşan sevgili arkadaşım Tuba Oğuz'a,

Sunduğu imkanlar sayesinde bu çalışmamı yapmamı sağlayan araştırma merkezimiz REMER'e,

Hayatım boyunca her zaman desteklemiş, aldığım her karara saygı duymuş sevgili annem Emine Çoban, babam Ayhan Çoban, kardeşlerim Sema Çoban ve Onur Çoban'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
RESİMLER LİSTESİ	viii
TABLOLAR LİSTESİ.....	ix
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER	4
4.1. Arkabeyin.....	4
4.1.1. Miyelensefalon: Medulla oblongata.....	5
4.1.1. Metensefalon: Pons ve Serebellum	7
4.2. Katekolaminler.....	11
4.2.1. Dopamin.....	12
4.2.2. Norepinefrin (Noradrenalin)	13
4.2.3. Epinefrin (Adrenalin).....	13
4.2.4. Katekolaminlerin Özellikleri.....	13
5. METOT VE MATERYAL	15
5.1. Materyal.....	15
5.2. Metot	18
5.2.1. Deney hayvanları	18
5.2.2. Genotipleme.....	19
5.2.2.1. DNA eldesi	19
5.2.2.3. Agaroz jel elektroforezi ve görüntüleme	21
5.2.3. Rekombinant adeno-asosiyе virüs üretme	21
5.2.3.1. Plazmit DNA eldesi	21
5.2.3.2. DNA izolesi	22
5.2.3.4 Pürifikasyon.....	22
5.2.4. İntrakraniyal rekombinant adeno asosiyе virüs enjeksiyonu.....	23

5.2.5. Doku fiksasyonu ve beyin kesitlerinin eldesi	25
5.2.6. İmmünohistokimyasal antikor boyaması	25
5.2.7. Mikroskopik görüntüleme ve analiz	25
5.2.8. Elektrofizyoloji	26
5.2.9. İstatistiksel analizler	27
6. BULGULAR	28
6.1. Deney Grupları ve Genotipleme.....	28
6.2. NTS – Hipotalamus Bağlantısının Gösterilmesi	28
6.3. NTS – PVN Bağlantısının Elektrofizyolojik Açıdan İncelenmesi	31
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	34
8. KAYNAKLAR	36
9. ETİK KURUL ONAYI.....	38
10. ÖZGEÇMİŞ	39

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

Semboller	Açıklamalar
A/P	Anterior/Posterior
AAV	Adeno-Asosiye Virüs
CNO	Clozapine-N-Oxide
Cre	Causes of Recombination
D/V	Dorsal/Ventral
DREADD	Dizayn Edilmiş İlaçları Aktive Eden Dizayn Edilmiş Reseptörler
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EtOH	Etil Alkol
FLEX	Flip-Excision
GFP	Yeşil Floresan Protein
HCl	Hidroklorik Asit
KCl	Potasyum Klorür
NTS	Nucleus of Solitary Tract
Lox	Locus of Crossing
M/L	Medial/Lateral
TH	Tirosin Hidroksilaz
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
NE	Norepinefrin
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFA	Paraformaldehit
TH-cre	TH transgenik faresi
rAAV	Rekombinant Adeno-Asosiye Virüs
TAE	Tris-Asetat-EDTA
i.p.	Intraperitoneal
aCSF	Yapay Beyin Omurilik Sıvısı
NaHCO ₃	Sodyum Bikarbonat
NaHPO ₄	Sodyum Fosfat

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1 Arkabeynin şematik gösterimi.....	4
Şekil 4.2 Ponsta bulunan büyük nükleus gruplarının şematik gösterimi.....	8
Şekil 4.3 Serebellumun şematik gösterimi.....	11
Şekil 4.4 Katekolaminlerin biyosentezi.....	12
Şekil 6.1.1 Paraventriküler hipotalamus bölgesinden 10 Hz ile alınan cell-attached kayıtları.....	31
Şekil 6.1.2 Paraventriküler hipotalamus bölgesinden 10 Hz ile alınan whole-cell kayıtları.....	32
Şekil 6.1.3 Paraventriküler hipotalamus bölgesinden 30 Hz ile alınan cell-attached kayıtları.....	32
Şekil 6.1.4 Paraventriküler hipotalamus bölgesinden 30 Hz ile alınan whole-cell kayıtları.....	33
Şekil 6.1.5 Paraventriküler hipotalamus bölgesinden aç farede 30 Hz ile alınan whole-cell kayıtları.....	33

RESİMLER LİSTESİ

Resim 4.1 İnsan medullasının çaprazlama yaptığı seviyedeki kesitin görüntüsü....	5
Resim 4.2 İnsan medullasının Medial lemniscus seviyesindeki kesitin görüntüsü.....	6
Resim 4.3 Merkez medulla.....	6
Resim 4.4 Yukarı medulla.....	7
Resim 4.5 Kaudal pons.....	9
Resim 4.6 Orta pons.....	10
Resim 4.7 Rostral pons.....	10
Resim 6.1 NTS bölgesine yapılan rAAV-FLEX-tdTomato virüsü enjeksiyonu.....	28
Resim 6.2 Hipotalamusta Arkuat ve Paraventriküler çekirdeğe gelen NTS projeksiyonu.....	29
Resim 6.3 Hipotalamusta Dorsomedial ve Lateral hipotalamusa gelen NTS projeksiyonu.....	30

TABLolar LİSTESİ

Tablo 5.1.1. Deneylerde Kullanılan Malzemeler.....	15
Tablo 5.1.2. Deneylerde Kullanılan Gereçler ve Cihazlar.....	16
Tablo 5.2.2.2.1. Kontrol PCR karışımı.....	19
Tablo 5.2.2.2.2. Transgenik PCR karışımı.....	20
Tablo 5.2.2.2.1. Kontrol PCR karışımı.....	20
Tablo 5.2.2.2.3. Transgenik PCR karışımı.....	20
Tablo 5.2.3.4.1. Gradient çözeltileri.....	23



1. ÖZET

ARKABEYİN KATEKOLAMİNERJİK NÖRONLARININ HİPOTALAMUS İLE İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

Nükleus Traktus Solitarius (NTS) bölgesi vücudun iç dengesini sağlamada anahtar bir role sahiptir. Beynin, arka beyin bölgesinin beyin sapı kısmında bulunur. İçerdiği nöronal alt popülasyonlar, stres, kan şekeri, enerji düzenlenmesi gibi fizyolojik olarak önemli düzenlemeler yapar. Homeostasisin sağlanmasında anahtar role sahiptir. Aynı zamanda hayatta kalmamızı sağlar. Bu sebeple anatomik haritalama ve patch clamp yöntemi ile bu bölgenin hipotalamus üzerindeki bir etkisi olup olmadığını araştırdık. Hipotalamus bölgesi de yaşamımızı sürdürmemiz için gereken fonksiyonların kontrol edildiği merkezdir. Beyin sapına gelen bilgiye burada cevap oluşturulur. Bu cevap hormonal mekanizmalar ile vücutta gerekli organlara iletilir. Nükleus Traktus Solitarius bölgesinden hipotalamus bölgesine yoğun derecede akson gelirken (paraventriküler hipotalamus, lateral hipotalamus, arkuat nükleus, dorsomedial hipotalamus) bu aksonların özellikle paraventriküler hipotalamusta nasıl bir işlev gördüğüne baktık. Paraventriküler hipotalamus vücudun açlık-tokluk, iştah mekanizmalarını düzenleyen çok önemli bir merkezdir. Bu sebeple obezite tedavisinde potansiyeli yüksek bir hedef çekirdiktir. Nükleus Traktus Solitarius bölgesinden Paraventriküler hipotalamusa gelen aksonlardan aldığımız elektrofizyolojik kayıtlarımızda görülmüştür ki bu aksonlardan salınan norepinefrin burada nöromodülatör olarak düzenleme yapmaktadır. Katekolamin sınıfından bir nörotransmitter olan norepinefrinin merkezi sinir sistemi içerisindeki rolü büyüktür. Nükleus Traktus Solitarius bölgesinden Paraventriküler hipotalamusa gelen aksonlardan salınan norepinefrin, burada her bir nöron üzerinde etkisini artırıcı veya azaltıcı olarak değişik etkiler göstermektedir ($p<0.05$).

Anahtar Kelimeler: Nükleus Traktus Solitarius, Hipotalamus, Elektrofizyoloji, Anatomik Haritalama

2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN HYPOTHALAMUS AND HINDBRAIN CATECHOLAMINERGIC NEURONS

The Nucleus Traktus Solitarius (NTS) region plays a key role in maintaining the internal balance of the body. The NTS is located in the brain stem of the posterior cerebral region. The neuronal subpopulations are physiologically important role, such as stress, blood sugar, energy regulation. It has a key role in providing homeostasis. It also allows us to survive at the same time. For this reason, we investigated whether this region is an effect on the hypothalamus by anatomical mapping and patch clamp method. The hypothalamus region is also the center where the functions we need to maintain our life are controlled. The answer from the brain stem is generated here. This response is transmitted to the necessary organs in the body by hormonal mechanisms. We looked at how these axons particularly function in the paraventricular hypothalamus. The axons coming from the nucleus Traktus Solitarius region has a projection intensively to the hypothalamus region (paraventricular hypothalamus, lateral hypothalamus, arcuate nucleus, dorsomedial hypothalamus). Paraventricular hypothalamus is a very important center that regulates the hunger-toughness, appetite mechanisms of the body. For this reason, it attracts a high potential target in obesity treatment. Electrophysiological recordings from Nucleus Traktus Solitarius axons in the paraventricular hypothalamus show that norepinephrine released from these axons regulates as a neuromodulator here. The role of norepinephrine, a neurotransmitter from the catecholamine class, in the central nervous system is significant. These axons has a crucial effect on these neurons in Paraventricular hypothalamus, such as increasing and decreasing these neurons' activity ($p < 0,05$).

Key words: Nucleus of Solitary Tract, Hypothalamus, Electrophysiology, Projection Mapping

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Obezite, son yıllarda dünyada ve ülkemizde en önemli toplumsal sağlık problemleri arasına girmiş bulunmaktadır (1). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre, ülkemizde her altı kişiden birisi obez ve her iki kişiden birisi de fazla kilolu kategorisine girmektedir (2). Daha da endişe verici olan ise, gerekli tedbirler alınmadığı takdirde bu oranların önümüzdeki yıllarda daha da artacağı tahmin edilmesidir. Obezite, kişilerin yaşam kalitesini doğrudan etkilemekten öte, birçok farklı hastalığın görülme riskini de arttırarak ciddi sağlık problemlerine davetiye çıkarmaktadır. Bunların arasında kardiyovasküler rahatsızlıklar, diyabet ve kanser gibi mortalite riski yüksek hastalıklar bulunmaktadır (3). Üstelik diyet, egzersiz ve ilaca dayalı tedavi yöntemleri şu ana kadar beklenen etkiyi göstermekte başarısız kalmıştır. Beslenme ve enerji dengesini kontrol eden mekanizmalar hakkındaki son derece sınırlı olan bilimsel birikim, yeni tedavi yollarının aranmasının önündeki en büyük engellerden birini teşkil etmektedir. Dolayısıyla kısa vadede bu süreçlerin, yani açlık ve tokluğun ve bununla ilintili fizyolojik olayların vücut tarafından nasıl kontrol edildiğinin açığa kavuşturulması gerekmektedir (4).

Arka beyin bölgesi vücumuzdan gelen sinyalleri alan bölgeler içerir. Bunlardan en önemlisi de Nükleus Traktus Solitaria'dır (5). Bu bölge özellikle vücuttan gelen açlık ve tokluk sinyallerini alarak iştah üzerinde düzenleme yapar. Bu düzenleme beynin beslenme merkezi hipotalamus üzerinden gerçekleşir (6).

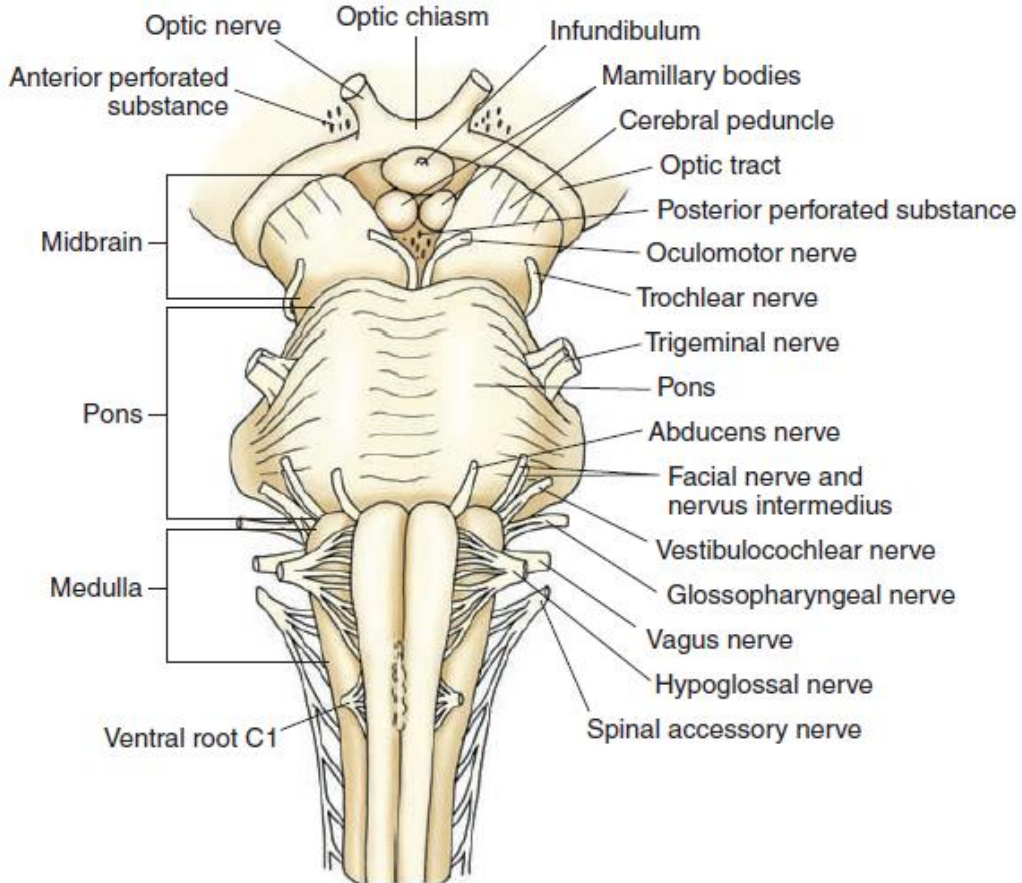
Bu sebeple NTS bölgesinin hipotalamus ile olan bağlantısının özelliklerini incelemek, obezite konusunda atılacak büyük bir adımdır. Bu devre üzerinde yapılabilecek manipülasyonlar bu hastalığın ve obezite gibi diyabet ve yeme bozukluklarının tedavisinde büyük rol oynayacaktır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Arkabeyin

Arka beyin, içerisinde medulla oblongatayı, ponsu ve serebellumu barındıran ve beyin ile omurilik arasında köprü görevi gören bir beyin bölgesidir. Aynı zamanda rombensefalon adıyla da bilinen bu bölge embriyonik gelişim döneminden sonra adını arka beyin olarak alır (7).

Arka beyin gelişimsel olarak iki ana bölge içerir; miyelensefalon (ki medulla buradan gelişir.) ve metensefalon (pons ve serebellum bölgelerinin geliştiği kısımdır). 500 milyon yıllık eski fosiller ve çenesiz balıklardan bu yana arka beyin bütün omurgalı canlılarda aynı gelişimi içerir. Nadir arka beyin hastalık türlerinden biri olan Rhombencephalosynapsis, kaynaşmış bir beyincik ile sonuçlanan bir hastalıktır. Hastalar genel olarak serebellar ataksi geçirirler (8).

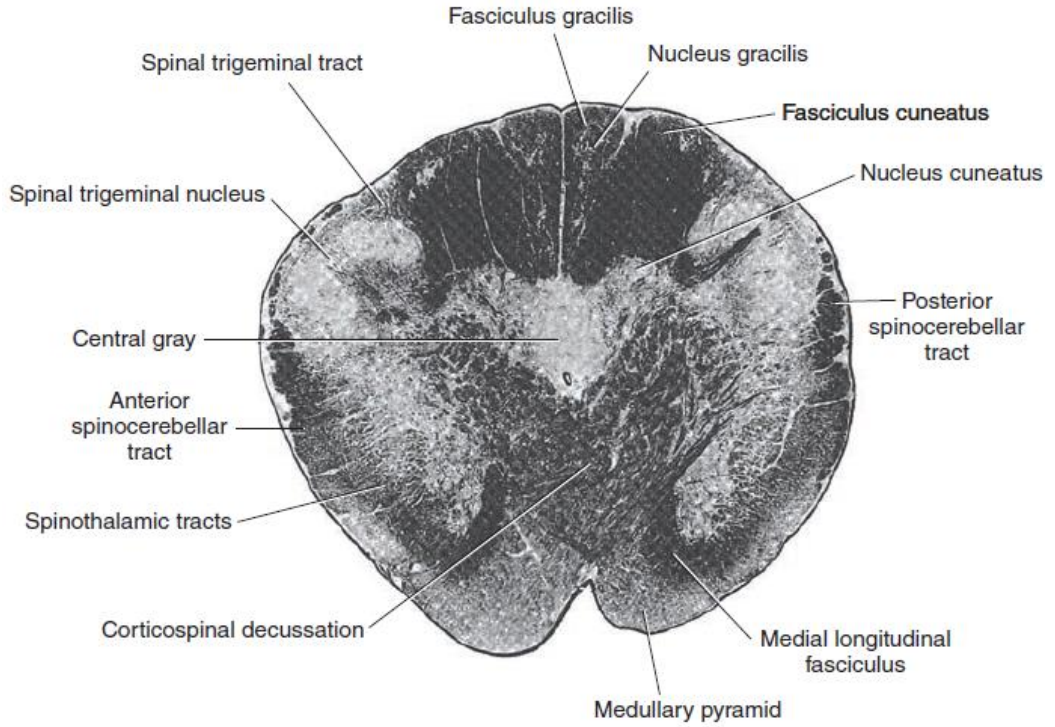


Şekil 4.1 Arkabeynin şematik gösterimi.

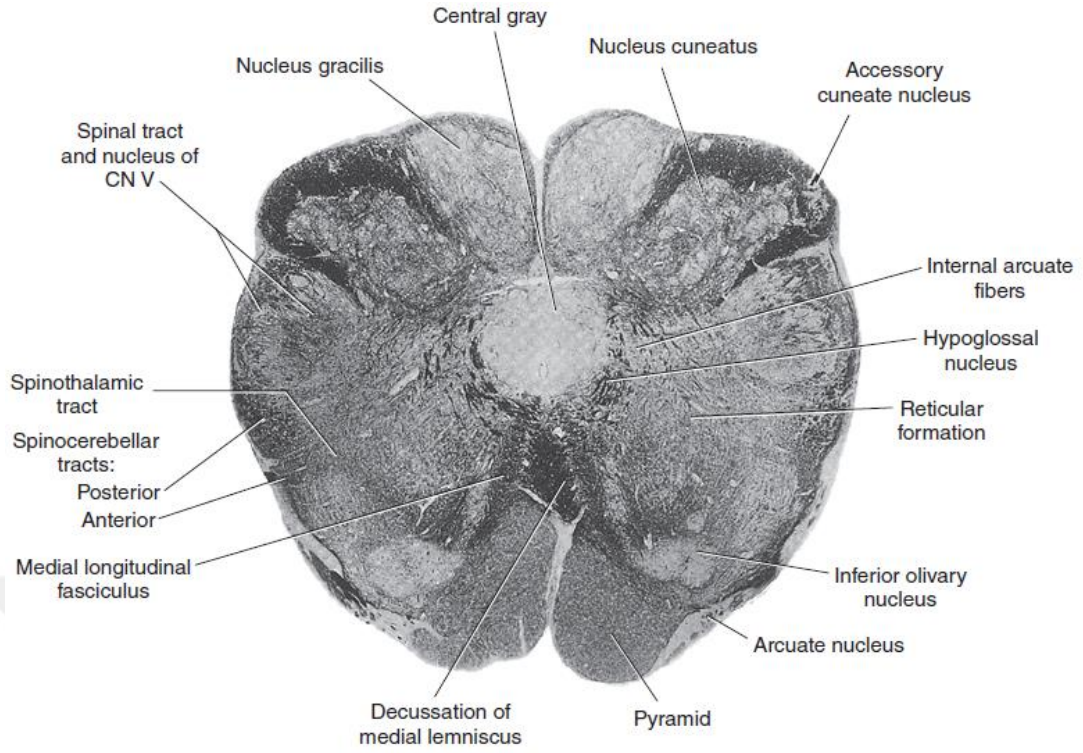
4.1.1. Miyelensefalon: Medulla oblongata

Miyelensefalon genel olarak Medulla yerine kullanılan, beynin alt birimlerinden biridir. Beyin sapının omurilik ile birleştiği kısımdır. Duyusal ve motor kontrolü sağlayan pek çok küçük çekirdek içerir. Bu çekirdekler kardiyak, solunum, kusma ve kasılma merkezleridir ve nefes alma, kalp ritmi ve kan basıncı gibi otonom davranışlar ile öksürme, hapşırma, yutma, kusma gibi temel refleksleri kontrol ederler (9).

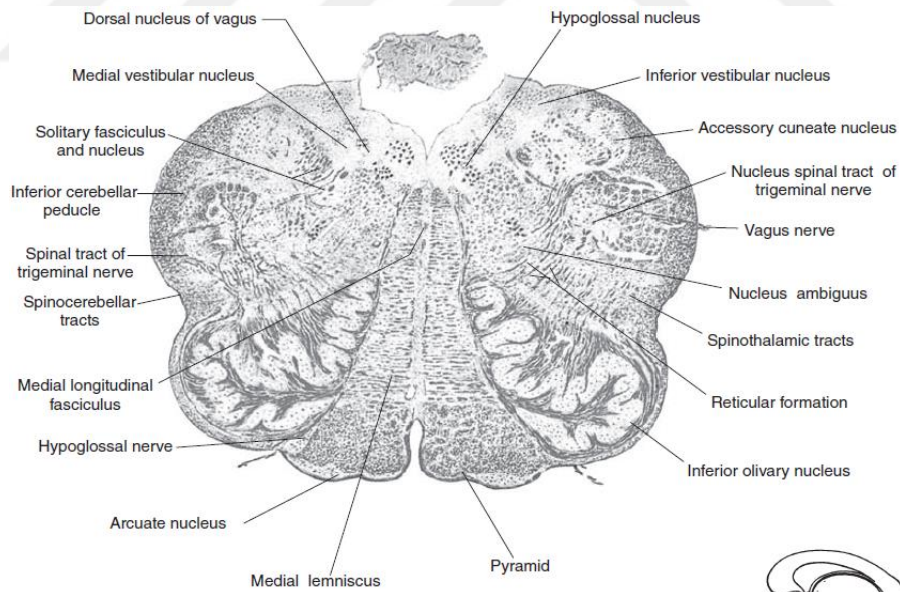
Miyelensefalon aynı zamanda dördüncü ventrikülün bir kısmını, glossofarinjal siniri, vagus sinirini, hipoglossal siniri, yardımcı siniri ve vestibulokohlear sinirin bir kısmını içerir. Tüm bu önemli merkezleri bulundurması nedeniyle, herhangi bir travma aldığı anda organizmanın hayatta kalması açısından son derece zararlı sonuçlara sebep olabilir (10).



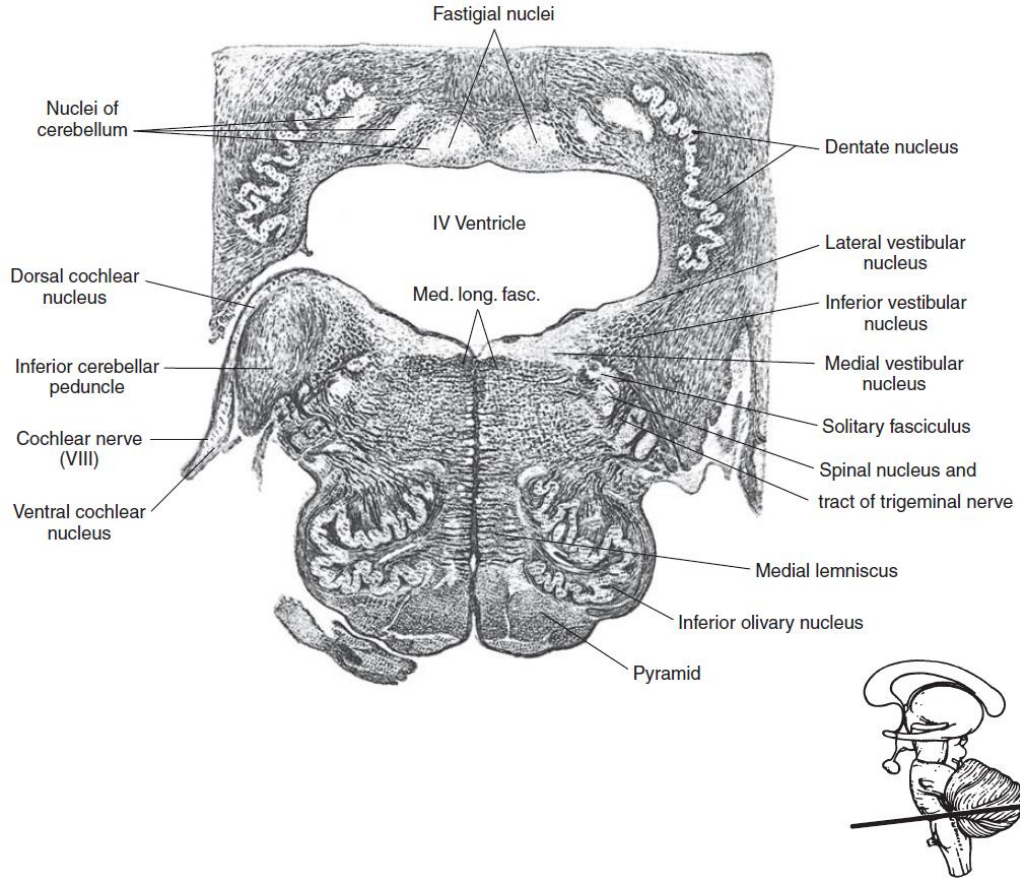
Resim 4.1 İnsan medullasının çaprazlama yaptığı seviyedeki kesitinin görüntüsü.



Resim 4.2 İnsan medullasının Medial lemniscus seviyesindeki kesitinin görüntüsü.



Resim 4.3 Merkez medulla.



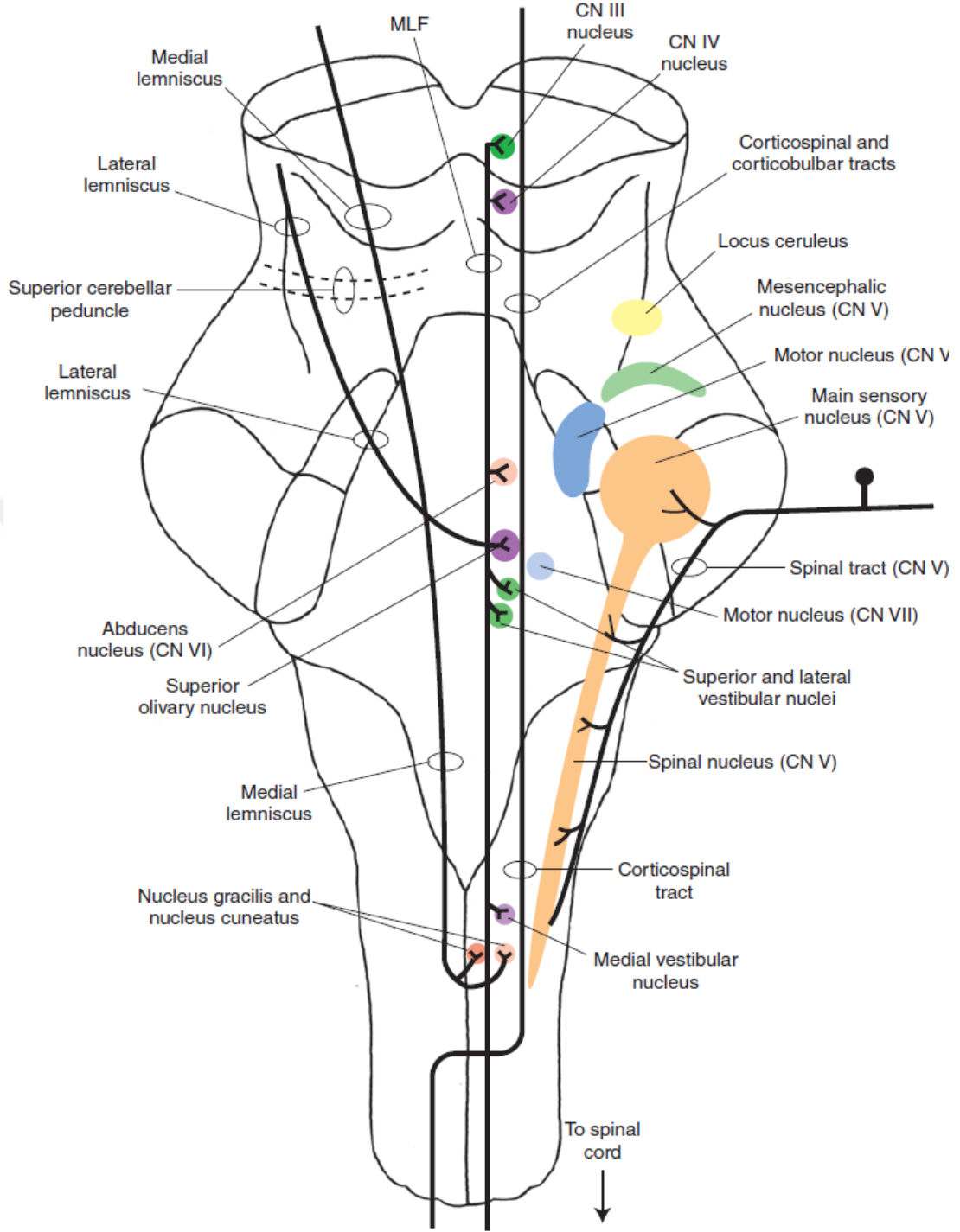
Resim 4.4 Yukarı medulla.

4.1.1. Metensefalon: Pons ve Serebellum

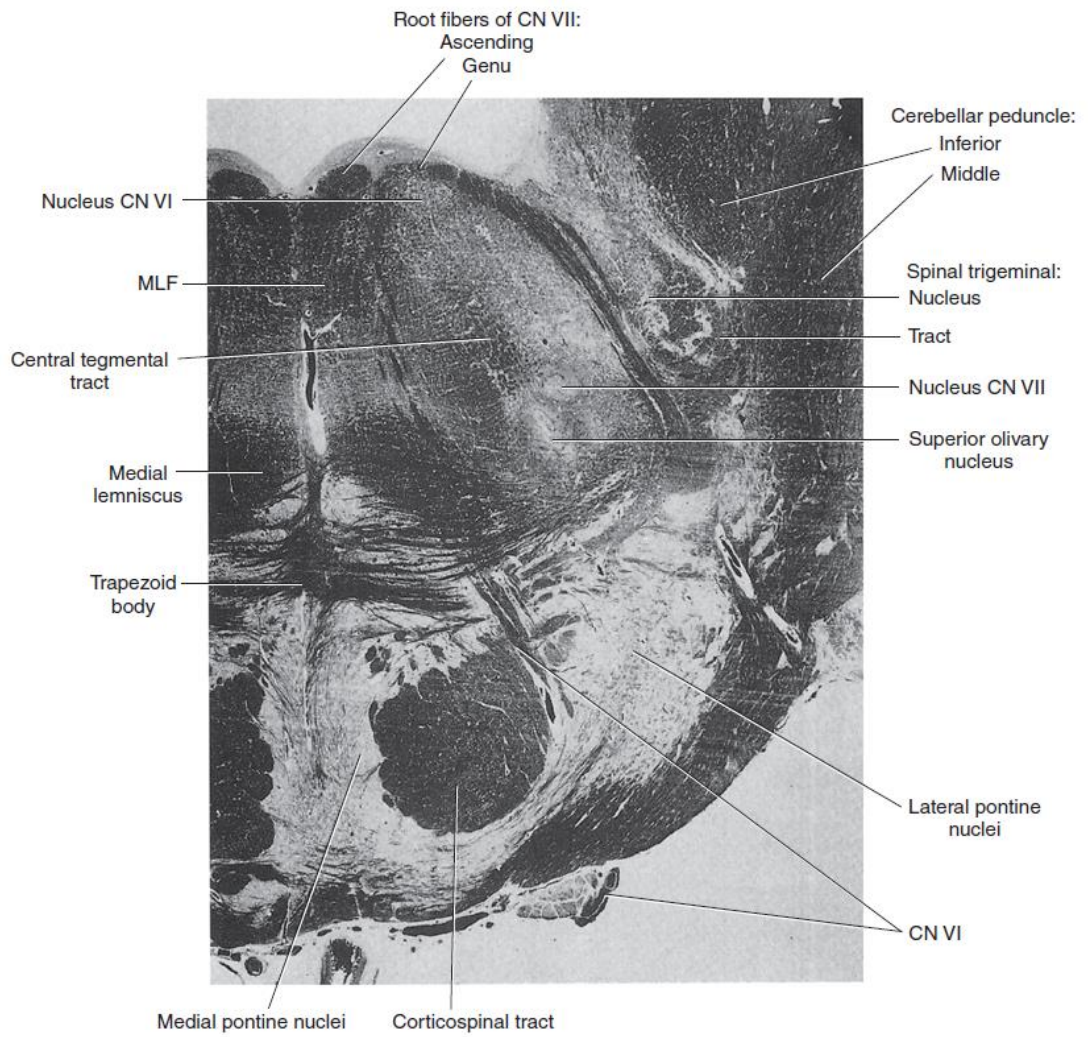
Metensefalon, pons ve serebellumu kapsayan gelişimsel bir karakterizasyon ifadesidir. Miyelensefalona benzer şekilde dördüncü ventrikülün bir kısmını, trigeminal siniri, abduzens sinirini, yüz sinirini ve aynı şekilde vestibulokohlear sinirin bir kısmını içerir (11).

Pons, medullanın hemen üzerinde uzanır ve uykuyu, solunumu, yutmayı, idrar kesesini, dengeyi, göz hareketlerini, yüz ifadelerini ve postürü kontrol etmeyi sağlayan çekirdekleri içerir (12).

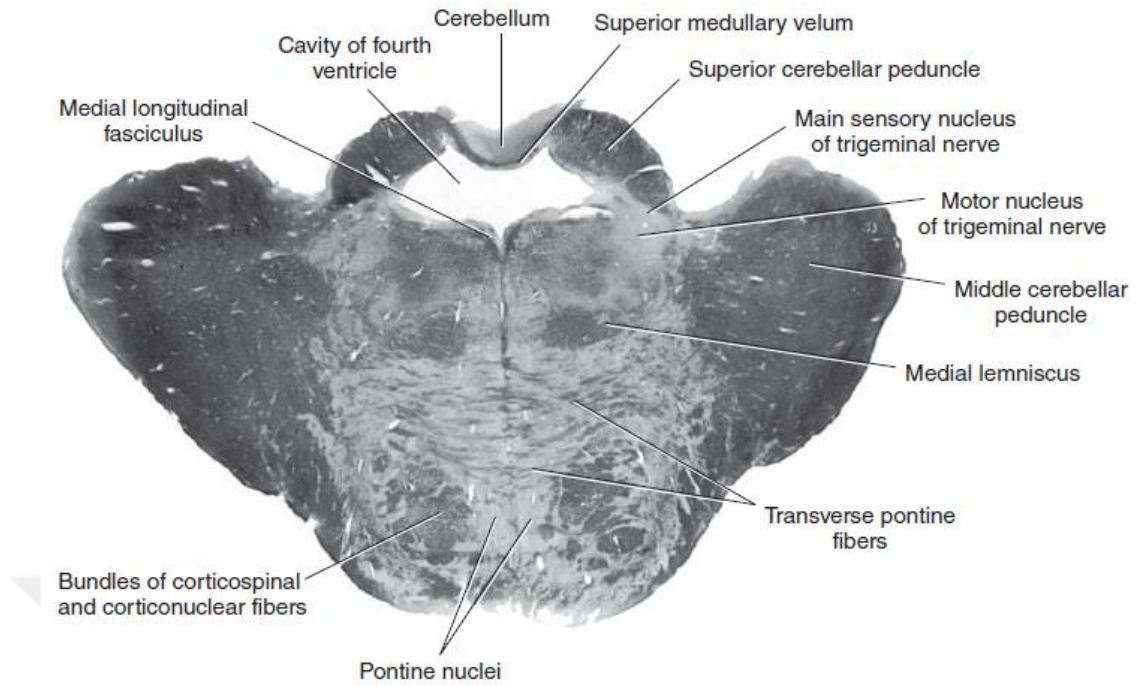
Serebellum, motor kontrolde önemli bir rol oynar. Aynı zamanda dikkat, dil, korku, haz gibi bilişsel işlevlerde de görev alsa da esasen hareket temelli fonksiyonların merkezidir. Serebellum hareketi başlatmaz ancak koordinasyon, hassasiyet ve zamanlamayı ayarlama büyük rol oynar (13).



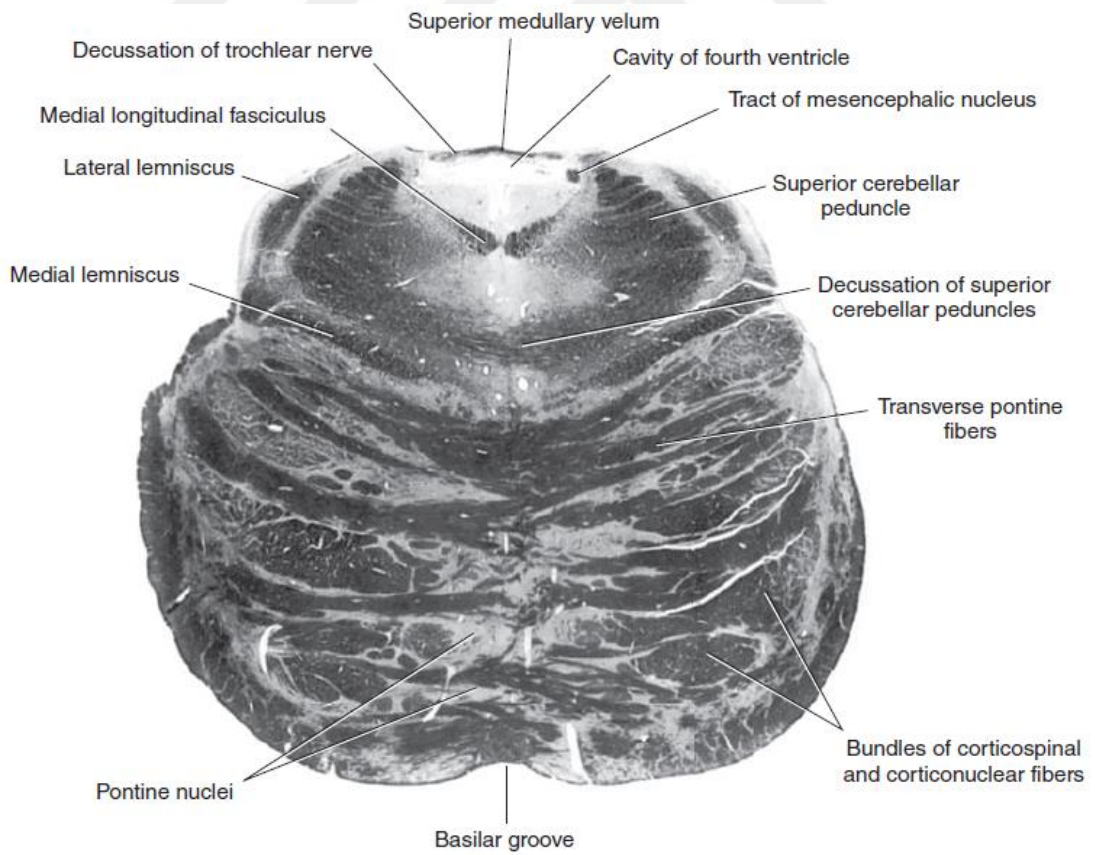
Şekil 4.2 Ponda bulunan büyük nükleus gruplarının şematik gösterimi.



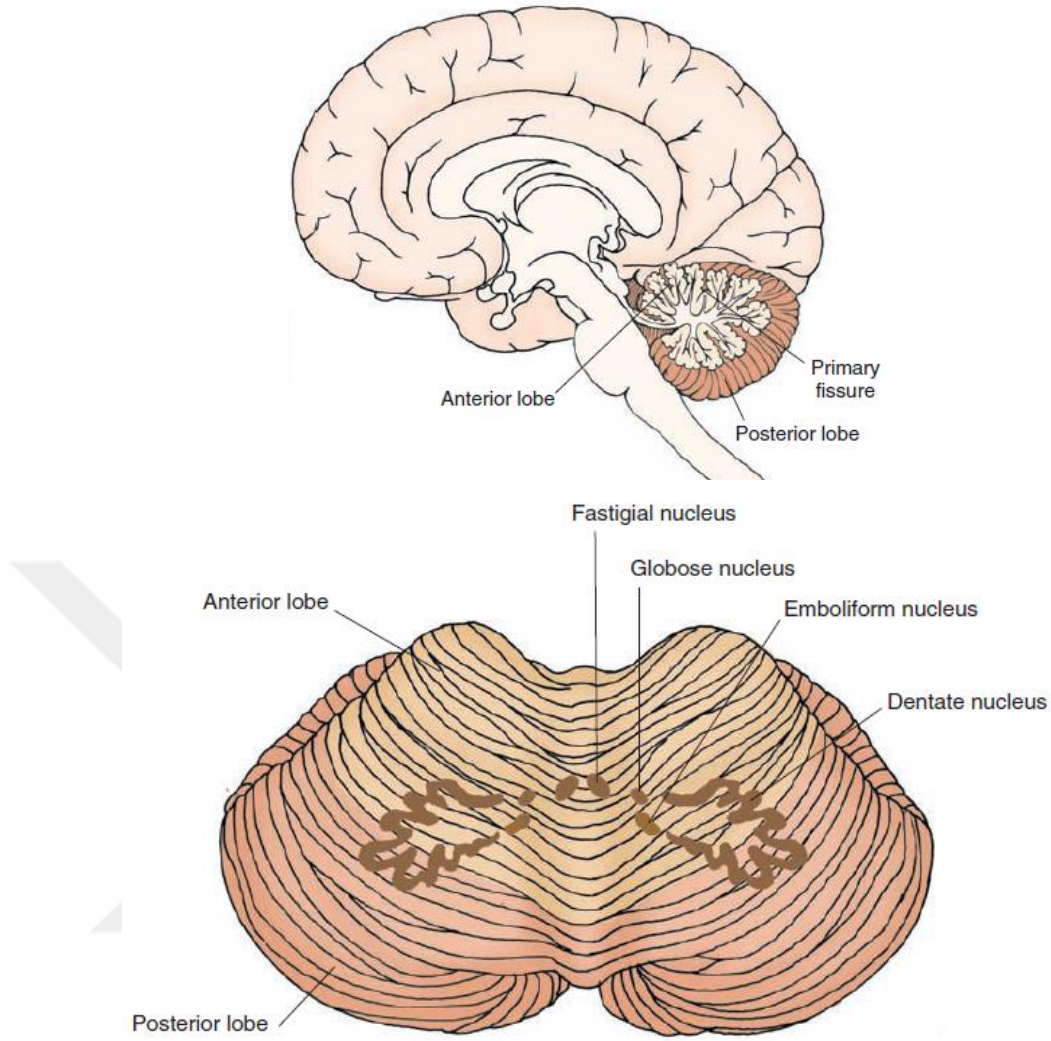
Resim 4.5 Kaudal pons



Resim 4.6 Orta pons



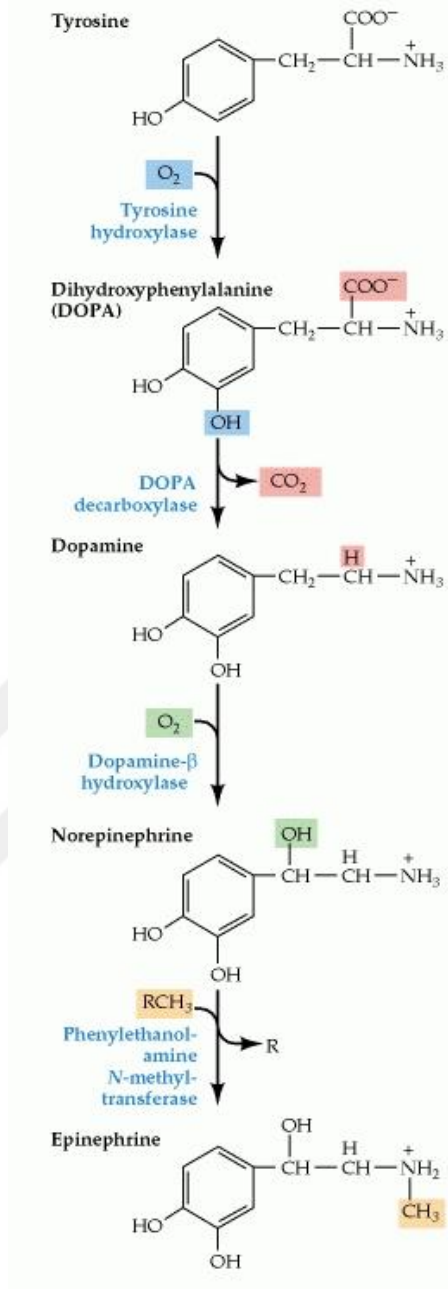
Resim 4.7 Rostral pons.



Şekil 4.3 Serebellumun şematik gösterimi.

4.2. Katekolaminler

Katekolaminler, biyogenik aminler sınıfında bulunan ve altında üç çeşidini barındıran nörotransmitterler sınıfıdır. Katekolamin ismi yapılarındaki Katekol halkasından gelir. Bütün katekolaminler Tirozin aminoasidinden türetilir. Katekolamin sentezindeki ilk adımda tirozin aminoasidi Tirozin hidroksilaz enzimi tarafından katalizlenerek Dihidroksifenilalanin (DOPA)'ya çevrilir. Çünkü tirozin hidroksilaz enzimi, her üç katekolamin nörotransmitteri için de hız sınırlayıcı faktör olarak görev alır. Bu enzimin varlığı beyinde katekolaminerjik nöronların belirlenmesinde önemli bir kriterdir (14).



Şekil 4.4 Katekolaminlerin biyosentezi

4.2.1. Dopamin

Dopamin, DOPA dekarboksilaz enzimi tarafından DOPA molekülünden üretilir. Beyinde birkaç bölgede bulunmasıyla birlikte dopamin içeren ana bölge beden hareketlerinin koordinasyonunu sağlayan ve Substantia nigradan büyük input alan Korpus striatumdur. Parkinson hastalığında substantia nigradaki dopaminerjik

nöronlar dejenere olur ve sonuç olarak motor hareketlerin fonksiyonlarının yitilmesine neden olur. Dopamin kan-beyin bariyerini geçemezken Levodopa kolaylıkla geçer. Dopamin aynı zamanda motivasyon, ödül ve kuvvetlendirme mekanizmalarında da yer alır (15).

4.2.2. Norepinefrin (Noradrenalin)

Norepinefrin, dopaminin Dopamin Beta-Hidroksilaz enzimi tarafından katalizlenmesiyle elde edilir. Dopamin veziküller tarafından adrenerjik terminallere taşınır. Burada norepinefrine çevrilir. Norepinefrin en çok simpatik ganglion hücreleri tarafından viseral motor sistemde salgılanır. Aynı zamanda merkezi sinir sisteminde Locus coeruleus başta olmak üzere beyin sapında bulunan merkezlerden de ön beyine projeksiyon yaparak salgılanır. Uyku, uyanıklık, dikkat ve beslenme davranışının sürdürülmesinde önemli rol oynar (16).

4.2.3. Epinefrin (Adrenalin)

Epinefrin, norepinefrinin Feniletanolamin-N-metiltransferaz enzimi ile katalizlenmesi sonucu oluşur. Beyin sapında rostral medullada iki grup olarak bulunan epinefrinin fonksiyonu henüz keşfedilmemiştir (17).

4.2.4. Katekolaminlerin Özellikleri

Katekolaminlerin yarılanma ömrü birkaç dakikadır. Ya Katekol-O-metiltransferaz'ların (COMT) metilasyon yapması sonucu ya da Monoamin oksidaz'ların (MAO) deaminasyon yapması sonucu degrade olurlar (18).

Epinefrin ve norepinefrin kendilerine ait spesifik reseptörlere bağlanarak işlevlerini yerine getirirler. Bu reseptörler adrenerjik reseptörler olarak adlandırılır ve alfa (α) ile beta (β) olmak üzere iki gruba ayrılır. Bu reseptörler, kendi içlerindeki alt gruplarına göre hem uyarıcı hem de inhibe edici olabilir. α reseptörleri, α_1 ve α_2 adrenerjik reseptör olmak üzere ikiye; β reseptörleri ise β_1 , β_2 ve β_3 adrenerjik

reseptörleri olmak üzere üçe ayrılır. Norepinefrinin bu reseptörlere bağlanma afinitesi yüksek olduğu kadar epinefrinin de yüksektir (19).



5. METOT VE MATERYAL

5.1. Materyal

Tablo 5.1.1. Deneylerde Kullanılan Malzemeler

Biyolojik Materyaller ve Kimyasallar	Marka	Ürün Kodu
anti-TH primer antikoru	Abcam	ab112
anti-cFos primer antikoru	Cell Signaling	2250S
Keçi anti-Tavşan Immunoglobulin G Alexa-Fluor 488 ikincil antikor	Life Technologies	A11008
Keçi Serum	Sigma-Aldrich	G9023
OneShot Stbl-3 Kompetant <i>E. coli</i> hücre hattı	Life Technologies	C737303
PCR primerleri	Sentegen	
AAV plazmitleri	Addgene	
293AAV hücre hattı	Cell BioLabs	AAV-100
LB Agar	Biomatik	A8523-500G
LB Broth	Biomatik	A8523-500G
Sodyum Pirüvat ($C_3H_3NaO_3$)	Sigma-Aldrich	P5280
Ethanol	Sigma-Aldrich	46139
Glasiyal Asetik Asit	Sigma-Aldrich	537020
Agaroz	Sigma-Aldrich	A9539
Glutamax-I	Gibco	35050-061
Paraformaldehit	Sigma-Aldrich	15127
Sodyum Klorür (NaCl)	Sigma-Aldrich	S7653
Potasyum Klorür (KCl)	Sigma-Aldrich	P9541
Sodyum Fosfat (NaH_2PO_4)	Sigma-Aldrich	S8282
Sodyum Bikarbonat ($NaHCO_3$)	Sigma-Aldrich	S6014
Magnezyum Klorür ($MgCl_2$)	Sigma-Aldrich	208337
Kalsiyum Klorür ($CaCl_2$)	Sigma-Aldrich	C1016
Fosfat Tamponlu Tuz (PBS)	Multicell	311-010-CL
Fenol Kırmızısı	Capricorn	600-070-IG
OptiPrep™ Density Gradient Medium	Sigma-Aldrich	D1556
Benzonase	Sigma-Aldrich	E8263
Trypsin (0,25%) in DPBS	Capricorn	CPTRY2B
DMEM High Glucose	Multicell	WS319005CL

Polyethylenimine Branched	Sigma-Aldrich	SG408727
EndoFree Plasmid maxi kit	Qiagen	12362
D-Sorbitol High Purity	Sigma-Aldrich	BMA2450
SafeView	Alfagen	G108
Gel Loading Dye Purple (6X)	NEB	B7024 S
Taq PCR Kit	NEB	E5000 S
Fluoromount Mounting Medium	Sigma-Aldrich	F4680
LMA Agaroz	Reducta	8060
Triton X-100	Sigma-Aldrich	X100
Trizma® HCl	Sigma-Aldrich	T3253
Opti-MEM Reduced Serum Medium	Life Technologies	51985-034
Sükroz	Sigma-Aldrich	0389
Dekstroz	Sigma-Aldrich	D9434
Sodyum Askorbat (C ₆ H ₇ NaO ₆)	Sigma-Aldrich	PHR1279

Tablo 5.1.2. Deneylerde Kullanılan Gereçler ve Cihazlar

Kullanılan Gereçler	Marka	Ürün Kodu
Lazer Diyot Fiber Işık Kaynağı	Doric Lenses	LDLFS_473/7
ChemiDoc™ MP System	BioRAD	
Çalkalayıcı	Benchmark Scientific	BR2000
dH ₂ O Cihazı	Millipore	ZRQSV8W
Ear Tag	Harvard Apparatus	52-4717
Eppendorf® LoBind Microcentrifuge Tube	Sigma-Aldrich	Z666505
Manyetik Karıştırıcı	Benchmark Scientific	H400HSB
Multi-Therm Shaker	Benchmark Scientific	H5000-HC
pH metre	Isolab	pH7110
PowerPac™ Universal Power Supply	BioRAD	1645070
Santrifüj	Orto Alsera	Biocen 22R
Spectrometre cihaz	BioRAD	
T100™ Thermal Cycler	BioRAD	1861096
Tartı	Ohaus Explorer	EX124-US
Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter	Millipore	UFC910024
OptiSeal Santrifüj Şişeleri	Thermo Scientific	7600302

MicroPunch	Harvard Apparatus	340140
Portatif Anestezi Cihazı	Beyza Medikal	
Micromotor	Istanbul Dis Deposu	
One-axis Oil Hydraulic Micromanipulator	Narishige	MO-10
Drummond Wiretrol™ II Kalibre Mikropipet	Minstar	
Peristaltik Pompa	Fisher Scientific	21-176-2A
Ultrasonikator	Bandelin Sonarex	
Vorteks	Benchmark Scientific	BV1000
Konfokal Mikroskop	Zeiss	LSM-780
Vibratom	Leica	VT1000S
Mikropipet Çekici	Sutter Instruments	P-1000
Ozmometre	Advance Instruments	3250
SliceScope Pro3000	Scientifica	Pro300
PatchStar Micromanipulator	Scientifica	
Motorised Moveable Top Plate	Scientifica	
PatchPad	Scientifica	
Programmable Perfusion System	Scientifica	
Monokrom Kamera	Watec Cameras	WAT-902H
Hava Kompresörü	Thor Labs	
Axon Digidata Digitizer	Molecular Devices	Model 1550
Multiclamp Amplifier	Molecular Devices	Model 700B
Programmable Pulse Stimulator	A.M.P.I	Master 9
pE Excitation System Main Unit	CoolLED	244-1400
pE Excitation System Remote POD	CoolLED	244-1500
Digital Storage Osiloskop	Tektronix	TDS2001C
Stereo Mikroskop	Zeiss	Discovery V8

5.2. Metot

Bu çalışmada, PCR yöntemi ile genotipleri belirlenmiş, TH-cre transgenik farelere intrakraniyal enjeksiyon ile farklı Rekombinant adeno asosiye virüsler verilmiş ve ifadeleneşmesi beklenmiştir. Beynin NTS bölgesine enjekte edilen ChR2-eYFP virüsünün akson uçlarına taşınmasının ardından PVN bölgesinden yama kısıkağı ile elektriksel aktivite ölçülmüştür. Channelrhodopsin yardımcı sinaptik haritalama adı verilen bu yöntem ile, NTS bölgesinden PVN bölgesine projeksiyon yapan TH nöronlarının, bu bölgedeki etkisi incelenmiştir. Çalışmanın diğere bir kolunda ise, TH-cre transgenik farelerinin, NTS veya LC bölgelerine FLEX-tdTomato virüsü enjekte edilmiş ve TH nöronlarında ifadeleneşmesi sağlanmıştır. Ardından, anti-TH antikoru ile immunohistokimyasal boyama yapılmıştır. Böylece, TH nöronlarının NTS bölgesi ve LC bölgesinden, ARC bölgesi ve PVN bölgesine yaptığı projeksiyonlar haritalandırılmıştır.

5.2.1. Deney hayvanları

Bu çalışma için, Jackson Laboratuvarı'ndan hemizigot B6.Cg-7630403G23RikTg(Th-cre)1Tmd/J transgenik fareleri getirilmiştir. TH-cre kısa adıyla bilinen bu transgenik fare ırkı, erkek transgenik fare ile dişi C57BL/6 yabanıl tip fareler veya dişi TH-cre fareler çaprazlanarak çoğaltılmıştır. Üretilen fareler, 3 ila 4 haftaya ulaştıklarında, anestezi altında kulaklarından alınan doku örnekleriyle genotiplenmiştir. Genotipleme sonucuna göre fareler dişi veya erkek, transgenik veya yabanıl tip olmak üzere ayrılmıştır. Deney grupları, genotipleme sonucuna göre TH-cre çıkan fareler ile oluşturulmuştur. Farelerin bakimi, çoğaltılması ve yürütölen deneyler İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırma Merkezi (MEDİTAM) bünyesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalar, İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İMÜ-HADYEK) tarafından onaylıdır.

5.2.2. Genotipleme

5.2.2.1. DNA eldesi

Üretilen fareler, 3 ila 4 hafta erişkinliğe ulaştıklarında genotiplendi. Kısa süreliğine anestezi altına alınan yavru farelerin bir kulağına üzerinde numaralar bulunan kulak küpesi takıldı. Yavruların diğer kulağından ise kulak delmek için kullanılan pens yardımıyla doku örneği alındı. Doku örnekleri içinde 75 µL 25mM NaOH/EDTA lizat çözeltisi bulunan 0,2 mL PCR tüplerine koyuldu. Ardından, T100™ Thermal Cycler PCR cihazında 98°C sıcaklıkta, 1 saat boyunca ısıtıldı. Isıtma suresinin sonunda tüplere 75 µL 40 mM Tris/HCl eklenmiştir. 4000 rpm hızında 3 dakika santrifüj edilip, DNA süpernatantta toplandı. Elde edilen DNA, yeni tüplere transfer edildi.

5.2.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Süpernatanttan toplanan DNA, aşağıda verilen malzemeler ile karıştırıldı ve ilgili PCR programına koyuldu. DNA örneklerine hem transgenik, hem kontrol primer çiftleriyle PCR yapıldı. DNA içermeyen, ancak diğer malzemeleri içeren bir tüp daha hazırlandı ve negatif kontrol olarak kullanıldı. Verilen oranlarda karıştırılan kimyasallar ve primerlerden sonra, tüplerin hacmi ddH₂O ile 12 µL'ye tamamlandı.

Tablo 5.2.2.2.1. Kontrol PCR karışımı

Malzeme	Final Konsantrasyonu
10X Reaksiyon tampon çözeltisi	1X
Kontrol ileri primer	0,5 µM
Kontrol geri primer	0,5 µM
dNTP Solüsyon Karışımı	200 µM
Taq Polimeraz enzimi	1,25 u/50 µl
DNA	
ddH ₂ O	

Tablo 5.2.2.2.2. Transgenik PCR karışımı

Malzeme	Final Konsantrasyonu
10X Reaksiyon tampon çözeltisi	1X
Transgenik ileri primer	0,5 μ M
Transgenik geri primer	0,5 μ M
dNTP Solüsyon Karışımı	200 μ M
Taq Polimeraz enzimi	1,25 u/50 μ l PCR
DNA	
ddH ₂ O	

TH-cre faresinin genotiplenmesi için gereken primerler Sentegen firmasından temin edildi. Bu genotipleme için, Tablo 5.2.2.2.3'te listelenen primerler, Jackson Laboratuvarları'ndan edinilen bilgiye göre dizayn edildi.

Tablo 5.2.2.2.3. TH-cre faresinin genotiplemesi için gereken primer dizileri

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

Yukarıda verilen oranlarda hazırlanan PCR karışımları, Tablo 5.2.2.2.4'te verilen PCR protokolüyle T100TM Thermal Cycler cihazına koyuldu.

Tablo 5.2.2.2.4. TH-cre faresinin genotiplemesi için gereken 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 görüntüleme

40 mM Tris, 20mM Glasiyal asetik asit, 1Mm pH:7,6 EDTA ile 1x TAE tampon çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltinin 100 µL'sine 3 g agaroz katıldı ve çözelti berrak bir hal alana kadar ısıtıldı. Şeffaflaşan çözeltiye 5µL Safeview eklendi. Elektroforez tankına döküldü ve soğumadan yükleme tarakları yerleştirildi. Çözelti, belli bir süre sonra soğumaya ve katılaşmaya başladı. Katı, jel kıvamına geldikten sonra üzeri 1x TAE tampon çözeltisi ile kaplandı. İlk kuyucuga 5 µL belirteç, diğer kuyucuklara ise 1 µL yükleme boyası ile karıştırılmış 9 µL PCR ürünü, sırasıyla yüklendi. 100V'da 25 dakika yürütüldü ve BioRAD ChemiDoc cihazında görüntülendi.

5.2.3. Rekombinant adeno-asosiye virüs üretme

Bu çalışmada kullanılacak rekombinant adeno-asosiye virüsleri üretmek için gereken pAAV-EF1a-double floxed-hChR2(H134R)-EYFP-WPRE-HGHpA ve pAAV-FLEX-tdTomato plazmitleri Addgene firmasından temin edildi. Bu plazmitler, kompetant Stb13 *E. Coli* transformasyonlu bakteri sürüntüsü halinde getirildi.

5.2.3.1. Plazmit DNA eldesi

LB agar çözeltisi 35 g/L oranında, LB sıvı besi yeri ise 20 g/L oranında hazırlandı ve otoklav cihazı ile sterilizasyonu yapıldı. Addgene firmasından temin edilen plazmitlerin ampisilin dirençli olması sebebiyle, LB agar çözeltisine, soğumasının ardından 100 µg/mL ampisilin koyuldu. LB ağarlar, 10 cm'lik polistiren petri kaplarına döküldü, soğutuldu ve jel haline getirildi. Addgene firmasından gelen plazmitlerden sürüntü alındı ve agara yayıldı. Gece boyu 37°C'de bekletilen petrilerde, bakteri koloni oluşumu gözlemlendi. Bakteriyel koloniler öze ile toplandı. Hazırlanan LB sıvı besi yerine transfer edildi. Kolonileri içeren sıvı besi yeri 37°C, 250 rpm koşullarında çalkalandı ve çoğalması için 18 saat beklendi. Bu süre diliminde bakteriler logaritmik olarak çoğaldı ve yeterli sayıya ulaştı. 4°C 6000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Bakteriler çökeltide toplandı, supernatant atıldı. Çökelti halindeki bakteriler -80°C'de donduruldu. Bu işlem, pAAV-EF1a-double

floxed-hChR2(H134R)-EYFP-WPRE-HGHpA, pAAV-FLEX-tdTomato, yardımcı vektör 2/1 ve yardımcı vektör helper olmak üzere 4 farklı plazmit için yapıldı.

5.2.3.2. DNA izolesi

-80°C’de dondurulan bakteriyel çökeltiler çözdürüldü. Kit protokolüne göre, Qiagen Endofree Plasmid Kit (Qiagen, 12362) ile DNA izolasyonu yapıldı. SpektraMax cihazı ile DNA konsantrasyonları ölçüldü.

5.2.3.3. 293AAV Hücre transfeksiyonu

293AAV hücre hattı (Cell BioLabs, AAV-100), rekombinant adeno asosiye virüs üretimi için özelleşmiş bir hücre hattıdır. Yaklaşık 10^6 civarında 293AAV hücresi 150 cmlik petri kaplarına ekildi. 37°C, %5 CO₂, %20 O₂ koşullarında inkübe edildi ve yaklaşık %80 doluluk oranına ulaşması için gereken zaman tanındı. Yeteri kadar hücre elde edildikten sonra, hücreler transfeksiyona hazır hale geldi. Transfeksiyon için 24 µg yardımcı vektör helper, 20 µg yardımcı vektör 2/1, 12 µg pAAV-EF1a-double floxed-hChR2(H134R)-EYFP-WPRE-HGHpA veya pAAV-FLEX-tdTomato, Opti-MEM transfeksiyon medyumunu ve transfeksiyonun gerçekleşmesi için gereken bir ajan olan polietilenimin karışımı hazırlandı ve hücrelerin üzerine katıldı. Hücreler, transfeksiyon karışımıyla birlikte 3 boyunca 37°C, %5 CO₂, %20 O₂ koşullarında inkübe edildi. Ardından hücreler toplandı, 4°C 1100 rpm koşullarında 5 dakika boyunca santrifüj edildi, çökeltiler -80°C’de donduruldu.

5.2.3.4 Pürifikasyon

-80°C’de dondurulan hücre çökeltisi, 150mM NaCl ve 20mM Tris pH 8,0 içeren çözeltinin 9 mL’si ile karıştırıldı. Hücreler 3’er defa, sırayla önce soğuğa (kuru buz ve %70 EtOH karışımı), ardından da sığağa (37°C sıcak su banyosu) maruz bırakıldı. Bu işlemin hemen ardından, hücreler 3 dakika sonikatore koyuldu ve hücrelerin içindeki virüsler açığa çıktı. Hem virüsleri, hem de hücre artıklarını içeren bu karışımı pürifiye etmek için, karışıma 1mM MgCl₂ ve 250 U/mL Benzonase (Sigma

E8263-25K) katıldı. 4°C 4000 rpm koşullarında 20 dakika santrifüj edildi. Gradient oluşturmak için Tablo 5.2.3.4.1’de verilen solüsyonlar hazırlandı.

Tablo 5.2.3.4.1. Gradient çözeltileri

Çözelti	İçeriği
%17’lik çözelti	5 mL 10x PBS, 0,05 mL 1M MgCl ₂ , 0,125 mL 1M KCl, 10 mL 5M NaCl, 12,5 mL Iodixanol ve 50 mL’ye kadar H ₂ O
%25’lik çözelti	5 mL 10x PBS, 0,05 mL 1M MgCl ₂ , 0,125 mL 1M KCl, 20 mL Iodixanol, 0,1 mL 0,5% fenol kırmızısı ve 50 mL’ye kadar H ₂ O
%40’lik çözelti	5mL 10x PBS, 0,05 mL 1 M MgCl ₂ , 0,125 mL 1 M KCl, 10 mL 5 M NaCl, 33,3 mL Iodixanol ve 50 mL’ye kadar H ₂ O
%60’lik çözelti	0,05 mL 1 M MgCl ₂ , 0,125ml 1 M KCl, 50 mL Iodixanol, 0,025 mL 0,5% fenol kırmızısı

Ultrasantrifüj için Optiseal tüplerine (Beckman 361625), şırınga ile sırayla 3 mL %60’lık çözelti, 5 mL %40’lık çözelti, 6 mL %25’lik çözelti, 6 mL %17’lik çözelti damla damla eklendi. En üste de hücre lizatı damlatıldı. Ultrasantrifüj cihazında 18°C’de 60000 rpm’de, 90 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonunda virüsler %40’lik çözeltilerde birikti. Diğer katmanlar ile karıştırmadan, şırınga ile %40’lik katman toplandı. Amicon 100K filtrelili tüpler (UFC910024, Millipore), 1 litresinde 100 mL 10x PBS, 50 g D-Sorbitol, 42,4 mL %5 NaCl bulunan saklama tampon çözeltisiyle muamele edilip santrifüj işlemine hazır hale getirildi. %40’lik katman filtrelili tüplere koyuldu ve 4°C 3500 rpm koşullarında 30 dakika boyunca santrifüj edildi. Üzerine 1x saklama tampon çözeltisi ekleyerek santrifüj etmek suretiyle, 2 defa tekrarlandı. Bu işlemler sonunda virüsler filtrenin üstünde birikti, toplandı ve -80°C’de donduruldu.

5.2.4. İntrakraniyal rekombinant adeno asosiy virüs enjeksiyonu

Genotiplenmeleri yapılan ve TH-cre olduğu belirlenen 4 ila 5 haftalık fareler, intrakraniyal virüs enjeksiyonu için stabil anestezi altında stereotaksik çerçeveye

yerleştirildi. İstenilen bölgeye enjeksiyon yapabilmek için kafatası düz ve sabit bir konuma getirildi. Betadin ile temizlenen kafa derisi, bisturiyle kesildi. Kafatasına az miktarda hidrojen peroksit sürüldü ve kemikler belirginleştirildi. Fazla hidrojen peroksit temizlendi. Koordinatların belirlenmesi ve intrakraniyal enjeksiyonun yapılması için SteREO Discovery V8 mikroskop kullanıldı. Narishige mikromanipulator aracılığıyla Bregma noktasına gelindi ve burası x ve y koordinatları için sıfır noktası olarak nitelendirildi. NTS için koordinat düzleminde Anterior/Posterior (A/P): -7,00 mm ve Medial/Lateral (M/L): $\pm 0,50$ mm noktasına, LC için ise koordinat düzleminde Anterior/Posterior (A/P): -5,00 mm ve Medial/Lateral (M/L): $\pm 0,70$ mm noktasına gelindi ve bu noktalarda freze ile kafatasında bir delik açıldı.

Sutter P-1000 Mikropipet puller cihazıyla intrakraniyal enjeksiyonlar için gereken cam mikropipetler hazırlandı. Bu cihaz, camı ısıyla inceltmek istenilen kalınlığa getirmektedir. Hazırlanan mikropipetlerin içine, kılcal pipetler ile mineral yağ koyuldu ve Narishige enjektöre yerleştirildi. Yağ içeren mikropipetlere dikkatlice rekombinant adeno asosiyale virüs çekildi. Beyin yüzeyinde z koordinatı sıfırlandı. Ardından NTS için beynin içinde Dorsal/Ventral (D/V): -3,00 mm, LC için ise Dorsal/Ventral (D/V): -3,10 mm olacak şekilde ilerlendi. Narishige enjektör yardımıyla bilateral olarak 100 nL enjeksiyon yapıldı. Virüsün dağılmasını sağlamak için yaklaşık 10 dakika, cam pipet beynin içindeyken beklendi. Pipetin beyinden çıkarılmasıyla, kafa derisi dikildi. Fareler transgen ifadenmesi ve post operatif sürenin tamamlanması için yaklaşık 2 hafta gözlem altında tutuldu.

rAAV-EF1a-double floxed-hChR2(H134R)-EYFP-WPRE-HGHpA enjekte edilmiş fareler channelrhodopsin yardımcı sinaptik haritalama, rAAV-FLEX-tdTomato enjekte edilmiş fareler ise doku fiksasyonu ve immunohistokimyasal boyama için kullanıldı.

5.2.5. Doku fiksasyonu ve beyin kesitlerinin eldesi

Transgen ifadesi ve post operatif bakım için gerek 2 haftalık süre sonrası, rAAV-FLEX-tdTomato enjekte edilmiş fareler anestezi altına alındı. Sırasıyla fosfat tamponlu tuz ve %4 paraformaldehit fiksatif (PFA) çözeltileri ile kardiyak perfuzyonları gerçekleştirildi. Fareler sakrifiye edildi ve beyinleri çıkarıldı. Beyinler, 4°C'de %4 PFA çözeltisi içinde yaklaşık 4 saat bekletildi. Ardından, gece boyu 4°C'de %30 sukroz çözeltisi içine aktarıldı. Beyinler VT1000S vibratomun kesme tankına yerleştirildi ve tankın için soğuk fosfat tamponlu tuz çözeltisiyle dolduruldu. 75 µm kalınlığında kesitler elde edildi.

5.2.6. Immünohistokimyasal antikor boyaması

rAAV-FLEX-tdTomato enjekte edilmiş farelerden toplanan beyin kesitleri arasında ARC, PVN ve NTS veya LC bölgelerini içerenler seçildi. 20 dakika boyunca fosfat tamponlu tuz çözeltisi ile yıkandı. Kesitler, 1x PBS'te 0,1% Triton-X-100 ve %15 keçi serumu içeren bloklama solüsyonu ile 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. Ardından, aynı solüsyon, içine 1:5000 anti-TH primer antikor (ab112, abcam) koyularak hazırlandı ve bloklama yapılan kesitlere eklendi. Negatif kontrol için ayrılan kesitlere, aynı solüsyon antikorsuz olarak koyuldu. Kesitler, gece boyunca primer antikor solüsyonu içinde 4°C'de çalkalandı. Ertesi gün, 3 kere 20'er fosfat tamponlu tuz çözeltisi ile yıkandı. 1x PBS'te 0,1% Triton-X-100 ve %15 keçi serumu içeren çözeltiye 1:500 oranında Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor® 488 (A-11008, Thermo Scientific) sekonder antikor koyuldu ve kesitlere eklendi. 1 saat oda sıcaklığında çalkalandıktan sonra yukarıda belirtilen yıkama işlemi tekrarlandı. Kesitler lamlara koyuldu, kurutuldu ve mounting medium eklenerek üstleri lamel ile kapatıldı.

5.2.7. Mikroskopik görüntüleme ve analiz

Immünohistokimya boyamasından sonra Zeiss LSM 780 Konfokal Mikroskop ile kesitlerin floresan görüntülemesi yapıldı. rAAV-FLEX-tdTomato virüs

ifadelenmesini görüntülemek için 568 nm, yeşil anti-TH antikorunun görüntülenmesi için ise 488 nm dalga boyu kullanıldı. Görüntüleme sonrası analizler ImageJ programında yapıldı.

5.2.8. Elektrofizyoloji

İntrakraniyal olarak rAAV-EF1a-double floxed-hChR2(H134R)-EYFP-WPRE-HGHpA enjekte edilmiş fareler, 2 ila 3 haftalık transgen ifadesi ve post operatif bakım sonrası sakrifiye edildi. 234 mM sukroz, 28 mM NaHCO₃, 7 mM dekstroz, 2,5 mM KCl, 7 mM MgCl₂, 0,5 mM CaCl₂, 1 mM sodyum askorbat, 3 mM sodyum purivat ve 1,25 mM NaH₂PO₄ ile kesme solüsyonu hazırlandı. Çıkarılan beyinler %95 O₂ / %5 CO₂ ile gazlanan soğuk kesme solüsyona aktarıldı. VT1000S vibratom ile hipotalamus bölgesini içeren 300 µm kalınlığında kesitler elde edildi. 119 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 11 mM dextrose, 2,5 mM KCl, 1,25 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂ ve 1,25 mM NaH₂PO₄ ile yapay beyin omurilik sıvısı hazırlandı ve %95 O₂ / %5 CO₂ ile gazlandı. Beyinler bu sıvıya koyuldu ve yaklaşık 30 dakika kadar, oda sıcaklığında inkube edildi. Ardından, kesitler kayıt alınacak bölüme yerleştirildi. 4-5 MΩ rezistansa sahip elektrotlar ile PVN ve ARC bölgelerinden hücre bağlı ve tam hücre yama kıskacı kayıtları alındı. Hücre bağlı kayıtlar için hücre-içi solüsyon olarak yapay beyin omurilik sıvısı kullanıldı. Tam hücre kayıtlarında ise, 145 mM potasyum glukonat, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 1,1 mM EGTA, 2 mM Mg-ATP, 0,5 mM Na₂-GTP ve 5 mM Na₂-fosfokreatin kullanarak hücre-içi solüsyon hazırlandı. Beyin kesitlerinde ChR2'e bağlı optogenetik stimülasyon için LED ışık kaynağı (Doric Lenses Inc., Quebec) kullanıldı. AMPI Master-9 Pulse Stimulator (Global Biotech Inc., Mount Laurel, NJ) cihazıyla 10 ms ve 10 Hz protokolü uygulandı. Verileri analiz etmek için MultiClamp 700B Amplifier (Molecular Devices, San Jose, CA) ve Axon™ pCLAMP™ 10.6 yazılımı (Molecular Devices, San Jose, CA) kullanıldı.

5.2.9. İstatistiksel analizler

Bu çalışmada yapılan deneylerin istatistiksel analizleri için GraphPad Prism (RRID:SCR_002798, GraphPad, San Diego, CA) programı kullanılmıştır. Elde edilen sonuçların anlamlılıkları, Student's t-test ile ölçülmüştür. Buna göre, $p < 0,05$; *, $p < 0,01$; **, $p < 0,001$; *** olarak değerlendirilirken, $p > 0,05$ durumunun istatistiksel olarak anlamsız olduğu nitelendirilmiştir. Sayısal değerler \pm standart hata cinsinden gösterilmiştir.



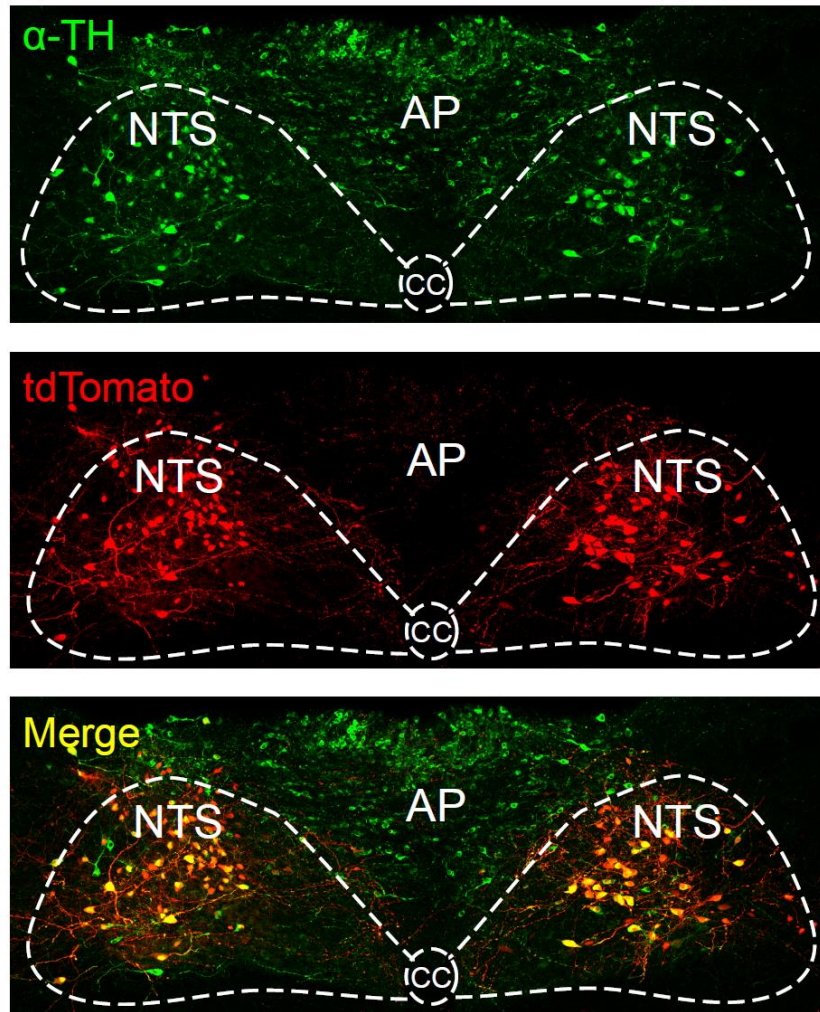
6. BULGULAR

6.1. Deney Grupları ve Genotipleme

Bu çalışmada 6 haftalık TH-cre transgenik fare kullanıldı. Genotipleme sonucuna göre transgenik olduğu belirlenen fareler deneye dahil edildi.

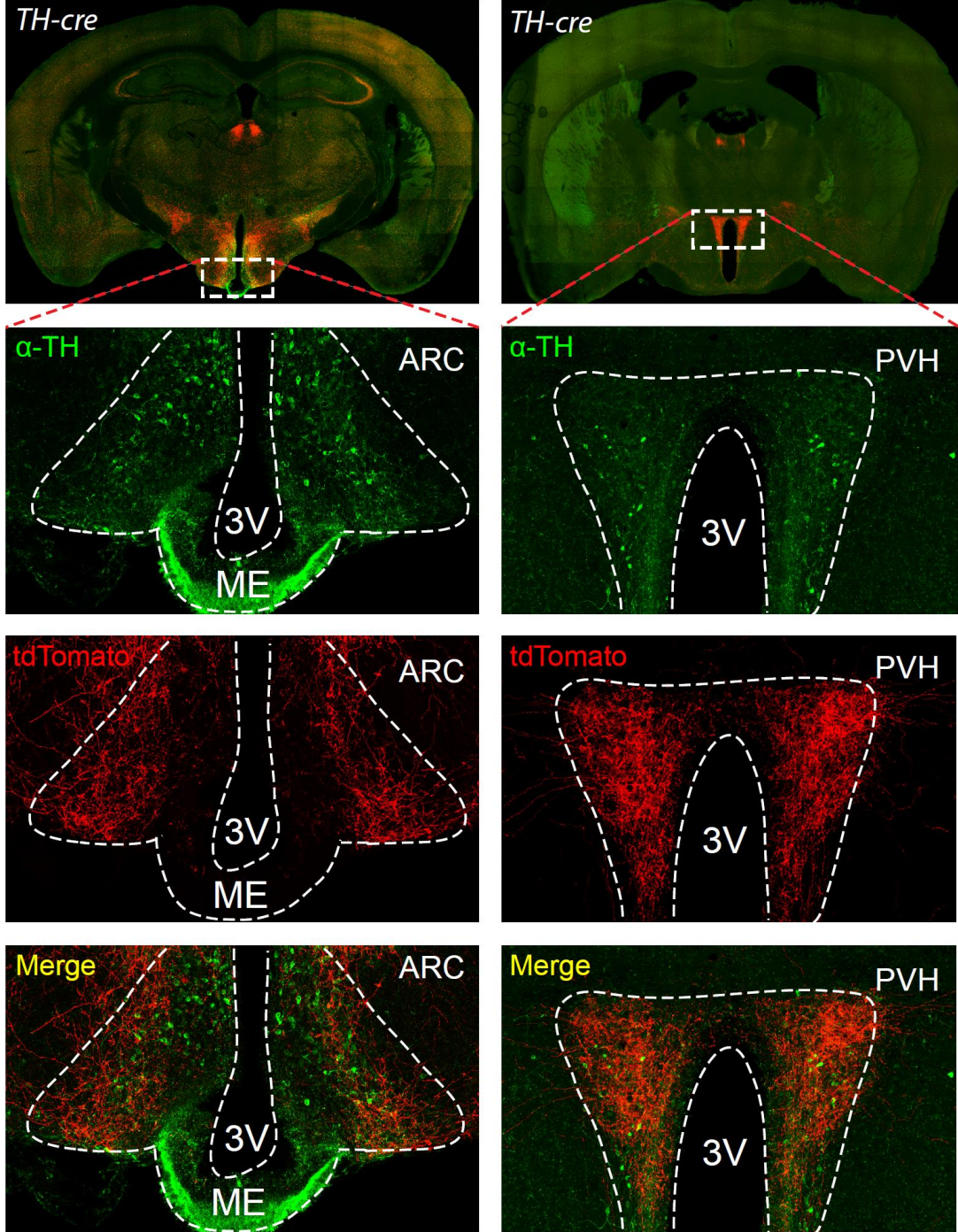
6.2. NTS – Hipotalamus Bağlantısının Gösterilmesi

TH-cre transgenik farede, beyin NTS bölgesine rAAV-FLEX-tdTomato virüsü enjekte edildikten sonra immünohistokimyasal analizi ve görüntülemesi yapılmıştır.

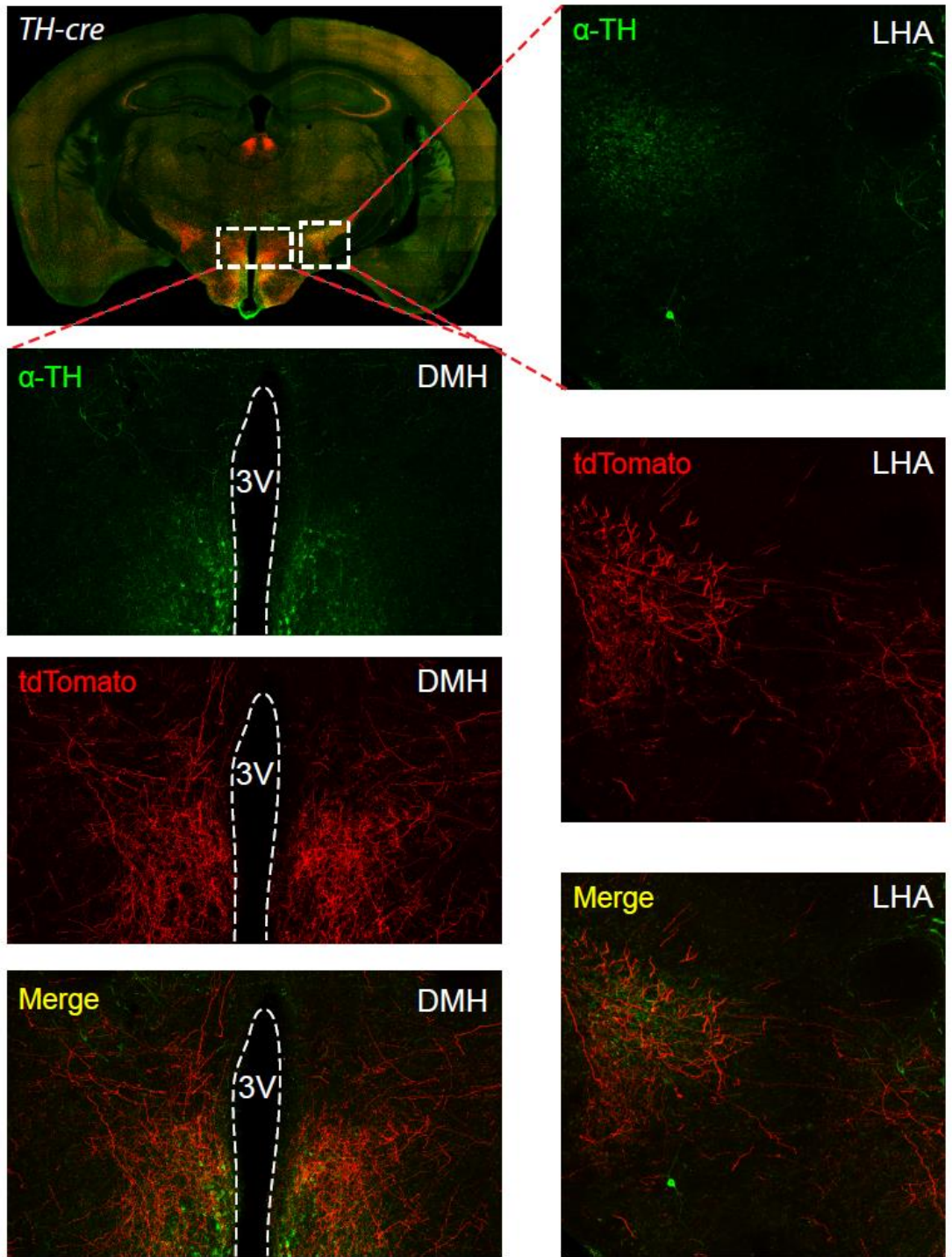


Resim 6.1 NTS bölgesine yapılan rAAV-FLEX-tdTomato virüsü enjeksiyonu.

Bu deney sonucunda beyin sapında bulunan NTS bölgesinden hipotalamus bölgesine gelen oldukça yoğun projeksiyonlar gözlenmiştir.



Resim 6.2 Hipotalamusta Arkuat ve Paraventriküler çekirdeğe gelen NTS projeksiyonu.

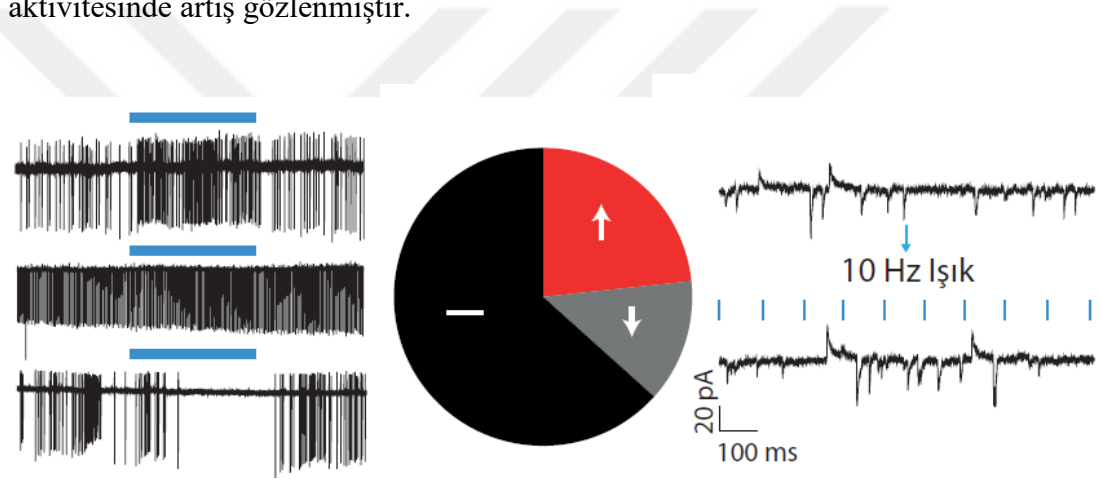


Resim 6.3 Hipotalamusta Dorsomedial ve Lateral hipotalamusa gelen NTS projeksiyonu.

6.3. NTS – PVN Bağlantısının Elektrofizyolojik Açıdan İncelenmesi

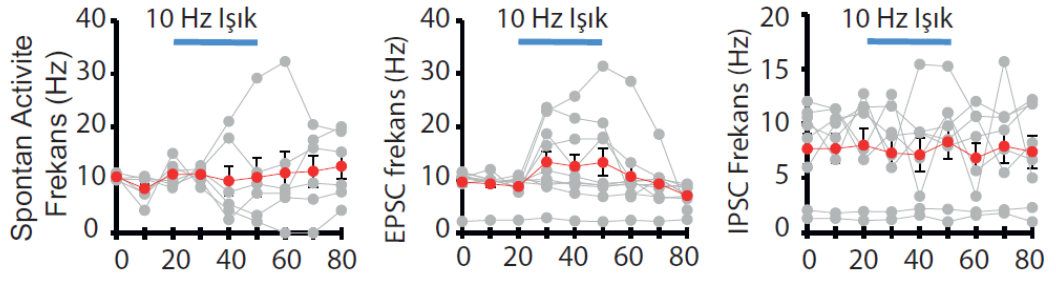
TH-cre transgenik faresinde, beynin NTS bölgesine ChR2 virüsü enjekte edilmiştir. Üç hafta iyileşme süresinin geçmesinin ardından sakrifiye edilen farelerin beyin dokuları canlı tutularak patch clamp yapılmıştır. Patch clamp yönteminde ilk önce cell-attached modu kullanılarak 10 Hz’de ChR2 yardımcı haritalama yöntemi ile, NTS’den gelen aksonlardan norepinefrin salınması sağlanarak Paraventriküler hipotalamustaki nöronlar üzerinde etkisi olup olmadığı incelenmiştir.

Bunun sonucunda paraventriküler hipotalamustaki nöronların %59’unda hiçbir aktivite değişikliği gözlenmezken %17’sinin aktivitesinde azalma, %24’ünün aktivitesinde artış gözlenmiştir.



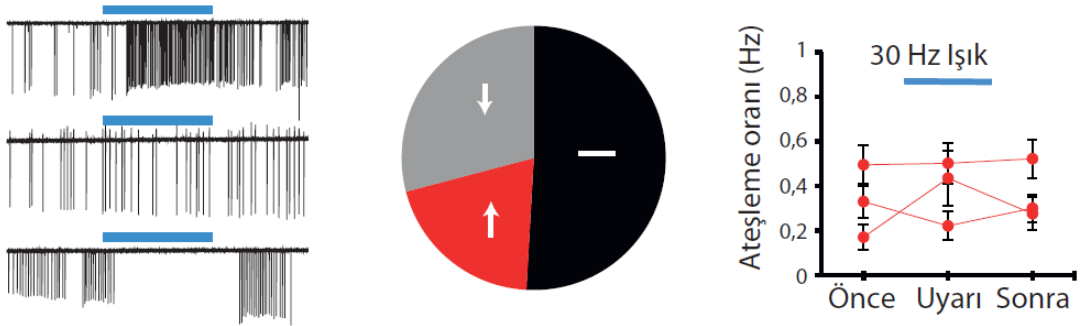
Şekil 6.1.1 Paraventriküler hipotalamus bölgesinden 10 Hz ile alınan cell-attached kayıtları.

Daha sonra bu bölgedeki nöronlar üzerinde whole-cell yöntemi ile spontan aktivite ile uyarıcı ve inhibe edici akımlara bakıldığında uyarıcı akımların sayısında artış gözlemledik.



Şekil 6.1.2 Paraventriküler hipotalamus bölgesinden 10 Hz ile alınan whole-cell kayıtları.

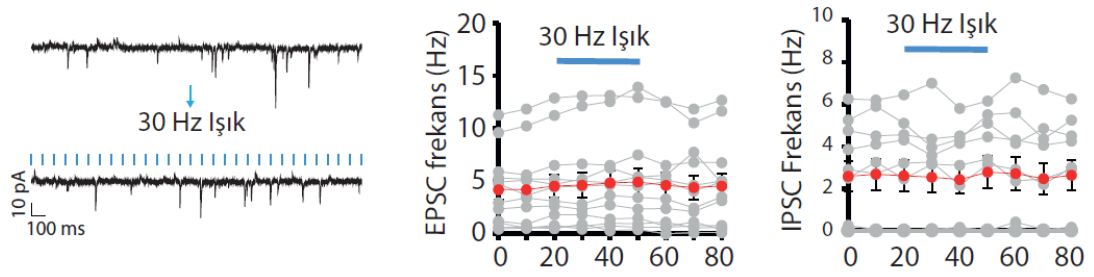
Daha sonra cell-attached modunda 30 Hz’de kayıtlar alındığında, paraventriküler hipotalamustaki nöronların %52’sinde aktivite değişikliği gözlenmezken, %22’sinde aktivite artışı ve %26’sında aktivite azalması gözlenmiştir.



Şekil 6.1.3 Paraventriküler hipotalamus bölgesinden 30 Hz ile alınan cell-attached kayıtları.

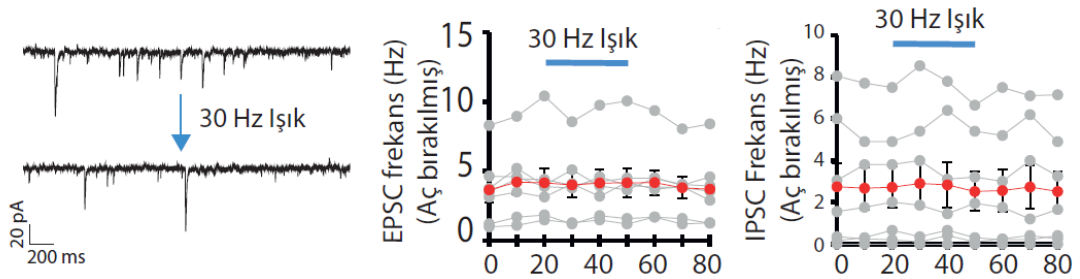
Beynin NTS bölgesinden paraventriküler hipotalamusa kadar uzanan katekolaminerjik nöron aksonlarının PVN nöronları üzerinde 30 Hz’de ne kadar etki ettiğini görmek için ise whole-cell modunda, buradaki nöronlardan kayıt aldık.

10 Hz sonuçlarının aksine 30 Hz uyarımda aktive edici ve inhibe edici akımlarda herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir.



Şekil 6.1.4 Paraventriküler hipotalamus bölgesinden 30 Hz ile alınan whole-cell kayıtları.

NTS, bölgesinin açlık ve tokluk mekanizmaları ile ilgili bir bölge olduğu daha önce gösterilmiştir. Şimdiye kadar alınan elektrofizyolojik kayıtlar, tok farenin paraventriküler hipotalamusundan alınmıştır. Buradaki nöronların, açlık durumunda NTS'den gelen katekolaminerjik nöronlarının etkisi ile değişip değişmediğini anlamak için 16 saat aç bırakılmış farelerin paraventriküler hipotalamusundan 30 Hz uyarım ile whole-cell modunda kayıt alınmıştır. Çıkan sonuçlarda uyarıcı ve inhibe edici akımlarda hiçbir farklılık gözlenmemiştir.



Şekil 6.1.5 Paraventriküler hipotalamus bölgesinden aç farede 30 Hz ile alınan whole-cell kayıtları.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Obezite, tüm dünyayı sarmakta olan büyük kitlesel bir hastalıktır. Vücudun ihtiyacından fazla olacak şekilde enerji alması ile ortaya çıkmaya başlayan sorun, sadece enerji alımını azaltarak çözülecek basit bir sorun olmaktan çıkmaktadır. Vücuttan gelen sinyallerin alınmasının zorlaşması, bu reseptörlerin duyarsız hale gelmesi, iştah ile ilgili çalışan nöronların aktivitesinde kalıcı hasarlar oluşması sonucu beslenme ve yeme bozuklukları ortaya çıkmaktadır (3).

Obezite, kişilerin yaşam kalitesini doğrudan etkilemekten öte, birçok farklı hastalığın görülme riskini de arttırarak ciddi sağlık problemlerine davetiye çıkarmaktadır. Bunların arasında kardiyovasküler rahatsızlıklar, diyabet ve kanser gibi mortalite riski yüksek hastalıklar bulunmaktadır. Üstelik diyet, egzersiz ve ilaca dayalı tedavi yöntemleri şu ana kadar beklenen etkiyi göstermekte başarısız kalmıştır (1).

Arka beyin ise, içerisinde medulla oblongatayı, ponsu ve serebellumu barındıran ve beyin ile omurilik arasında köprü görevi gören bir beyin bölgesidir. Aynı zamanda rombensefalon adıyla da bilinen bu bölge embriyonik gelişim döneminden sonra adını arka beyin olarak alır (13).

Arka beyinde bulunan NTS bölgesi ise vücuttan aldığı sinyalleri beyinde gerekli merkezlere ileten ve temel fizyolojik ihtiyaçlarımızı düzenleyen ana merkezlerden biridir. Bu bölge beyinde bulunan pek çok merkez ile iletişim halindedir. Bu merkezden salınan katekolaminler beyindeki çeşitli bölgelerde çeşitli görevler üstlenmektedir (20).

Hipotalamus bölgesi de yaşamımızı sürdürmemiz için gereken fonksiyonların kontrol edildiği merkezdir (21). Beyin sapına gelen bilgiye burada cevap oluşturulur. Bu cevap hormonal mekanizmalar ile vücutta gerekli organlara iletilir. Bu çalışmada arkabeyinde bulunan NTS bölgesinin katekolaminerjik nöronlarının hipotalamus ile olan ilişkisi incelenmiştir. Bu nöronlar hipotalamusta bulunan paraventriküler hipotalamus, arkuat nükleus, dorsomedial hipotalamus ve lateral hipotalamusa yoğun miktarda akson göndermektedir. Bu aksonlardan salınan katekolaminlerin tam olarak nasıl işlev gösterdiği ise henüz açığa kavuşmamıştır.

Bu çalışmada önce anatomik olarak bu aksonların varlığı gösterilmiştir. Literatürde, bu aksonların varlığı anatomik olarak floresan görüntüleme ile daha önce gösterilmemiştir.

Daha sonra ise bu aksonların özellikleri elektrofizyolojik olarak incelenmiştir. Literatürde, yapılan deneylerde hipotalamus bölgesinin paraventriküler kısmında katekolamin etkisine dair çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalara göre norepinefrin bu bölgede nöromodülatör olarak çeşitli düzenlemeler yapmaktadır. Paraventriküler hipotalamus nöronlarının üzerinde uyarıcı ve inhibe edici etkileri vardır (22). Ancak bu deneylerde, buradaki nöronlar üzerinde dışarıdan norepinefrin eklenerek yeterince fizyolojik olmayan koşullarda inceleme yapılmıştır. Patch clamp tekniği kullanılarak araştırılan bu çalışmada, ChR2 yardımcı devre haritalaması yöntemi kullanılmıştır. Fizyolojik koşullara daha uygun olan ve dolayısıyla gerçek koşullara daha uygun olan bu yöntem ile literatürde ilk kez, paraventriküler hipotalamusa gelen norepinefrinin kaynağı belirlenmiş ve bu aksonlar uyarılarak kendi saldıkları norepinefrin miktarınca bunun etkisine bakılmıştır. Bu açıdan özgün bir çalışmadır.

Bu yöntem ile birlikte bu aksonlar paraventriküler hipotalamus bölgesinde uyarılıp o esnada oradaki hücrelerden elektriksel kayıtları alınmıştır. Bu deney sonucunda 10 Hz ve 30 Hz ile uyarılan bu aksonlardan salınan norepinefrinin hipotalamusun paraventriküler kısmındaki nöronlar üzerinde çeşitli etkilere sahip olduğu bulunmuştur. Bu etkiler 10 Hz'de özellikle uyarıcı etkilerin arttığını ve daha az oranda ise inhibe edici etkilerin arttığını gösterirken, 30 Hz'de yapılan uyarımlarda etki görülme oranları düşmüştür.

8. KAYNAKLAR

1. Brett E. Obesity Treatment: We've Only Just Begun. *Endocr Pract.* 2018;24(5):492-4.
2. Türkiye Sağlık Araştırması, 2014. Türkiye İstatistik Kurumu 2015;18854.
3. Carneiro G, Zanella MT. Obesity metabolic and hormonal disorders associated with obstructive sleep apnea and their impact on the risk of cardiovascular events. *Metabolism.* 2018.
4. Atasoy D, Betley JN, Su HH, Sternson SM. Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature.* 2012;488(7410):172-7.
5. Hernandez-Miranda LR, Ruffault PL, Bouvier JC, Murray AJ, Morin-Surun MP, Zampieri N, et al. Genetic identification of a hindbrain nucleus essential for innate vocalization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(30):8095-100.
6. Roman CW, Derkach VA, Palmiter RD. Genetically and functionally defined NTS to PBN brain circuits mediating anorexia. *Nat Commun.* 2016;7:11905.
7. Inamdar SD. A concept of the development of the mammalian rhombencephalon based on physical rotational forces. *Med Hypotheses.* 1995;44(4):251-3.
8. Boltensern M, Konrad A, Jost W, Uder M, Kujat C. [Rhombencephalosynapsis]. *Rofo.* 1995;163(1):91-3.
9. Tillet Y, Thibault J. [Catecholaminergic nuclei of sheep encephalon. Immunocytochemical study. I. Myelencephalon and metencephalon]. *C R Acad Sci III.* 1986;302(4):125-30.
10. Cravo SL, Campos RR, Colombari E, Sato MA, Bergamaschi CM, Pedrino GR, et al. Role of the medulla oblongata in normal and high arterial blood pressure regulation: the contribution of Escola Paulista de Medicina - UNIFESP. *An Acad Bras Cienc.* 2009;81(3):589-603.
11. Wilder BG. The Source of Metencephalon and Other Latin Names for the Segments of the Brain. *Science.* 1897;6(140):373.
12. Janszky I, Vatten L, Romundstad P, Laugsand LE, Bjorngard JH, Manczuk M, et al. Metabolic syndrome in Poland - the PONS Study. *Ann Agric Environ Med.* 2011;18(2):270-2.

13. Macmillan V, Salford LG, Siesjo BK. Metabolic state and blood flow in rat cerebral cortex, cerebellum and brainstem in hypoxic hypoxia. *Acta Physiol Scand.* 1974;92(1):103-13.
14. Phillips JH. The mechanism of catecholamine secretion: a hypothesis for neurotransmitter release. *Biochem Soc Trans.* 1976;4(6):1003-7.
15. Basu S, Dasgupta PS. Dopamine, a neurotransmitter, influences the immune system. *J Neuroimmunol.* 2000;102(2):113-24.
16. Silverberg AB, Shah SD, Haymond MW, Cryer PE. Norepinephrine: hormone and neurotransmitter in man. *Am J Physiol.* 1978;234(3):E252-6.
17. Berecek KH, Brody MJ. Evidence for a neurotransmitter role for epinephrine derived from the adrenal medulla. *Am J Physiol.* 1982;242(4):H593-601.
18. Krause M, Vorbrodth A, Kanwiszer H, Tarmas J. [Attempt of Histochemical Localization of Catecholamines in the Metencephalon]. *Acta Physiol Pol.* 1965;16:1-7.
19. Marina N, Abdala AP, Korsak A, Simms AE, Allen AM, Paton JF, et al. Control of sympathetic vasomotor tone by catecholaminergic C1 neurones of the rostral ventrolateral medulla oblongata. *Cardiovasc Res.* 2011;91(4):703-10.
20. Minic Z, O'Leary DS, Scislo TJ. NTS adenosine A2a receptors inhibit the cardiopulmonary chemoreflex control of regional sympathetic outputs via a GABAergic mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015;309(1):H185-97.
21. Saper CB, Lowell BB. The hypothalamus. *Curr Biol.* 2014;24(23):R1111-6.
22. Daftary SS, Boudaba C, Tasker JG. Noradrenergic regulation of parvocellular neurons in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroscience.* 2000;96(4):743-51.

9. ETİK KURUL ONAYI



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

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
11/12/2017	71		Yrd. Doç. Dr. Deniz ATASOY

“Arkabeyin Katekolaminerjik Nöronlarının Hipotalamus ile İlişkisinin İncelenmesi” başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “Oybirliği” ile karar verilmiştir.
Etik Onay Geçerlilik Süresi: 2 ay

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

10. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	İlknur	Soyadı	Çoban
------------	--------	---------------	-------

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2015
Lise	Ataşehir Anadolu Lisesi	2011

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl – Yıl)

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	İyi	İyi	İyi

	Sayısal	Eşit ağırlık	Sözel
ALES Puanı	75,12	80,2	80,02
TOEFL IBT Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Microsoft Office Programları	Çok iyi

Sertifikalar

İstanbul Üniversitesi	Medipol	Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	2016
--------------------------	---------	---	------