



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**AGRP NÖRONLARININ KOGNİTİF YETENEKLERE
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

ÖYKÜ DİNÇKOL

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 : Öykü DİNÇKOL
Tez Başlığı : Agrp Nöronlarının Kognitif Yeteneklere Etkisinin
İncelenmesi
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kavacık Yerleşkesi
Sınav Tarihi : 13.06.2018

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 20.06./2018 tarih ve 2018.../...24...-01... sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Nesim EMBKLİ

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.

ÖYKÜ DİNÇKOL



TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması İstanbul Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Restoratif Araştırma Merkezi'nin bilimsel araştırmalara sağladığı olanak ve desteklerle yapılmıştır. Sağladığı standartların üstündeki imkanlar için REMER Müdürü ve Sinirbilim Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Gürkan Öztürk'e, ayrıca destekleri için REMER Müdür Yardımcısı Prof. Dr. Ertuğrul Kılıç'a,

Yol göstericilikleri, sabırları, tükenmeyen destekleri ve en önemlisi bana tanınmış olan bu şans için teşekkürden daha fazlasını borçlu olduğum danışmanlarım Doç.Dr. Deniz Atasoy ve Dr. Nilüfer Sayar Atasoy'a,

Çalışmalarım süresince desteklerini esirgemeyen ekip arkadaşlarım Merve Öncül, Utku Soğukpınar, Fulya Köksalar, Dr. Tayfun Ateş, Pelin Dilsiz, İlknur Çoban, Edanur Ateş Öz, Gizem Filiz ve Dr.Muhammed İkbal Alp'e,

Yüksek lisansım boyunca bana güç veren sevgili arkadaşlarım Selin Akan, Emre Vatandaşlar, Aslı Semerci, Dr. Emre Karakoç, Hüseyin Köseoğlu başta olmak üzere tüm REMER ve MEDİTAM ailesine,

Her koşulda yanımda olan, bu hayatta bana amaç veren yegane destekçilerim canım annem Berrin Dinçkol, canım babam Mustafa Dinçkol ve canım kardeşim Umut Dinçkol'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

ÖYKÜ DİNÇKOL

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
RESİMLER LİSTESİ	ix
TABLolar LİSTESİ.....	x
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1 Açlık.....	5
4.2 Hipotalamus	5
4.3 Hipotalamik Arkuat Çekirdek	7
4.4 Agouti-İlişkili Peptid Nöronları	9
4.5 Ghrelin Hormonu	10
4.6 Spatial Öğrenme ve Hafıza	11
4.7 Morris Water Maze	13
4.8 Novel Object Recognition Test.....	14
4.9 Hücre Tipi Spesifik Transgen İfadesi ve Transgenik Fare Modeli	15
4.10 Kemogenetik Manipülasyon	17
5. MATERYAL VE METOT	18
5.1. Materyal	18

5.2 Metotlar	20
5.2.1 Deney hayvanları	20
5.2.2 Genotipleme işlemi	20
5.2.3 Rekombinant adeno-asosiye virüs üretimi	23
5.2.4 İntrakraniyal rekombinant adeno-asosiye virüs enjeksiyonu	25
5.2.5 Davranış deneyleri	26
5.2.6 Doku fiksasyonu ve kesit alma	30
5.2.7 Görüntüleme.....	31
5.2.8 İstatiksel analiz.....	31
6.BULGULAR	32
6.1 Genotipleme İşlemi	32
6.2 Hipotalamik Agrp Nöronlarının Görüntelenmesi	32
6.3 Davranış Deneyleri.....	33
6.3.1 Besin tüketim takibi	33
6.3.2 Morris Water Maze	34
6.3.3 Novel Object Recognition Test.....	40
7.TARTIŞMA VE SONUÇ	43
8.KAYNAKLAR	47
9.ETİK KURUL ONAYI.....	51
10.ÖZGEÇMİŞ	52

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

Semboller	Açıklamalar
A/P	Anterior/Posterior
AAV	Adeno-Asosiyel Virüs
Agrp	Agouti-İlişkili Peptid
Agrptm1	Agrp transgenik faresi
Arh, Arc	Hipotalamik Arkuat Çekirdek
CART	Amfetamin Düzenleyici Transkript
CNO	Clozapine-N-Oksit
CO ₂	Karbondioksit
Cre	Causes of Recombination
D/V	Dorsal/Ventral
ddH ₂ O	Saflaştırılmış Su
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DREADD	Dizayn Edilmiş İlaçları Aktive Eden Dizayn Edilmiş Reseptörler
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EtOH	Etil Alkol
FLEX	Flip-Excision
GFP	Yeşil Floresan Protein
GHRH	Büyüme Hormonu Salıncılayıcı Hormon
HCl	Hidroklorik Asit
KCl	Potasyum Klorür
LHA	Lateral Hipotalamik Alan
Lox	Locus of Crossing
M/L	Medial/Lateral
MC3R	Melanokortin-3 Reseptörü
MC4R	Melanokortin-4 Reseptörü
ME	Median Eminens
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
MSH	Melanosit Stimüle Edici Hormon

MWM	Morris Water Maze
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
NKB	Nörokinin B
NOR	Novel Object Recognition Test
NPY	Nöropeptid Y
NTS	Soliter Sistemin Kaudal Çekirdeği
O ₂	Oksijen
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
POMC	Pro-optio Melanokortin
PCR, PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFA	Paraformaldehit
rAAV	Rekombinant Adeno-Asosiyasyon Virüsü
RAM	Radial Arm Maze
3V	Üçüncü Ventrikül

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1 Hipotalamik Bölgeler (15)	6
Şekil 4.2 Beynin Hipotalamus Bölgesi (Kırmızı Alanlar) (16).....	7
Şekil 4.3 Ghrelin Etki Mekanizması (26)	11
Şekil 4.5 Mwm Test Basamakları	14
Şekil 4.6 Farklı Nor Protokolleri.....	15
Şekil 4.7 Cre-Lox Sistemi	16
Şekil 4.8 Hücre Tipi Spesifik Transgen İfadesi	16
Şekil 4.9 Dredd Metoduyla Kemogenetik Manipülasyon	17
Şekil 6.1 Kemogenetik Olarak Agrp Nöronlarının Uyarımı Sonrası Besin Tüketim Takip Grafiği (Her Bir Renk Bir Hayvanı Temsil Etmektedir.)	34
Şekil 6.2 Mwm Eğitim Günleri. A, Öğrenme Düzeylerini Gösteren Platforma Kaçma Süresi Grafiği. B, Havuz İçinde Ortalama Yüzme Hızı Grafiği.	35
Şekil 6.3 Kısa Dönem Hafıza Değerlendirmesi	36
Şekil 6.4 Uzun Dönem Hafıza Değerlendirmesi.....	37
Şekil 6.5 Prob Günlerinde Hayvanların Platformun Etrafındaki Alandan Geçme Sayıları. A, Kısa Dönem Bellek Değerlendirmesi. B, Uzun Dönem Bellek Değerlendirmesi.	38
Şekil 6.7 Kısa Dönem Hafıza Prob Günlerindeki Ortalama Isı Haritası. A, Test+ Grubu Hayvanların Prob+ Günü. B, Test+ Grubu Hayvanların Prob- Günü. C, Test- Grubu Hayvanların Prob+ Günü. D, Test- Grubu Hayvanların Prob- Günü.	39
Şekil 6.8 Test Günü Objelerin Çevresindeki Alana Girme Sayısı	40
Şekil 6.9 Test Gününde Objelerin Çevresindeki Alanda Bulunma Süreleri.....	41
Şekil 6.10 Test Gününde Hayvanların Burunlarının Objelere Değme Sayısı.....	42

RESİMLER LİSTESİ

Resim 4.1 Arkuat Çekirdekte Bulunan Pomc Ve Npy Nöron Gruplarının Boyama Görüntüsü (19).	8
Resim 4.2 Arkuat Çekirdekte Agrp Nöronlarının Lokalizasyonu	9
Resim 6.1 <i>Agrp-cre</i> Transgenik Ve C57bl/6 Yabancıl Tür Farelerin Genotipleme Sonucu.....	32
Resim 6.2 Hm3dgq-Mcherry Enfeksiyonu Konfokal Mikroskop Görüntüsü.....	33



TABLolar LİSTESİ

Tablo 4.1 Hipotalamik Çekirdekler Ve Görevleri.....	6
Tablo 5.1. Biyolojik Materyaller Ve Kimyasallar	18
Tablo 5.2. Cihaz Ve Gereç Listesi	19
Tablo 5.3. Kontrol Pzr Karışımı.....	21
Tablo 5.4. Transgenik Pzr Karışımı	22
Tablo 5.5. Kullanılan Primer Dizileri	22
Tablo 5.6. Pzr Protokolü	22
Tablo 5.7 Agrp Aktivasyonu İçin Gündüz Döngüsü İçin İ.P. Enjeksiyonları	27
Tablo 5.8 Deney Gruplandırması.....	27
Tablo 5.9 Mwm Takvimi	28
Tablo 5.10 Mwm İçin İ.P. Enjeksiyonları.....	28
Tablo 5.11 Mwm Havuzda Yüzdürme Sırası.....	29
Tablo 5.12 Nor Testinde Kullanılan Değerlendirme Ölçekleri.....	30

1. ÖZET

AGRP NÖRONLARININ KOGNİTİF YETENEKLERE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Açlık durumunda insan beyinde birçok aktivite değişimi oluşur ve bunlara bağlı olarak vücudun farklı organlarından hormonsal salınımlar gerçekleşir. Bu aktivite değişimleri fizyolojik veya kognitif yetilerde aktive edici, inhibe edici ya da nötr etkilere yol açmaktadır. Fizyolojik açlık sırasında vücutta salınan ghrelinin veya analoglarının rodent deney modellerinde vücuda enjeksiyonları ile elde edilen literatür bilgisi ghrelinin öğrenme, bellek veya diğer kognitif yetilere pozitif bir etkisi olduğunu göstermektedir. Ghrelin hormonunun salınımının tetikleyen açlık mekanizmasında öncül rol oynayan nöronlardan biri Agrp nöronlarıdır. Bu çalışmada açlık nöronları olarak geçen hipotalamik Agrp nöronlarının spatial öğrenme ve bellek gibi temel kognitif yetiler üzerindeki etkisi araştırılmıştır. *Agrp-cre* transgenik fare ile yapılan deneylerde, Agrp nöronları kemogenetik ajanlar ile uyarılmış, kognitif yetiler Morris Water Maze ve Novel Object Recognition Test uygulanarak incelenmiştir. Yapılan deneyler sonucu Agrp nöronlarının öğrenmeye bir etkisinin bulunmadığının ancak spatial bellek üzerindeki arttırıcı bir etkisinin gözlenebilmesi için öğrenme safhasında Agrp aktivitesinin gerekli olduğu ($p<0,005$) ve eğer öğrenme fazında Agrp nöron ateşlemesi yok ise nöron aktivitesinin bellek üzerinde negatif bir etkisi olduğu ($p<0,001$) ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Arkuat çekirdek, Agouti-ilişkili peptid nöronları, spatial öğrenme, spatial bellek, morris water maze, novel object recognition test

2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF AGRP NEURONS' ROLE ON COGNITIVE ABILITIES

During hunger state, activity changes occur throughout the brain, which in turn lead to hormone release. Changes in these activities might have activating or inhibiting effects on physiological or cognitive abilities or they might not have any influence. One of the hormones released during physiological hunger state is ghrelin. Agrp neurons are one of the precursor neurons that play an important role in hunger mechanism which leads to ghrelin release. Previous studies using administrations of ghrelin or its analogous on rodents demonstrated that ghrelin-stimulated-hunger state has a positive effect on cognitive abilities including learning and memory. In this project, we initially studied the effect of hypothalamic Agrp neurons, which are active at the hunger state on cognitive abilities such as spatial learning and spatial memory. For this purpose, we applied chemogenetic methods on Agrp-cre mice in order to stimulate Agrp neurons specifically. Morris Water Maze and Novel Object Recognition Test were conducted for behavioral studies. The results indicate that Agrp activity is necessary during training process for the enhancer effect on memory ($p < 0,005$) and after training without Agrp firing, neuron activity decreases the memory retention ($p < 0,001$), nonetheless there is no influence on learning.

Key words: Arcuate nucleus, agouti-related peptide neurons, spatial learning, spatial memory, morris water maze, novel object recognition test.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Gelişmiş canlılar olan insan ve hayvanların yaşamlarını devam ettirebilmek adına gerekli olan faaliyetlerden biri beslenmedir. Beslenme metabolizmasına fizyolojik ve kognitif birçok bileşen dahil olmaktadır. Sadece besini alıp, sindirmek üzerine kurulmuş mekanik bir faaliyet değildir. Beslenme faaliyetinin gerçekleşmesine bilişsel yeteneklerin kullanımı katkıda bulunmaktadır.

Doğal hayatta hayvanlar gün içinde bir çok olayı ve mekanı gözlemler ve gerektiğinde bu gözlem ve bilgileri kullanarak yaşamlarını sürdürürler. Buna en güzel örneklerden biri de acıkmış bir hayvanın avının ya da besininin yerini hatırlayarak onu bulması ve açlığını gidermesidir(1, 2). Aç hayvanların rahatlıkla yemeklerinin veya avlarının yerini bulabilmeleri yapılan bu çalışmanın çıkış noktasını oluşturmuştur.

Ghrelin, açlık uyarıcı bir peptid ve hormondur. Fizyolojik açlık sırasında ghrelin seviyesi yüksek iken, yemek sonrası düşer. Ghrelin hormonu ile yapılan birçok deneyde kognitif yetiler ile arasında ilişki olduğu bulunmuştur (3-7). Ghrelin peptidinin farklı dozlarda beyin içi veya periferal olarak vücuda enjeksiyonu sonucu belleği iyileştirdiği ve hafızada tutma oranını arttırdığı görülmüştür (3, 5). Ghrelin peptidinin veya analogu olarak iş gören peptidlerin sistematik olarak uygulanması sonucu hafızanın yanı sıra öğrenmenin de güçlendiği gözlenmiştir (4). Bunun yanı sıra genetik müdahale ile ghrelin yokluğu yaşatılan hayvanlarda öğrenme ve belleksel fonksiyonlarında bozulmalar yaşanmıştır (4). Yapılan bazı çalışmalar ise ghrelinin bellek üzerine olan etkisinin yanı sıra, önceden öğrenilmiş bilgilerin geri çağırılması üzerinde bir etkisi olmadığını göstermişlerdir (6). Ghrelinin öğrenme çeşitlerinden özel olarak spatial öğrenmeyi arttırdığı da saptanmıştır (5).

Açlık-tokluk metabolizmasının temel olarak beynin hipotalamus bölgesinden kontrol edildiği temel literatür bilgileri arasındadır. Hipotalamusta yer alan birçok bölgeden biri olan arkuat çekirdek içerdiği nöron tipleri açısından açlık-tokluk mekanizmasında önemli rol oynamaktadır. Arkuat çekirdekte yer alan Agrp ve POMC nöronları bu mekanizmanın öncü nöronlarıdır. Agrp nöronlarının açlık mekanizmasından sorumlu

ve en etkili n6ron tipi olduğu 6nceki 7alışmalar ile keşfedilmiş ve kabul g6rm6ř bir bulgudur (8-10).

Bu 7alışmada a7lık mekanizmasında b6y6k rol oynayan a7lık n6ronlarının doğal hayattaki gibi besinin yerini hatırlama faaliyetinde bir rol6 olup olmadığı sorusundan yola 7ıkılmıştır. A7lık hormonu olarak adlandırılan ghrelinin bellek ve 6ėrenme 6zerindeki pozitif etkisinin Agrp n6ronları 6zerinden mi etki ettiği sorgulanmış ve Agrp n6ronlarının spatial 6ėrenme ve bellek 6zerindeki direkt etkisi incelenmiştir.



4. GENEL BİLGİLER

4.1 Açlık

Açlık gıda, enerji, vitamin ve mineral eksikliği olarak tanımlanır. Açlığın dışarıdan gözlenebilen besin alımını motive edici davranışsal bir sonucu olduğu gibi, dışarıdan gözlenemeyen fizyolojik ve psikolojik bir dizi etkileşime neden olur. Çıplak gözle algılanamayan fizyolojik ve nörofizyolojik değişiklikler arasında sinirsel uyarılar, vücut ısısında değişim, hormon ve metabolit seviyelerinde değişim sayılabilir. Bu fizyolojik değişiklikleri ve bunlara oluşan cevapları kontrol eden belli beyin bölgeleri bulunmaktadır. Bu merkezlerin başında beyin sapı ve hipotalamus gelir. Beyin sapında bulunan soliter sistemin kaudal çekirdeği (NTS) gastrointestinal sinyaller için giriş noktası olarak görev yapar. Besin alımı, enerji tüketimi, iştah arasındaki denge ve sirkadiyen döngülerin merkezi ve kontrol noktası ise hipotalamustur. Hipotalamik arkuat çekirdek, Lateral hipotalamus ve Ventromedial hipotalamus beynin hipotalamus bölgesinde bulunan açlık, tokluk ve enerji tüketimi merkezleridir (11, 12).

4.2 Hipotalamus

Hipotalamus beynin diensafalonunda, talamusun anterior ve inferiorunda lokalize olmuştur. Anatomik lokasyonundan dolayı fonksiyonel olarak hipofiz bezi ile ilişkilidir (13). Toplam beyin hacminin %2'lik bir kısmını oluşturmaya karşın hipofiz fonksiyonun ve homeostatik dengede kilit rol oynamaktadır (14).

Hipotalamus uzunlamasına yönelimli hücre sütunundan oluşan 3 farklı bölgeye ayrılır (15). Bu bölgeler ise üçüncü ventrikülden dışa doğru sırayla olmak üzere periventriküler alan, medial alan ve lateral alandır (Şekil 4.1). 3. Ventrikülün hemen sınırında bulunan ince hücre grupları periventriküler alanı oluşturur. Bu alan başlıca arkuat çekirdek ve paraventriküler çekirdek olmak üzere birkaç belirgin çekirdeken oluşur. Periventriküler alanın iç sınırında sitoarkitektonik olarak birkaç farklı çekirdekten oluşan medial alan bulunmaktadır. Medial alandaki çekirdekler özellikle

otonom sinir sisteminin ve ayrıca nöroendokrin sistemin düzenlenmesinde rol oynarlar. En dış kenarda bulunan lateral alan az sayıda çekirdek içermesine karşın median ön beyin demeti gibi önemli lif yollarını içerir.



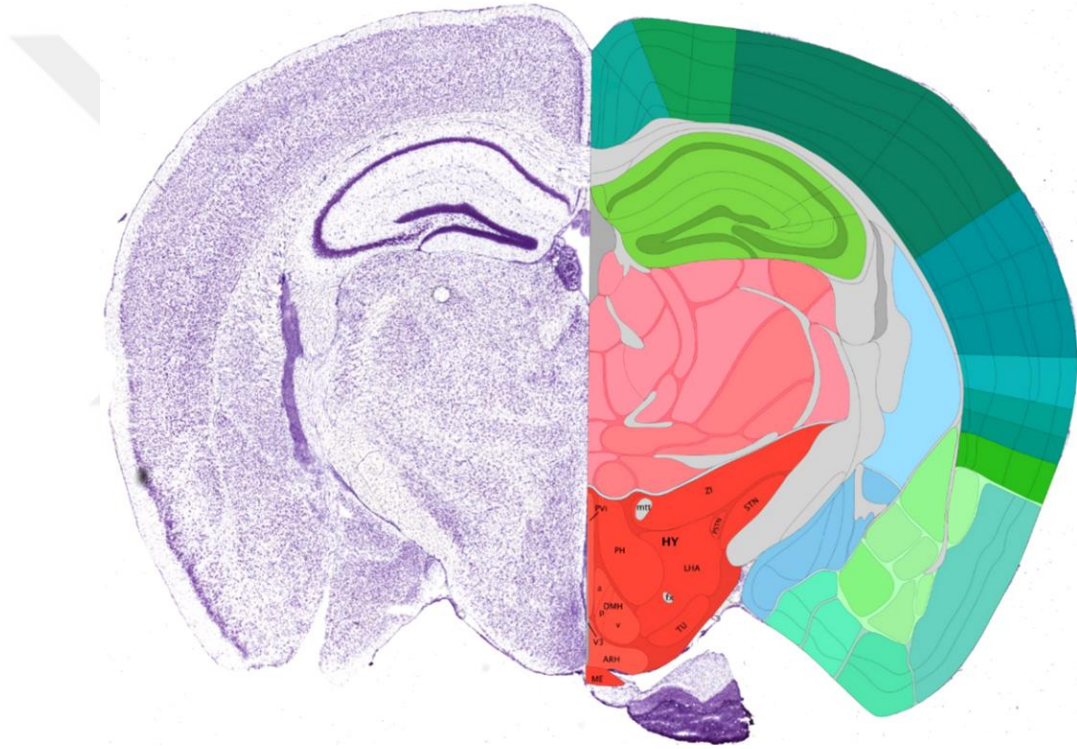
Şekil 4.1 Hipotalamik bölgeler (15)

Hipotalamus birbirinden farklı hücre grupları barındıran ve farklı işlevlere sahip çekirdek yapılarından oluşur (Şekil 4.2). Bu çekirdekler ve öncelikli görevleri tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1 Hipotalamik çekirdekler ve görevleri

Çekirdek	Görevleri
Preoptik çekirdek	Termoregülayson
Medial preoptik çekirdek	Gonadotropik hormonların salınımı, termoregülayson
Süpraoptik çekirdek	Vazopresin salınımı, oksitosin salınımı
Paraventriküler çekirdek	Oksitosin, vazopresin, somatostatin salınımı
Anterior hipotalamik çekirdek	Termoregülayson, soluma, ter salımı
Süprakiazmatik çekirdek	Sirkadiyen ritim
Lateral çekirdek	Oreksinerjik nöronların ana kaynağı
Dorsomedial hipotalamik çekirdek	Kan basıncı, kalp atışı

Ventromedial çekirdek	Tokluk, nöroendokrin kontrolü
Arkuat çekirdek	Büyüme hormon salgılatıcı hormon salınımı, beslenme
Mamiliari çekirdek	Hafıza
Posterior çekirdek	Kan basıncında artış, vazopresin salımı
Tüberomamiliari çekirdek	Uyanıklık ve dikkat, enerji dengesi, öğrenme ve hafıza, uyku

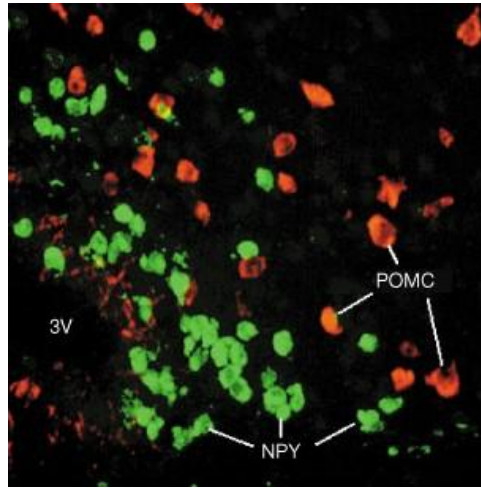


Şekil 4.2 Beynin hipotalamus bölgesi (kırmızı alanlar) (16)

4.3 Hipotalamik Arkuat Çekirdek

Hipotalamik arkuat çekirdek (ARH, ARC) üçüncü ventrikülün (3V) en altında, sirkumventrikular organlardan biridir ve kan-beyin bariyeri yapısı olan median eminence (ME) yakınında bulunur (17).

Arkuat çekirdekte birbirinden değişik nöron grupları bulunur ve bu nöron grupları çeşitli nörotransmitter ve nöropeptit salınımı yaparlar. Arkuat çekirdekte bulunan başlıca nöron grupları nöropeptit Y (NPY), gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH), agouti-ilişkili peptit (Agrp), kokoin ve amfatamin düzenleyici transkript (CART), kisspeptin, dopamin, büyüme hormonu salgılatıcı hormon (GHRH), nörokinin B (NKB), β -endorfin, melanosit stimule edici hormon (MSH), somatostatin ve pro-opio melanokortin (POMC)'den oluşur (18). Bu nöron gruplarının bazılarına ait histokimyasal boyama görüntüsü Resim 4.1'te gösterilmiştir (19). Bu nöronların leptin, insülin, gonadal steroidler ve glikoz da dahil olmak üzere geniş bir hormon ve besin dizisine cevap verdiği bilinmektedir. Arkuat çekirdek, özellikle leptin işleyişinin kontrolünde temel regülasyonunu NPY ve POMC nöronları aracılığı ile sağlarken enerjinin uzun süreli kontrolünü yapar. Açlık-tokluk mekanizmasının önemli bir diğer hormonu olan ghrelin ise kısmen arkuat çekirdekte yer alan NPY/Agrp nöronları üzerinden beslenmeyi ve kilo alımına etki etmektedir. Ghrelin gıda içeriğinin tükenmesi sonrası mideden salgılanırken arkuat çekirdek besinde oluşan bu akut değişikliğin algılanması ve yanıtlanmasında etkilidir (20).

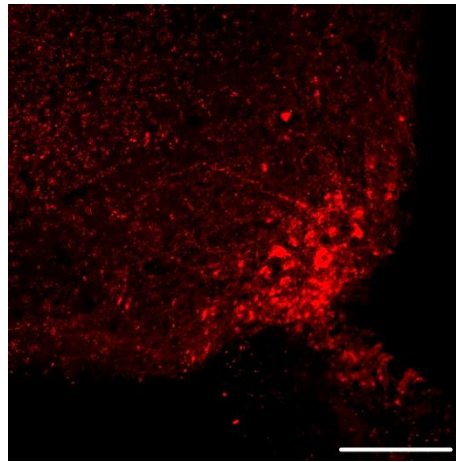


Resim 4.1 Arkuat çekirdekte bulunan POMC ve NPY nöron gruplarının boyama görüntüsü (19).

4.4 Agouti-İlişkili Peptid Nöronları

Agouti-ilişkili peptid (Agrp) nöronları beyinde Nöropeptid Y (NPY) nöronları ile birlikte Agouti-ilişkili peptid ya da Agouti-ilişkili protein olarak isimlendirilen nöropeptid grubunu üreten nöron çeşitleridir. Sadece beynin hipotalamus bölgesinin arkuat çekirdeğinin ventromedial alanında lokalize olmuşlardır. Aktivasyonları iştahta artışı, enerji tüketimi ve metabolizmanın düşüşünü tetikler (10).

Agouti-ilişkili protein ilk olarak melanokortin reseptörleri için ters agonist olarak işlev gören bir endojen nöropeptid olarak keşfedilmiştir. Agrp, beyin melanojortin sinyalizasyon sistemine benzer şekilde enerji homeostazisi üzerinde etkilerini gösterir ve Melanokortin-3 reseptörünü (MC3R) ve Melanokortin-4 reseptörünü (MC4R) direkt olarak bloke ederek melanokortin yolunu tersine çevirerek doyumluğu azaltan ve gıda alımını teşvik eden modüle edici bir fonksiyon gösterir (8). Agrp, NPY ile birlikte açlık aktive edici nöron gövdelerinde ko-eksprese edilir. Ancak günümüzde bu nöronlar Agrp nöronları olarak isimlendirilmektedir. Bunun sebebi ise sinir sisteminde yoğun olarak eksprese edilen NPY ve GABA'nın aksine Agrp, sadece bu nöronlara özgün olarak üretilmektedir. Bu durum, bu nöronlara özgü seçici manipülasyonların uygulanabilmesi için benzersiz bir moleküler imza niteliği taşımaktadır (9, 10).



Resim 4.2 Arkuat çekirdekte Agrp nöronlarının lokalizasyonu

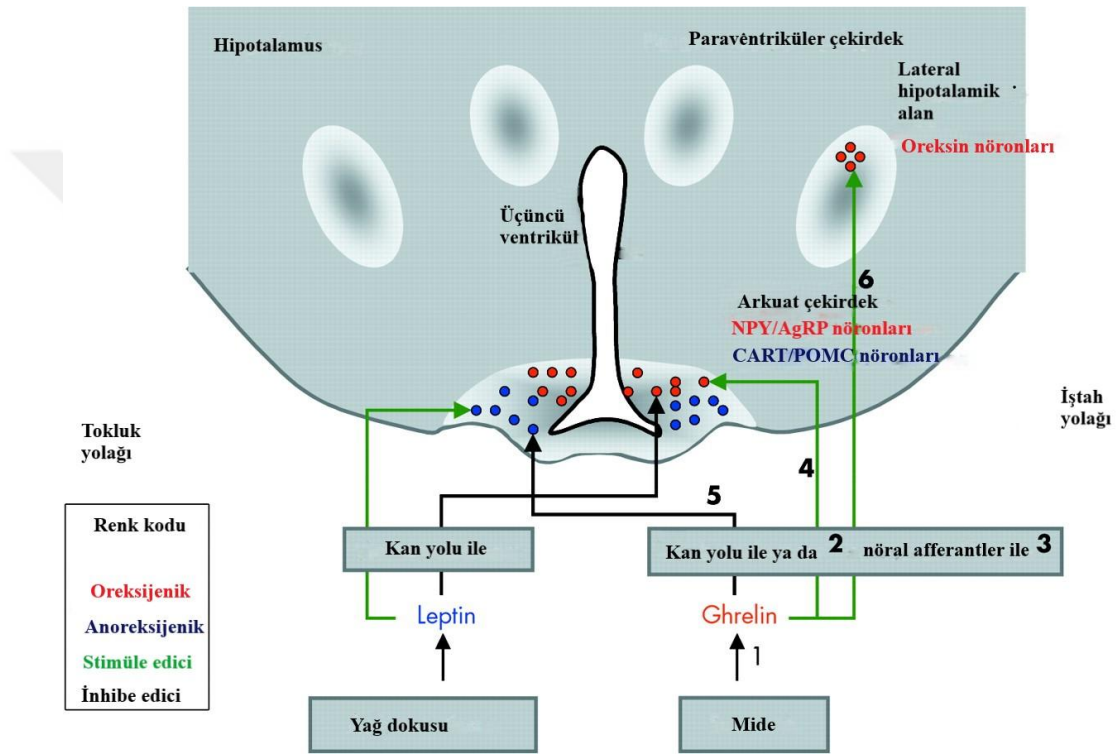
Agrp nöronları lokalize oldukları alan dolayısıyla “birinci dereceden nöronlar” olarak isimlendirilirler. Agrp nöronlarının yerleşimleri Resim 4.2’de gösterilmiştir. Hipotalamik arkuat çekirdeğin ventromedialinde yer alan Agrp nöronları median eminens (ME) ile oldukça iç içe yerleşmişlerdir. ME’de kan-beyin bariyeri fenestrasyona uğradığı için kan-beyin alışverişi kolaylaşır ve bu durumda açlık-tokluk sinyallerine ilk cevap veren nöronlar Agrp nöronları olur (9).

4.5 Ghrelin Hormonu

Ghrelin hormonu, büyüme hormonu üstünde salgılatıcı etkiye sahiptir, temel olarak enerji dengesi ve besin alımında rol alır, 28 amino asitten oluşur. Vücutta üretimi 2 hücreyel alana yayılmıştır. Bunların birincisi oksintik bez iken ikincisi ise sinaptik uyarımla nöral hücre gruplarının sekresyon yaptığı santral sinir sistemidir. Üretiminin çoğunluğu mide fundus mukozası oksintik bezleri içerisindeki X/A benzeri hücreler tarafından üretilmektedir. Bunun yanında ghrelin ekspresyonu plasenta, testis, böbrek, hipofiz, prostat, ince barsak, pankreas ve beyin gibi organlarda da gösterilmiştir. Ghrelin salınımı lokal ve merkezi uyarılar ile düzenlenir. Bu uyarılar midedeki sindirim ürünlerinin hareketi, sistemik dolaşımdaki maddeler ve santral sinir sistemi uyarılarını kapsamaktadır. Ghrelinin beyinden salınımı hipotalamustaki arkuat çekirdek, lateral, ventromedial, dorsomedial ve paraventriküler alandan gerçekleşir (21, 22). Ghrelin salınım ve etki mekanizması Şekil 4.3’te gösterilmiştir.

Ghrelin açlık hormonu olarak adlandırılır. Ghrelin sekresyonu beslenme durumuna bağlı olarak değişir; yemek alımı öncesi seviyesi yükselir iken yemek alımı sonrası düşer. Tokluk hormonu olarak adlandırılan leptinin sekresyonunun ghrelin seviyesinde regüle edici rol oynadığı düşünülürken daha sonra yapılan çalışmalar ile leptin-ghrelin sekresyon mekanizmalarının birbirinden bağımsız olduğu kanısı geçerli hale gelmiştir (22, 23). Ghrelinin enerji dengesi ve besin alımı üzerindeki etkisi çoğunlukla hipotalamus üzerinden kontrol edilir. Ghrelin, Agrp, NPY ve oreksin nöronlarını stimüle eder. Ayrıca POMC ve CRH-üretici nöronlar gibi anoreksijenik hücreler üzerinde de inhibe edici etkisi bulunur. Besin alımı üzerinde

kısa vadeli bir etkisi bulunurken, enerji balansı üzerinde uzun vadeli bir etkisi bulunur. Bu etkiye rağmen ghrelinin varlığının enerji homeostazisi için çok önemli bir gereklilik olmadığı gösterilmiştir. Ghrelin knockout farede (*ghrelin*^{-/-}) yapılan fizyolojik ölçümler vücut büyüklüğü ve kompozisyonunda, kemik yoğunluğunda, büyüme oranında, gastrik boşaltımda, besin alımında ve patolojide bir değişiklik olmadığı gösterilmiştir (24, 25).



Şekil 4.3 Ghrelin etki mekanizması (26)

4.6 Spatial Öğrenme ve Hafıza

Spatial hafıza kişinin çevresel bilgilerini kaydeden ve mekansal yönelimlerini yönlendiren belleğin bir parçasıdır. Bir insanın mekansal belleği, evi ile işi arasındaki yolları öğrenmesi veya bir sıçanın labirentin sonundaki yemeğin yerini öğrenmesinden sorumlu olan bellek tipidir. Spatial belleğin oluşumunda uzaysal/mekansal olarak toplanan anılar bilişsel bir harita oluşturulur. Hayvan ya da

insan bir mekandaki nesnelerin görünümlerini, sesleri, kokuları ya da o ortamdaki hissiyatları hatırlamakla kalmaz, aynı zamanda bütün bu duyuşsal bilgiler ve gözlemlenip toplanan diğler tüm bilgiler spatial belleği oluşturmak için bir araya gelir (27).

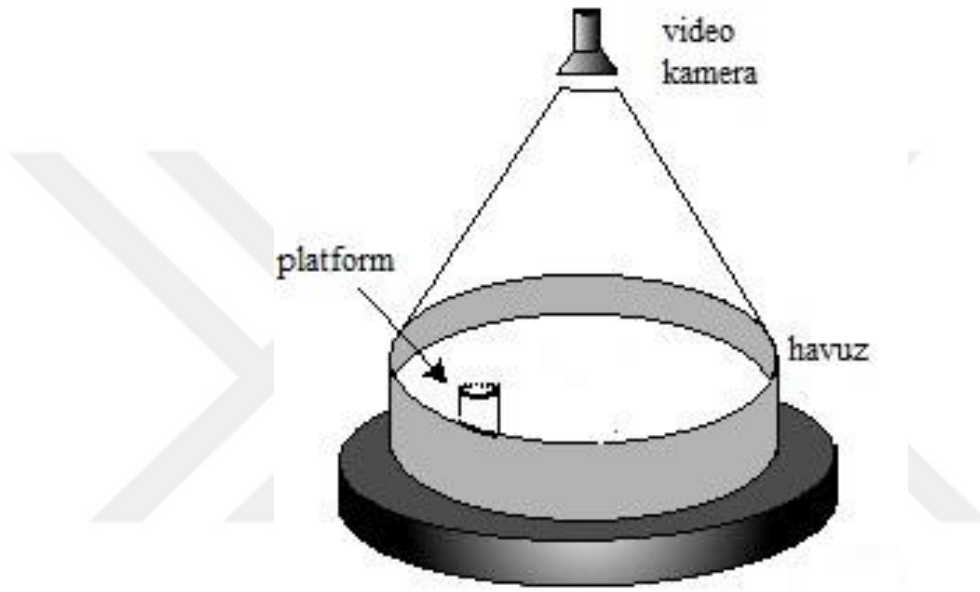
Spatial belleğin incelenmesi ilgilenilen uzaysal bellek tipine ve test edilecek türe bağlıdır. Spatial belleğin hayvanın mekansal yön bulma ve gezinme yetenekleri ile ilgili olduğu bilinse de bu durumu yaşamın içinde gerçek hali ile test etmek zordur. Bu yüzden spatial bellek ve spatial öğrenme mekanizmaları ödül veya şartlandırma mekanizmalı labirentler kullanılarak test edilir. Yaygın olarak kullanılan ve çoğunluğu kemirgenlere optimize edilmiş labirent düzeneklerinden bazıları şunlardır; radial arm maze (RAM), morris water maze (MWM), t-maze, star maze ve hole-board maze (28). Bunlar arasından spatial belleği ve öğrenme mekanizmasının test etmek adına en yoğun kullanılanları MWM ve RAM'dır.

Nörofizyolojik temel olarak spatial bellek medial temporal lobda bulunan hipokampus olarak da adlandırılan hipokampal alan ile ilişkilendirilir. Hipokampus ortamın uzamsal bir haritasının çıkarılmasını sağlar, alan bilgilerini depolar. İşleyişinde referans ve çalışma belleğini kullanır ve uzamsal konumlar hakkında bilgi işlenmesinde büyük role sahiptir (29, 30). Hipokampus bölgesindeki plastisite engellendiğinde hedefe yönelik navigasyonda sorunlar ortaya çıkmıştır ve mekanları hatırlama yeteneği bozulmuştur (31). Hipokampus hasarı olan hayvanlarda mekansal düzen bozulmaları yanında navigasyonda da bozulmalar gözlenmiştir ve nesne-mekan ilişkilerini öğrenmemişlerdir (32). Aynı zamanda, hücre içi kayıt ve nörogörünteleme deneyleri ile öğrenme ve hafızada tutma sırasında hipokampal alanda elektriksel değişimler gösterilmiştir (33, 34).

Bu çalışmada spatial öğrenme ve bellek mekanizması MWM ve Novel object recognition test (NOR) düzenekleri ile test edilmiştir.

4.7 Morris Water Maze

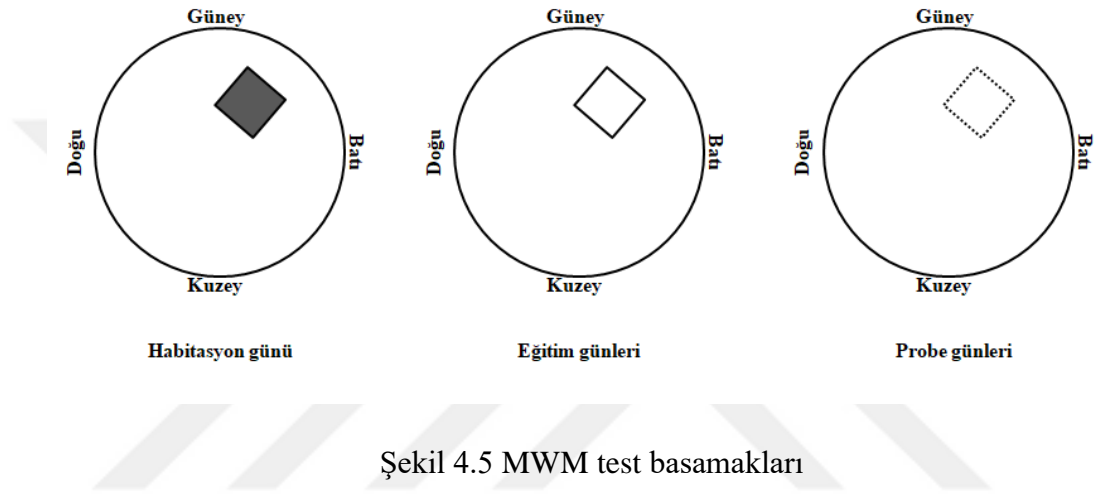
Morris water maze Richard G. Morris tarafından spatial öğrenme çalışmalarında radial maze düzeneğine alternatif olması adına 1981 yılında tasarlanmıştır (35). Kemirgenler üzerinde çalışmak için ideal olan test spatial öğrenme ve bellek çalışmalarında temel olarak kullanılan bir düzenek haline gelmiştir. Şekil 4.4'te temel bir MWM düzeneği şematize edilmiştir.



Şekil 4.4 MWM düzeneği

Üstünde çalışılan konu ve kurulan hipoteze uygun olarak farklı protokollere optimize edilebilen MWM temel olarak 3 basamaktan oluşan bir testtir. Bu aşamalar uygulanma sırası ile; habitasyon günü, eğitim günleri ve prob günüdür. Habitasyon günü platform su düzeyinin üstünde ve görülür haldedir. Eğitim günlerinde platform su yüzeyinin altındadır ve renk olarak ayırt edilemez. Prob gününde platform kaldırılır ve spatial bellek test edilir. Şekil 4.5'te MWM protokolünü oluşturan basamaklar şematize edilmiştir. Habitasyon ve eğitim günlerinde hayvanlar 4 kez havuzun farklı yönlerinden olmak üzere havuza atılırlar. Her bir trial 120 saniyedir. Trial boyunca platformu bulamayan hayvanlar 120 saniye sonunda platformda 20 saniye boyunca serbest olarak bırakılır. Trial sırasında platformu bulup, platforma

çıkılmış hayvanlar için trial sonlandırılır ve aynı şekilde 20 saniye platformda serbest gözlem yapmaları için bekletilirler. Prob günlerinde ise sadece 60 saniyelik 1 trial uygulanır. Habitasyon ve eğitim günleri öğrenmeyi test ederken hayvanın platforma çıkma süresi kullanılır. Prob gününde ise bellek test edilir ve hayvanın platform alanından geçme sıklığı ölçek olarak alınır (36, 37). Şekil 4.5’de MWM testi basamakları ile şematize edilmiştir.

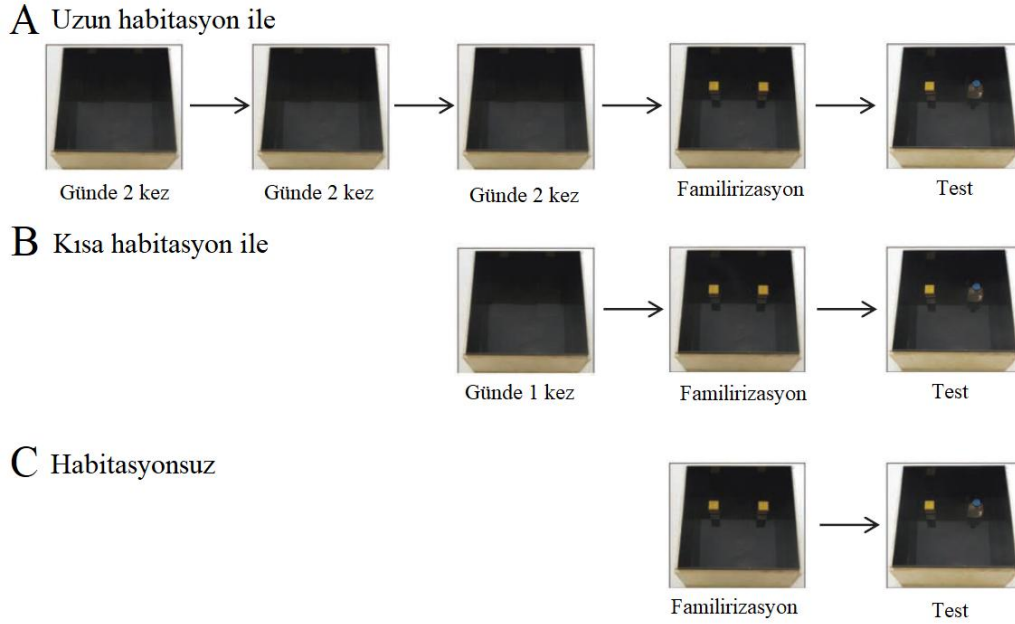


4.8 Novel Object Recognition Test

Novel object recognition test kemirgenlerde öğrenme ve özellikle tanıma belleğinin çalışmasında kullanılan davranış analizidir. Uygulaması çok basit olduğundan ve ek olarak motivasyon, ödül ya da ceza mekanizması gerektirmediği için sinirbilim çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (38).

Test düzeneği temel olarak 2 basamaktan oluşur; familirizasyon günü ve test günü. Familirizasyon gününde hayvan 2 adet aynı nesnenin bulunduğu açık alanda ortamı araştırmak üzere serbest bırakılır. Test gününde ise bu nesnelere biri farklı bir nesne ile değiştirilir. NOR testi hayvanın tanıdığı nesne yerine yeni nesneyi araştırma spontan eğilimine dayanır. Yeni nesneyi keşfetme tercihi öğrenmeyi ve tanıma belleğinin kullanımını yansıtır. Temel ve basit bir protokolü bulunan test hipoteze

göre modifiye edilebilir. Alanda bulunma süresi ve test tekrar sayıları değiştirilebilir. Şekil 4.6’da NOR testine ait çeşitli protokol alternatifleri şematize edilmiştir (39).



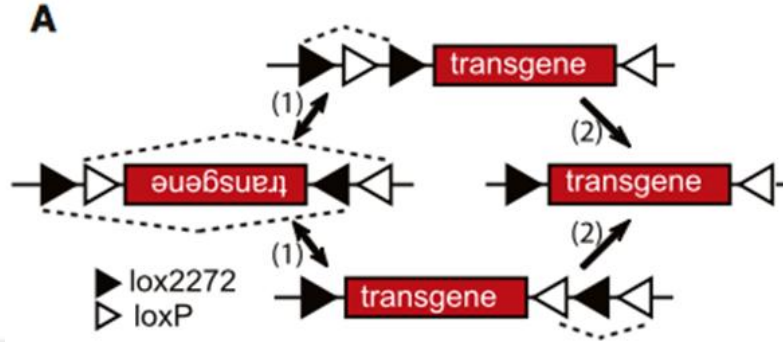
Şekil 4.6 Farklı NOR protokolleri

4.9 Hücre Tipi Spesifik Transgen İfadesi ve Transgenik Fare Modeli

Nöron alt gruplarının fonksiyonlarının belirlenebilmesi için hücre tipine özgü manipülasyon yapılması gerekmektedir. Örneğin, sadece Agrp nöronlarını işaretleyecek, enfekte edecek ve diğer nöron tiplerini geride bırakacak metotlar gerekmektedir. Hücre tipine spesifik işaretlenme yapılamaz ise farklı birçok nöron da işaretlenecek ve fenotipe sebebiyet veren nöron tipinin hangisi olduğuna karar verilemez. Bu durumu engellemek için hücre tipi spesifik transgen ifadesi metodundan yararlanılır (40).

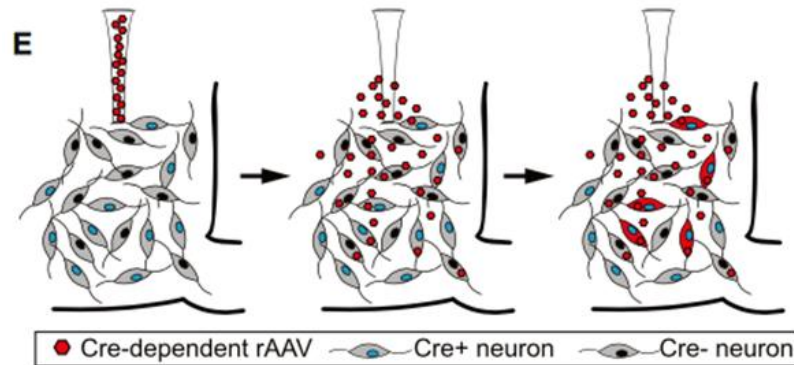
Cre (cause of recombination) enzimi ile bölge spesifik rekombinasyon sağlanır. LoxP (locus of crossing) 34 baz çiftlik DNA tanıma bölgesidir. Cre rekombinaz enzimi LoxP bölgesini tanıır. LoxP bölgeleri aynı DNA dizisi üzerinde ve zıt yönlü ise,

rekombinasyon ile terse çevirme işlemi gerçekleşir ve 2 LoxP dizisi arasındaki DNA dizisi ters çevrilir (Şekil 4.7) (40).



Şekil 4.7 Cre-Lox sistemi

Hücre tipi transgen ifadesini sağlamak için ilişkili hücre tipinde Cre enzimini ifade eden transgenik fareler üretilmektedir. Farelere intrakraniyel olarak enjekte edilen rekombinant adeno-asosiyasyon virüsü (rAAV) Lox dizisi içerir. Stereotaksik olarak rAAV enjeksiyonu yapılan Cre ifade eden transgenik farelerde hücre tipine özgü gen ekspresyonu gerçekleşir. Sadece Cre enzimi bulunan hücreler rAAV ile verilen geni ifade eder, öte yandan diğer hücreler işaretlenmez (Şekil 4.8) (41).

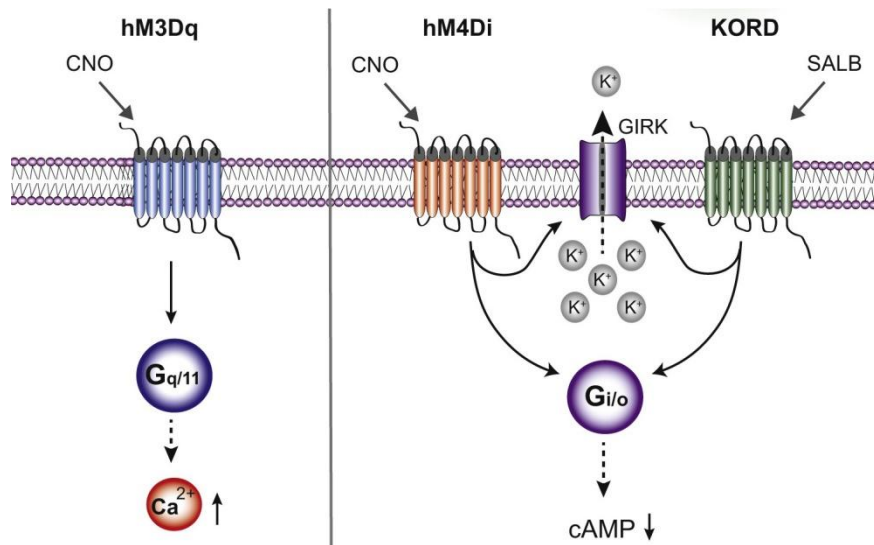


Şekil 4.8 Hücre tipi spesifik transgen ifadesi

Bu çalışmada spesifik olarak Agrp nöronlarını uyarabilmek için Cre enzim ifadesi olan *Agrptm1(cre)Lowl/J* fareler kullanılmıştır. LoxP dizileri rAAV ile intrakraniyal olarak enjekte edilmiştir.

4.10 Kemogenetik Manipülasyon

Rekombinant adeno-asosiy virüs (rAAV) ile enfekte edilmiş Agrp-Cre transgenik farelerin Agrp nöronlarına spesifik akut olarak DREADD (Dizayn Edilmiş İlaçları Aktive Eden Dizayn Edilmiş Reseptörler) teknolojisi ile uyarılmıştır. DREADD teknolojisi kemogenetik manipülasyonu mümkün kılmaktadır. Hücre tipi transgen ifadesi ile ilişkili hücrelere tasarlanmış G-protein bağlı reseptörler verilir. Bu reseptörler o hücrelerde eksprese edilir ve uzaktan manipülasyon mümkün hale gelir. hM3Dq, aktivatör Gq protein bağlı reseptör, hM4Di ise inhibitör Gi protein bağlı reseptördür. hM3Dq reseptörü aktive olduğunda hücrenin ateşlemesini sağlarken, hM4Di reseptörü hücreyi susturmakla görevlidir. Bu reseptörler hücreye verildiğinde inaktif haldelerdir. Aktif hale geçmeleri içinse Clozapine-N-Oksit (CNO) adı verilen liganda ihtiyaç duyarlar. Farelere intraperitoneal (i.p.) olarak CNO enjektisi durumunda hM3Dq veya hM4Di reseptörleri aktif hale geçerler (Şekil 4.9) (40). Bu manipülasyonun etki süresi kısadır. CNO'nun yıkımı ile reseptörler tekrardan inaktif hale dönerler.



Şekil 4.9 DREADD metoduyla kemogenetik manipülasyon

5. MATERYAL VE METOT

5.1. Materyal

Deneyle süresince kullanılan kimyasal ve biyolojik materyaller Tablo 5.1 de , kullanılan cihaz ve gereç listesi ise Tablo 5.2 de verilmiştir.

Tablo 5.1. Biyolojik Materyaller ve Kimyasallar

Biyolojik Materyaller ve Kimyasallar	Marka	Ürün Kodu
LB Agar	Biomatik	A8523-500G
LB Broth	Biomatik	A8523-500G
OneShot Stbl-3 Kompetant <i>E.coli</i> hücre hattı	Life Technologies	C737303
Primerler	Sentegen	
AAV plazmitleri	Addgene	
293AAV hücre hattı	Cell BioLabs	AAV-100
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
Magnezyum Klorür ($MgCl_2$)	Sigma-Aldrich	208337
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 Mountin Medium	Sigma-Aldrich	F4680
LMA Agaroz	Reducta	8060
Triton X-100	Sigma-Aldrich	X100
Trizma® HCl	Sigma-Aldrich	T3253
Clozapine N-Oxide	Enzo LifeSciences	BML-NS105
Sükroz	Sigma-Aldrich	0389
Dekstroz	Sigma-Aldrich	D9434
Sodyum Askorbat (C ₆ H ₇ NaO ₆)	Sigma-Aldrich	PHR1279
Opti-MEM Reduced Serum Medium	Life Technologies	51985-034
Ensure® TwoCal Strawberry	Abbott	S16630
Beyaz Gıda Boyası		

Tablo 5.2. Cihaz ve Gereç Listesi

Kullanılan Gereçler	Marka	Ürün Kodu
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
0,2 mL PCR tüp	Isolab	123.01.002
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
Ultrasonikator	Bandelin Sonarex	
Vorteks	Benchmark Scientific	BV1000
Konfokal Mikroskop	Zeiss	LSM-780
Vibratom	Leica	VT1000S
Mikropipet Çekici	Sutter Instruments	P-1000
Open Field Maze	Atasoy Behavior	
Morris Water Maze	Atasoy Behavior	

5.2 Metotlar

5.2.1 Deney hayvanları

Jackson Laboratuvarı'ndan temin edilen hemizigot *Agrptm1(cre)Lowl/J* bir diğer adıyla *Agrp-cre* erkek transgenik fare, dişi C57BL/6 yabani tip dişiler ile çaprazlanılarak üretildi. 21-28 günlük arası belirli boyutlara ulaşmış yavru farelerin kulaklarından, anestezi altında genotipleme için doku örnekleri alındı. Genotipleme işlemi sonucunda belirlenen transgenik dişi ve erkek fareler ayrıldı. Deneylerde kullanılacak, anne sütünden kesilmiş 50 erkek transgenik fare beşer kişilik kafeslere ayrıldı. Transgenik fare bakım ve üretimi İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırma Merkezi tarafından (MEDİTAM) gerçekleştirilmiştir. Hayvan deneyleri, İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İMÜ-HADYEK) tarafından onaylanmıştır.

5.2.2 Genotipleme işlemi

Doğumdan itibaren annelerinin yanında yaşayan süttten kesilmemiş 21-28 günlük fare yavrularına kulaklarından alınan doku örnekleri kullanılarak genotipleme yapıldı.

5.2.2.1 DNA eldesi

Doku örneği toplanmak üzere yavru fareler anestezi altına alındı. Anestezi altındaki yavruların bir kulağına numaralı kulak küpesi takılırken, diğer kuağından kulak delme pensi yardımı ile doku örneği alındı. Alınan doku örnekleri 75 µL 25mM NaOH/EDTA içeren 0,2 mL PZR tüplerine aktarıldı. Tüpler 1 saat 98°C sıcaklıkta T100™ Thermal Cycler PZR cihazında homojenize edildi. Homojenizasyon işlemi sonrasında tüplere 75 µL 40 mM Tris/HCl eklendi ve 3 dakika 4000 rpm hızında santrifüj edilip, DNA içeren süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı.

5.2.2.2 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Elde edilen supernatant içindeki DNA aşağıda belirtilen malzemeler ile karıştırılarak PZR karışımı hazırlandı. Tüm DNA örnekleri için ayrı ayrı kontrol ve transgenik PZR karışımı hazırlandı. Son olarak 1 tüp negatif kontrol olarak DNA konulmadan bırakıldı. Ardından, tüm tüplerde son hacim ddH₂O ile 12 µL'ye tamamlandı.

Tablo 5.3. Kontrol PZR karışımı

Gereç	Son Konsantrasyon
10X Reaksiyon tampon çözeltisi	1X
Ortak primer	0,5 µM
İç pozitif kontrol geri primer	0,5 µM
dNTP Solüsyon Karışımı	200 µM
Taq Polimeraz	1,25 unit/50 µl PCR
DNA	
ddH ₂ O	

Tablo 5.4. Transgenik PZR karışımı

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

Tablo 5.5. Kullanılan Primer Dizileri

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

Hazırlanan PZR karışımı aşağıda belirtilen PZR protokolü uygulanmak üzere T100™ Thermal Cycler cihazına koyuldu.

Tablo 5.6. PZR 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 elektroferesi ve görüntülenmesi

40 mM Tris, 20 MM Glasiyal asetik asit, 1 Mm pH:7,6 EDTA karışımından oluşan 100 μ L 1X TAE tampon çözeltisine 3 gr agaroz eklendi ve agaroz çözününceye dek

200°C’de kaynatıldı. Berraklaşmış çözeltiliye 5 µL Safeview eklenerek yükleme tarakları takılmış elektroforez kasetine döküldü. Jel kıvamına geldiğinde 1X TAE tampon çözeltisi ile doldurulmuş elektroforez tankına yerleştirildi. Birinci kuyucuğa 5 µL belirteç yüklenirken, diğer kuyucuklara ise 9 µL PZR ürünü 1 µL yükleme boyası ile karıştırılarak yüklendi. 20 dakika 100V’da yürütüldü. Yeteri kadar yürüyen jel BioRAD ChemiDoc cihazında görüntülendi. Görüntüleme sonucu çıkan bant uzunluklarına göre doku örneği alınan farelerin transgenik olup olmadığı belirlendi.

5.2.3 Rekombinant adeno-asosiy virüs üretimi

Rekombinant adeno-asosiy virüs üretimi için gereken plazmitler Addgene firmasından temin edildi. Stb13 *E. coli* transformasyonu ile temin edilen plazmitler bakteriyel sürüntü halinde temin edildi.

5.2.3.1 Plazmit DNA çoğaltma

35 gr/L oranında H₂O ile karıştırılan LB agar çözeltisi otoklavlanarak sterilize edildi. Soğutulduktan sonra karışıma 100 µg/mL ampisilin eklenerek antibiyotik direnci sağlandı. LB agar, 10 cm polistiren petri kaplarına 2/3’ünü kaplayacak halde dolduruldu ve donmak üzere bırakıldı. Plazmitler katılmış agara yayılarak petriler gece boyu 37°C’de bekletildi. Ertesi gün petri yüzeyinde oluşan bakteri kolonileri öze yardımı ile toplandı ve önceden otoklav ile sterilize edilip hazırlanan 20 g/L LB sıvı besisi yerine aktarıldı. Sıvı besisi yerine aktarılan bakteriler 37°C, 250 rpm koşullarında logaritmik olarak çoğaltılmaya bırakıldı. 18 saatin sonunda yeterli sayıya ulaşan bakteriler 4°C 6000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilip süpernatant atıldı. Bakterileri içeren çökelti -80°C’de donduruldu. Bu işlemler ana vektör, yardımcı vektör 2/1 ve yardımcı vektör helper için tekrar edildi.

5.2.3.2 DNA izolasyonu

Ana vektör, yardımcı vektör 2/1 ve yardımcı vektör helper plazmitlerini içeren çökelti çözündürüldü. Çökeltilerden elde edilecek DNA'lar Qiagen Endofree Plasmid Kit (Qiagen, 12362) ile izole edildi. Elde edilen DNA'ların konsantrasyon tayini SpektraMax cihazı ile yapıldı. Bu işlemlerin her biri ana vektör, yardımcı vektör 2/1 ve yardımcı vektör helper için tekrar edildi.

5.2.3.3 293AAV hücre transfeksiyonu

Rekombinant adeno-asosiye virüs üretimi için özelleşmiş olan 293AAV hücre hattı Cell BioLabs firmasından satın alındı (Cell BioLabs, AAV-100). 293AAV hücreleri 10x10 cm petri kaplarına ekilerek 37°C, %5 CO₂, %20 O₂ koşulları altında inkübatörde büyütüldü. Petrideki hücreler %70-80 doluluk oranına ulaştığında pasajlanarak çoğaltıldı. Hücre sayısı yeterli miktara ulaştığında ise hücreler transfeksiyon için hazırlandı. 24 µg yardımcı vektör helper, 20 µg yardımcı vektör 2/1, 12 µg ana vektör Opti-MEM transfeksiyon medyumuna ve polietilenimin transfeksiyon ajanı steril bir tüp içine alınarak karıştırıldı. Bu karışım hücrelerin üzerine eklenerek 72 saat boyunca 37°C, %5 CO₂, %20 O₂ koşulları altındaki inkübatörde inkübasyona bırakıldı. 72 saat ardından hücreler toplanılarak 5 dakika 4°C 1100 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant atılarak hücreleri içeren çökelti -80°C'de donduruldu.

5.2.3.4 Pürifikasyon

Elde edilen hücre çökeltisi 1050 mM NaCl, 20 mM Tris (pH=8,0) içeren 9 mL steril liziz çözeltisi ile karıştırıldı. Hücreler ilk olarak kuru buz-%70 EtOH karışımında sonra ise 37°C su banyosunda 2'er dakika bekletildi. Bu işlem 3 kez tekrar edildi. Bu işlem ardından hücreler 3 dakika boyunca sonikatörde tutuldu. Bu yolla hücrelerin içinde bulunan virüsler açığa çıkartıldı. Ardından pürifikasyon işlemi için 1 mM MgCl₂ ve 250 U/mL Benzonase (Sigma E8263-25K) eklendi. 20 dakika

boyunca 4°C 4000 rpm’de santrifüj edildi. 5 mL 10x PBS, 0,05 mL 1M MgCl₂, 0,125 mL 1M KCl, 10 mL 5M NaCl, 12,5 mL Iodixanol ve 50 mL’ye kadar H₂O içeren %17’lik çözelti; 5 mL 10x PBS, 0,05 mL 1M MgCl₂, 0,125 mL 1M KCl, 0,1 mL Iodixanol, 0,1 mL % 0,5 fenol kırmızısı ve 50 mL’ye kadar H₂O içeren %25’lik çözelti, 5 mL 10x PBS, 0,05 mL 1M MgCl₂, 0,125 mL 1M KCl, 10 mL 5M NaCl, 33,3 mL Iodixanol ve 50 mL’ye kadar H₂O içeren %40’lık çözelti ve 0,05 mL 1M MgCl₂, 0,125 mL 1M KCl, 50 mL Iodixanol ve 0,025 mL % 0,5 fenol kırmızısı içeren %60’lık çözelti hazırlandı. Sırası ile 3 mL %60’lık çözelti, 5 mL %40’lık çözelti, 6 mL %25’lik çözelti, 6 mL %17’lik çözelti ve hücre lizatı Optiseal ultrasantrifüj tüplerine (Beckman 36625) şırınga yardımı ile yavaş bir şekilde damlatıldı. 18°C’de 90 dakika boyunca 60000 rpm’de santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrasında virüsler %40’lık çözelti katmanında birikti. Önceden ısıtılmış 1 L’inde 100 mL 10x PBS, 50 gr D-Sorbitol, 42,4 mL %5 NaCl içeren 1x saklama tampon çözeltisi ile ıslatılan Amicon 100K filtreli kolonlara (Milipore, UFC910024) %40’lık çözelti içeren katman eklenerek 1x saklama tampon çözeltisi ile 15 mL’ye tamamlandı. 30 dakika boyunca 4°C 3500 rpm’de santrifüj edildi. Bu işlem 1x saklama tampon çözeltisi eklenerek 2 defa daha tekrarlandı. Filtre üstünde kalan virüsler toplandı ve -80°C’de donduruldu.

5.2.4 İntrakraniyal rekombinant adeno-asosiy virüs enjeksiyonu

İstanbul Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi’nde üretilen rekombinant adeno-asosiy virüsler 30 günlük *Agrp-cre* transgenik farelerin hipotalamik arkuat çekirdek bölgelerine aşağıda belirtilen metod ile intrakraniyal olarak enjekte edildi.

Fareler stabil anestezi altında stereotaksik çerçeveye sabitlendi. Kafanın sabit ve düz olduğundan emin olduktan sonra kafa derisi Betadin ile temizlenerek bistüri yardımıyla kesildi. Kafatasına uygulanan hidrojen peroksit ile kemikler görünür hale getirildi. Kafatası hidrojen peroksitten arındırıldıktan sonra SteREO Discover V8 mikroskop altında Bregma noktası bulunarak koordinat değerleri sıfırlandı. Narishige manipulator yardımıyla Arkuat çekirdek (Arc) bölgesi için koordinatlar

Anterior/Posterior(A/P): -1,3 cm ve Medial/Lateral(M/L): 0,25 cm olacak şekilde belirlendi. Kafatası bu noktada freze yardımı ile delindi. Aynı sırada, Sutter P-100 Mikropipet çekici ile cam mikropipetler ısı yardımı ile inceltirilerek hazırlanan cam mikropipetlerin içi mineral yağ dolduruldu. Narishige enjektöre takılan mikropipetler rekombinant adeno-asosiyale virüs ile dolduruldu. Belirlenen A/P ve M/L koordinatlarında beyin yüzeyi Dorsal/Ventral (D/V) olarak sıfırlandıktan sonra beyin içinde mikropipet D/V: -5,6 cm derine ilerletildi. Narishige enjektör ile 300 nL enjeksiyon yapıldı. 10 dakikalık bekleme süresi ardından cam mikropipet beyin içinden yavaşça çıkarıldı ve kafa derisi alındı. İntrakraniyel sonrası fareler, 14 günlük enfeksiyon süresince operasyon sonrası bakımında tutuldular.

5.2.5 Davranış deneyleri

5.2.5.1 Besin tüketim ölçümü

30 günlük *Agrp-cre* transgenik fareler kontrol ve deney grubu fareleri olmak üzere 2 gruba bölündü ve intrakraniyel olarak test grubu farelerine rAAV-hSyn-FLEX-hM3D(Gq)-mCherry virüsü enjekte edilirken, kontrol grubu farelerine rAAV-FLEX-GFP virüsü enjekte edildi. 14 günlük bakım süresi boyunca *Agrp* hücreleri enfekte edildi. Enfeksiyon süresi sonrasında fareler tekli kafeslere alındı ve bu kafeslere alışmaları için 3 günlük süre tanındı. Alışma süresi sonrası, farelerin günlük besin tüketimi takibe alındı. Günlük besin alımları stabil hale geldiği zaman *ad libitum* olarak davranış deneylerine başlandı. Saat 07.00'de başlayan gündüz döngüsü ile farelerin besin tüketimi 30 dakika aralıklarla 2 saat boyunca takip edildi. 2 saat ardından 300µL hacminde Tablo 5.7'de belirtilen intraperitoneal (i.p.) enjeksiyonlar yapıldı;

Tablo 5.7 Agrp aktivasyonu için gündüz döngüsü için i.p. enjeksiyonları

Gün	Saat	i.p. enjeksiyon
1	09.00	% 0,9 NaCl + 5 mg/kg EtOH
3	09.00	% 0,9 NaCl + 5 mg/kg CNO
5	09.00	% 0,9 NaCl + 5 mg/kg CNO

Plasebo günü deney grubu farelere % 0,9 NaCl + 5 mg/kg EtOH, deney günü ise % 0,9 NaCl + 5 mg/kg CNO i.p. olarak enjekte edildi ve enjeksiyon sonrası 30 dakika aralıklar ile 2 saat süresince besin tüketimleri takip edildi.

5.2.5.2 Deney gruplarının oluşturulması

Her biri tekli ve eşdeğer kafeslerde bulunan ve besin takibi yapılan 40 transgenik fare ağırlık ve yaş oranı eşit olacak şekilde Tablo 5.8’de verilen üzere gruplandırıldı;

Tablo 5.8 Deney gruplandırması

Grup adı	Hayvan sayısı	Enfeksiyon çeşidi
Kontrol	10	GFP
Açlık	10	GFP
Test +	10	hM3D(Gq)-mCherry
Test -	10	hM3D(Gq)-mCherry

Açlık grubu fareleri deneylerden önce 16 saat açlığa tabi tutuldular. Kontrol, test + ve test – grubu farelerin ise yeme erişimleri serbest halde bırakıldı.

5.2.5.3 Morris Water Maze (MWM)

Deneyler başlatılmadan 2 gün önce 1470 mm çapındaki Morris Water Maze havuzu çeşme suyu ile dolduruldu ve gece boyu ısınmaya bırakıldı. 17 gün boyu süren deneyin ilk günü havuz suyuna hiç bir şey eklenmez iken geri kalan günler suya opak

olmasına yetecek miktarda beyaz gıda boyası eklendi. Deneyler boyunca havuz suyu belli bir seviyede ve oda sıcaklığında tutuldu.

Besin tüketim takibi yapılan tekli kafesteki fareler deneyden 16 saat önce bölüm 5.2.5.2’de belirtildiği üzere muamele edildi. Açlık grubundaki farelerin kafeslerinden besinleri çekilirken suya erişimleri serbest halde bırakıldı. Kontrol ve deney grupları ise yeme ve suya erişimi serbest halde geceyi geçirdiler. Gündüz döngüsü başladıktan 2 saat sonra, saat 09.00’da deney gruplarına Tablo 5.10’de verilen şekilde i.p. enjeksiyonları yapılarak uyarım sağlandı.

Morris Water Maze testi uygulanırken Tablo 5.9’da gösterildiği gibi 18 günlük bir takvim kullanıldı. Alıştırma, habitasyon ve prob günleri fareler havuza birer kez atılır iken, eğitim günlerinde ise 4 kez sıra ile atıldılar. Deney günleri boyunca fareler Tablo 5.11’de verilen sıra ile havuzda yüzdürüldü (36).

Tablo 5.9 MWM takvimi

Deney günü	Günler
Alıştırma	-1. gün
Habitasyon	0. gün
Eğitim	1-4 gün
Kısa dönem hafıza + prob	5. gün
Kısa dönem hafıza - prob	6. gün
Uzun dönem hafıza + prob	15. gün
Uzun dönem hafıza - prob	16. gün

Tablo 5.10 MWM için i.p. enjeksiyonları

Grup adı	i.p çeşidi	Deney günü
Kontrol	% 0,9 NaCl + 5 mg/kg CNO	Habitasyon, eğitim, kısa dönem hafıza + prob, uzun dönem hafıza + prob
Açlık	% 0,9 NaCl + 5 mg/kg CNO	
Test +	% 0,9 NaCl + 5 mg/kg CNO	
Test -	% 0,9 NaCl + 5 mg/kg EtOH	

Kontrol	% 0,9 NaCl + 5 mg/kg EtOH	
Açlık	% 0,9 NaCl + 5 mg/kg EtOH	kısa dönem hafıza - prob,
Test +	% 0,9 NaCl + 5 mg/kg EtOH	uzun dönem hafıza - prob
Test -	% 0,9 NaCl + 5 mg/kg CNO	

Tablo 5.11 MWM havuzda yüzdürme sırası

Gün	1.sıra	2.sıra	3.sıra	4.sıra
0	Kuzey	Kuzeydoğu	Güneydoğu	Kuzeybatı
1	Güneydoğu	Kuzey	Kuzeybatı	Doğu
2	Kuzeybatı	Güneydoğu	Doğu	Kuzey
3	Doğu	Kuzeybatı	Kuzey	Güneydoğu
4	Güneydoğu	Güneydoğu	Doğu	Kuzeybatı

Alıştırma gününde, fareler i.p. enjeksiyonu yapılmadan 120 saniye boyunca gıda boyası eklenmemiş ve platformsuz havuzda yüzdürüldü ve su ile ilk kez tanışmaları sağlandı. Geri kalan günlerde havuz suyuna gıda boyası eklenerek havuzun renginden suyun rengi ayırt edilebilir hale getirildi. Habitasyon gününde, platform su seviyesinin üstünde idi ve renk olarak suyun rengi olan beyazdan ayırt edilebilmesi için siyah renk platform kullanıldı. Eğitim günlerinde, su seviyesi platform seviyesinin 5 cm üzerine taşırıldı ve beyaz platform kullanılarak sudan ayırt edilebilirliği ortadan kaldırıldı. 0-4. günler fareler 120 sn boyunca 4 kez suda yüzdürüldü. Deneyler sırasında ANY-Maze, Stoelting davranış takip sistemi kullanıldı. 120 sn içinde platformu bulamayan fareler 120 sn sonunda platforma yerleştirilerek 20 sn boyunca ortamı gözlemlemeleri sağlandı. 120 sn bitmeden önce platformu bulan farelerde ise kayıt manuel olarak durdurulup 20 sn beklendi. Prob günlerinde, platform havuzdan kaldırılıp fareler 60 sn boyunca havuzda yüzdürülüp, platform bölgesine giriş sayıları kayıt altına alındı.

5.2.5.4 Novel Object Recognition Test

Morris Water Maze deneyinden çıkan fareler 1 haftalık dinlenme süresine tabi tutuldular. Novel object recognition (NOR) testinde, MWM’de kullanılan farklı olarak deney gruplarından test- grubu bu teste tabi tutulmadı. NOR testi habitasyon, alıştırma ve test günü sıralaması ile uygulandı. Test için 40 cm x 40 cm open field kullanıldı. Deneyler sırasında ANY-Maze, Stoelting davranış takip sistemi kullanıldı. Fareler habitasyon gününde alanı tanınmaları adına 15 dakika boyunca tamamen boş open field alanında serbest bırakıldı. Ertesi gün olan alıştırma gününde open field alanına duvarlara 5’er cm uzaklığa eşdeğer 2 adet pinpon topu yerleştirildi ve fareler 15 dakika boyunca keşif için alanda serbet bırakıldı. Son gün olan test gününde ise eşdeğer pinpon toplarından bir tanesi yeni obje olarak zeka küpü ile değiştirildi ve fareler 15 dakika boyunca alanda keşfe bırakıldı. Hayvanların yeni objeye olan ilgisini ölçmek adına Tablo 5.12’de verilen ölççekler kullanılarak değerdendirmeler yapıldı.

Tablo 5.12 NOR testinde kullanılan değerdendirme ölççekleri

Toplam kat edilen mesafe
Ortalama hız
Open field alanına girme sayısı
Open field alanında geçirilen zaman
Obje çevresindeki alana girme sayısı
Obje çevresindeki alanda geçirilen zaman
Objenin alanına hayvanın kafasının girme sayısı
Obje alanına yakınlama zamanı
Obje alanından uzaklaşma zamanı

5.2.6 Doku fiksasyonu ve kesit alma

Davranış deneyleri sona erdikten sonra farelere, fosfat tamponlu tuz çözeltisi ve %4 paraformaldehit fiksatif (PFA) ile kardiyak perfüzyon uygulandı. Sakrifiye edilen farelerin beyinleri çıkarıldı ve ilk olarak %4’lük PFA içinde 4 saat bekletildi. 4 saat

ardından %30'luk sükröz çözeltisi içine alınarak kesit alma işlemine dek bu çözelti içinde bekletildi.

Kesit alma işlemi için sükröz içinde bekletilen beyinler ilk olarak, 10 mL H₂O içine 0,4 gramı eklenerek hazırlanan düşük donma sıcaklığına sahip agaroz çözeltiye gömüldü ve jel kıvamına gelene kadar katılaşmaya bırakıldı. Jel kıvamına geldikten sonra VT1000S vibratom ile 75 µm kalınlığında kesitler alındı.

5.2.7 Görüntüleme

Bilateral olarak hM3d(Gq)-mCherry ve GFP virüs enjeksiyonları yapılan ve davranış deneyleri tamamlanmış olan farelerin beyinleri bölüm 5.2.6'da belirtildiği gibi kardiyak perfüzyon ile çıkartıldıktan sonra vibratom ile 75 µm'lik kesitleri elde edildi. Elde edilen beyin kesitlerinden hipotalamik arkuat çekirdek bölgesini içeren kesitler konfokal mikroskop ile görüntüledi.

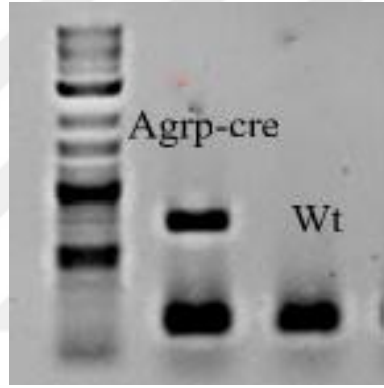
5.2.8 İstatiksel analiz

İstatiksel analizler, GraphPad Prism (RRID:SCR_002798, GraphPad, San Diego, CA) programı kullanılarak yapıldı. Tüm değerler ± standart hata olarak gösterildi. $p > 0,005$; istatiksel olarak anlamsız olarak kabul edildi ve $p < 0,005$;*, $p < 0,001$;**, $p < 0,0001$;*** olarak gösterildi.

6.BULGULAR

6.1 Genotiplleme İşlemi

Doğumdan itibaren annelerinin yanında yaşayan süttten kesilmemiş 21-28 günlük fare yavrularına kulaklarından alınan doku örnekleri kullanılarak genotiplleme yapıldı. Sırası ile DNA eldesi, PZR ve agaroz jel elektroferezi işlemleri sonucu farelerin transgenik olup olmadığı belirlendi (Resim 6.1). Transgenik farelerden seçilen aynı doğum tarihli, erkek fareler ile deney grupları oluşturuldu ve deneyler yapıldı.



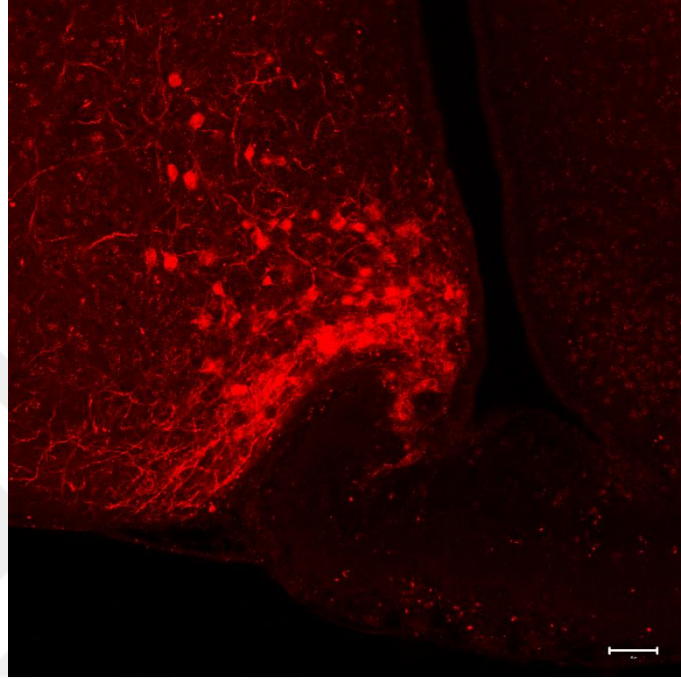
Resim 6.1 *Agrp-cre* transgenik ve C57BL/6 yabanıl tür farelerin genotiplleme sonucu

6.2 Hipotalamik *Agrp* Nöronlarının Görüntelenmesi

Aynı doğum tarihli ve benzer kiloya sahip erkek, transgenik farelere stereotaksik olarak intrakraniyel rekombinant adeno-asosiye virüs enjeksiyonları yapıldı. rAAV-hSyn-FLEX-hM3D(Gq)-mCherry ve rAAV-FLEX-GFP virüsleri ile enfekte edilen fareler operasyon sonrası bakımdan sonra davranış deneylerinde kullanılmak ve görüntüleme işleminde kullanılmak üzere ayrıldılar.

hM3DGq-mCherry ve GFP virüsü ile enfekte fare beyinleri kardiyak perfüzyon sakrifiye yöntemi ile çıkarıldı. Sakrifiye beyinler sırası ile %4'lük PFA içinde 4 saat ve %30'luk sükröz çözeltisi içinde kesit alma işlemine dek bekletildi. Kesit alma işlemi VT1000S vibratom ile yapıldı ve 75 µm'lik kesitler alınarak lamellere

aktarılıp fikse edildi. Görüntüleme işlemi axizoom mikroskop ve konfokal mikroskopta 588 nm lazer altında yapıldı (Resim 6.2). *Agrp-cre* farelerin hipotalamik arkuat çekirdeklerinde enfeksiyon ve hücre tipi spesifik işaretlenme gözlemlendi.

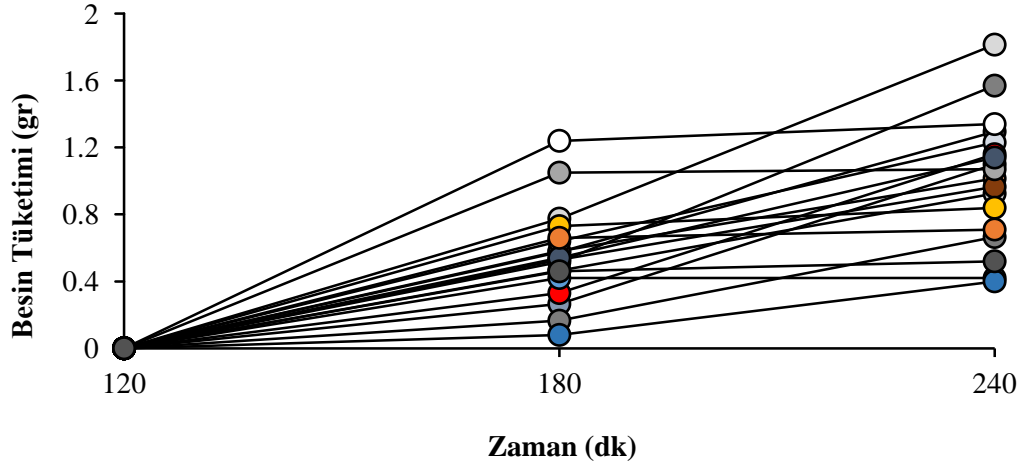


Resim 6.2 hM3DGq-mCherry enfeksiyonu konfokal mikroskop görüntüsü

6.3 Davranış Deneyleri

6.3.1 Besin tüketim takibi

Agrp nöronlarının kemogenetik uyarıya verdikleri dramatik tepki günümüze dek yapılan çalışmalarla literatüre geçmiştir. Bu çalışmada da rAAV-hSyn-FLEX-hM3D(Gq)-mCherry virüs ile enfekte edilen fareler i.p. olarak CNO enjeksiyonu ile kemogenetik olarak uyarılmış ve i.p. enjeksiyon öncesi ve sonrası 2 saatlik besin tüketimleri takip edilmiştir. hM3DGq-mCherry ile enfekte hayvanların besin tüketim grafiği Şekil 6.1’de gösterilmiştir. Yapılan tartımlara göre i.p. CNO enjeksiyonu sonrası farelerde akut olarak besin tüketiminde artış gözlenmiştir. 2 saat içinde hayvanlar 0,4 gram ile 2,0 gram arasında besin tüketmişlerdir.

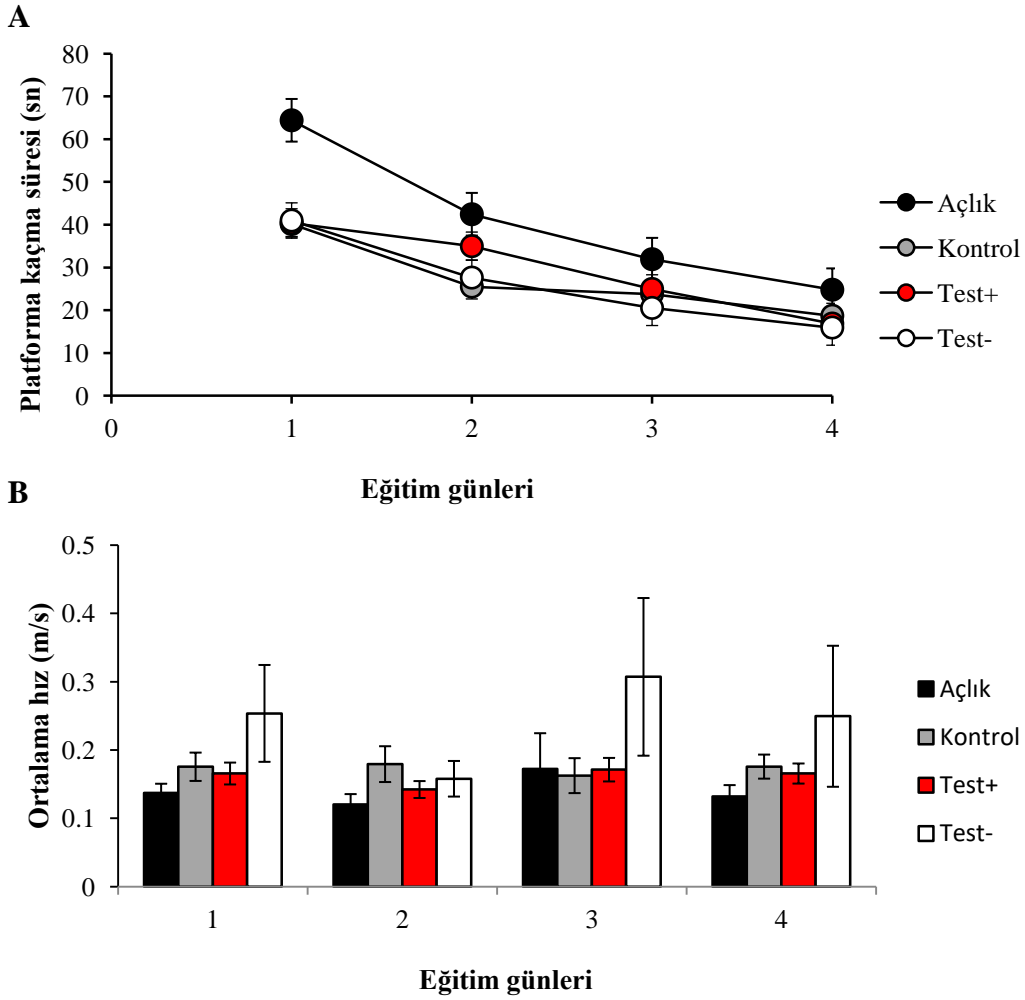


Şekil 6.1 Kemogenetik olarak Agrp nöronlarının uyarımı sonrası besin tüketim takip grafiği (her bir renk bir hayvanı temsil etmektedir.)

6.3.2 Morris Water Maze

Açlık, kontrol, test+ ve test- olarak 4 gruba bölünen hayvanlar davranış deneylerinden ilk olarak MWM’de test edilmişlerdir. Habitasyon günü ile birlikte 5 gün boyunca günde 4 trial olarak havuzda platformun yeri öğretilen hayvanların her biri eğitim gününde ANY-Maze, Stoelting davranış takip sistemi ile izlenmiş ve testler kayıt altına alınmıştır. Eğitim günlerinde hayvanların öğrenme düzeyleri test edilmiştir ve değerlendirme ölçüsü olarak platforma kaçma süresi kullanılmıştır (Şekil 6.2).. Yapılan analizler sonucu 4 grubun da platformun yerini öğrenme düzeyi benzer olarak değişim gösterdiği görülmüştür. Hayvanların 1. eğitim gününden 4. eğitim gününe sırasıyla şu sürelerle platforma çıkma süreleri; açlık grubunda 64,3 sn., 42,4 sn., 31,9 sn. ve 24,7 sn., kontrol grubunda 40,1 sn., 25,5 sn., 23,7 sn. ve 18,6 sn., test+ grubunda 40,3 sn., 34,9 sn., 24,9 sn. ve 16,8 sn. ve test- grubunda 40,9 sn., 27,6 sn., 20,5 sn. ve 15,9 sn.dir (Şekil 6.2 A). Agrp nöronları aktif olan test+ grubu, Agrp nöronları uyarılmamış test-, ve kontrol grubu farelerin öğrenme düzenleri ve hızlarının benzer olduğu görülürken, fizyolojik olarak açlık yaşayan açlık grubu farelerinin ise hızında bir yavaşlık olduğu ancak öğrenme oranı olarak

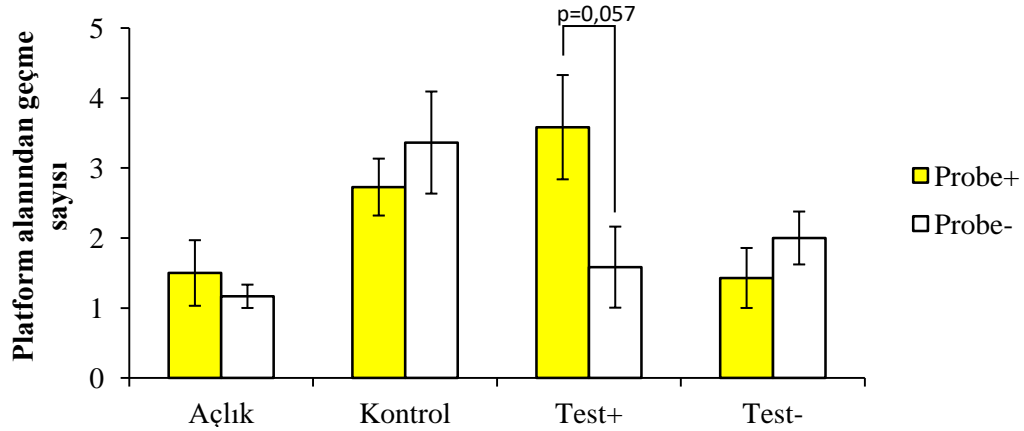
diğer gruplar ile aynı trendi izlediği gözlenmiştir. Hayvanların 1. eğitim gününden 4. eğitim gününe sırasıyla şu ortalama hızlarla havuzda yüzmüşlerdir; açlık grubu 0,13 m/sn., 0,12 m/sn, 0,17 m/sn ve 0,13 m/sn, kontrol grubu 0,17 m/sn, 0,17 m/sn, 0,16 m/sn ve 0,17 m/sn, test+ grubu 0,16 m/sn, 0,14 m/sn, 0,17 m/sn ve 0,16 m/sn ve test- grubu 0,25 m/sn, 0,15 m/sn, 0,3 m/sn ve 0,24 m/sn.dir. (Şekil 6.2 B)



Şekil 6.2 MWM eğitim günleri. A, öğrenme düzeylerini gösteren platforma kaçma süresi grafiği. B, havuz içinde ortalama yüzme hızı grafiği.

Spatial bellek değerlendirmesi için 4 eğitim gününden sonra prob günleri yapılmıştır. Prob günlerinde tek bir trial için havuza atılan farelerin havuzdan kaldırılan platform alanından geçme sayıları dikkate alınmıştır. Kısa dönem hafızayı yansıtmaması için eğitim günlerinden hemen sonra yapılan kısa dönem hafıza prob günlerinden birinde

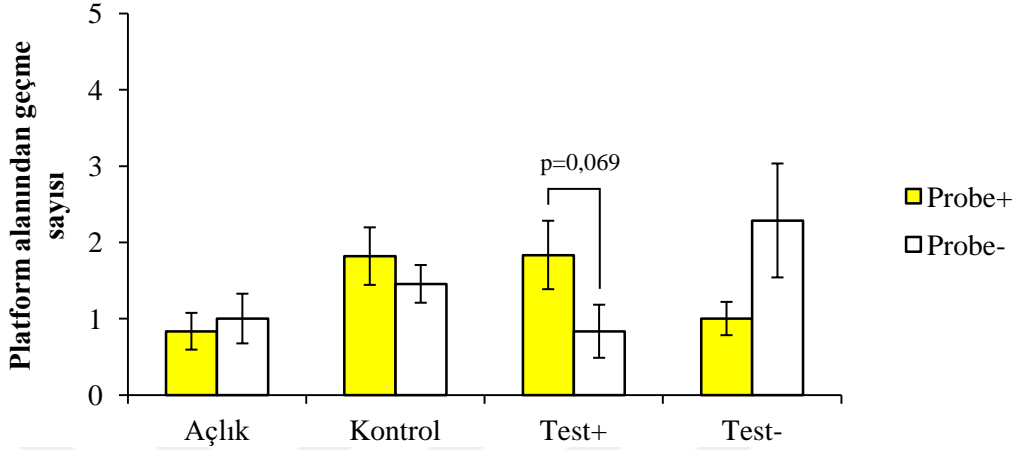
(prob+) Agrp nöronları CNO enjeksiyonu ile uyarılmış, diğerinde (prob-) ise uyarılmamıştır (Şekil 6.3). Yapılan analizlere göre, prob+ günü açlık grubu 1,5 kez , kontrol grubu 2,7 kez , test+ grubu 3,5 kez ve test- grubu 1,4 kez platform alanından geçerken prob- gününde sırasıyla 1,1 kez, 3,3 kez, 1,5 kez ve 2 kez platform alanından geçmişlerdir. Bu verilere göre Agrp nöronları aktif olarak eğitim gören hayvanlar (Test+ grubu) CNO gününde yani Agrp nöronları uyarıldığında placebo gününe kıyasla çok daha iyi hatırlamaktadırlar ($p=0,057$). Agrp nöronları uyarılmadan eğitim gören kontrol grubu ve fizyolojik olarak aç olan açlık grubu hayvanların CNO ve placebo günleri arasında hatırlama düzeyleri arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Agrp nöronları uyarılmadan eğitim gören test- grubu hayvanların ise CNO uyarısı ile Agrp nöronları ateşlediği zaman placeboya kıyasla daha az hatırladıkları gözlenmiştir. Ancak Test- grubunun CNO ve placebo günleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 6.3 Kısa dönem hafıza değerlendirme

Uzun dönem hafızayı değerlendirmek adına 15. günde CNO ile uyarılarak ve 16. Günde placebo ile yapılan prob analizlerinde kısa dönem hafızada test+ grubu hayvanlarda görülen bellek farkı devam etmiştir (Şekil 6.4). Yapılan analizlere göre, prob+ günü açlık grubu 0,8 kez , kontrol grubu 1,8 kez , test+ grubu 1,8 kez ve test- grubu 1 kez platform alanından geçerken prob- gününde sırasıyla 1 kez, 1,4 kez, 0,8 kez ve 2,2 kez platform alanından geçmişlerdir. Bu verilere dayanarak, test- grup

hayvanlarda CNO günleri placebo günlerine kıyasla daha az hatırlamıştır. Kontrol ve açlık gruplarında CNO ve placebo günleri arasında bellekte bir fark görülmemiştir.

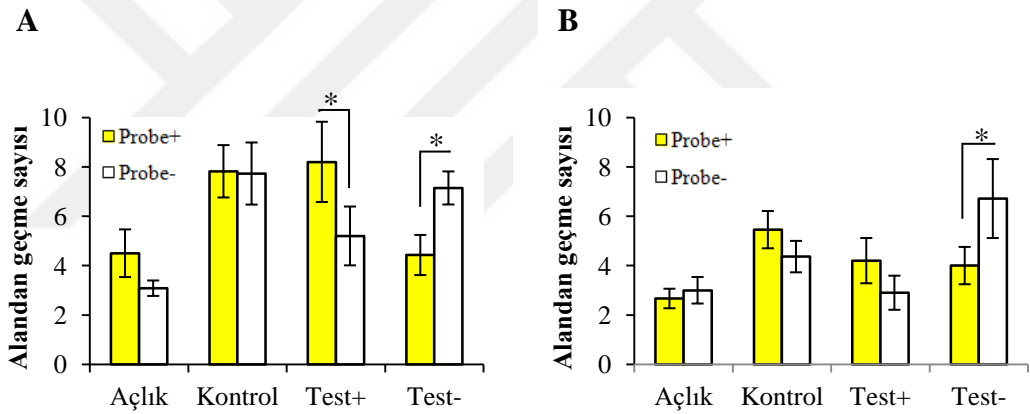


Şekil 6.4 Uzun dönem hafıza değerlendirme

Kayıtların analizleri yapılırken platform merkezli 147 mm yarıçaplı bir alan belirlendi ve hayvanların platform alanından geçmemiş olsa da platforma yakın mesafede ne kadar zaman harcadıkları analiz edildi. Şekil 6.5 A'da gösterildiği üzere, kısa dönem prob günlerinden ilki olan prob+ günü test+ grubu hayvanlar ortalama 8,2 kez alandan geçerken prob- günü 5,2 kez geçmiştir. Test- grubu hayvanlarda ise prob+ günü 4,4 kez geçerken prob- günü 7,1 kez geçerek alandan geçme sayısını arttırmıştır. Test+ ve test- grubu hayvanların kısa süreli bellek prob günleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,005$). Açlık ve kontrol grubunda yer alan hayvanlar ise sırayla olmak üzere prob+ gününde ortalama 4,5 kez ve 7,8 kez platform alanından geçerken, prob- gününde 3,08 ve 7,72 kez geçmiştir. Şekil 6.5 B'de ise uzun dönem bellek üzerine değerlendirme görülmektedir. Analizlere göre CNO ve placebo günleri arasında sadece test- grubu hayvanlarda bellekte anlamlı bir farklılık görülmüştür ($p < 0,005$). Agrp nöronları aktive edilmeden öğrenen hayvanlar CNO ile bu nöronları aktive edildiğinde 4 kez alandan geçerlerken, placebo ile uyarılmadığında alandan 6,7 kez geçişlerdir. Diğer grup hayvanlar arasında anlamlı bir fark bulunmazken prob + günü açlık grubunun 2,6 kez, kontrol grubunun 5,4 kez ve test+ grubunun 4,2 kez geçtiği gösterilmiştir. Prob-

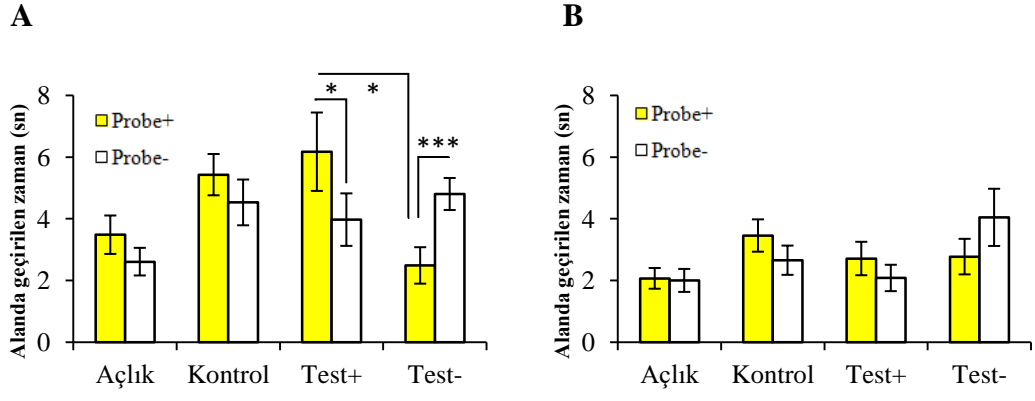
gününde ise sırayla 2,6 kez, prob-gününde ise 3 kez, 4,3 kez ve 6,7 kez geçtiği analiz edilmiştir.

Platform etrafındaki bu alanda geçirdikleri zamanda hesaplanmıştır ve grafik olarak Şekil 6.6'da aktarılmıştır. Kontrol ve açlık grubu hayvanların bu alanda geçirdikleri süre uzun dönem ya da kısa dönem bellek prob günlerinde kendi içinde değişikliğe neden olmamıştır. Kısa dönem CNO prob gününde alanda açlık grubu 3.4 sn., kontrol grubu 5.4 sn., test+ grubu 6.17 sn. ve test-grubu 2.4 sn. dururken kısa dönem placebo prob gününde sırasıyla 2,6 sn., 4,5 sn., 3,9 sn., ve 4,8 sn. geçirmektedir. Bu veriler arasından test+ grubu hayvaların CNO ve placebo günleri arasında, test-grubunun CNO ve placebo günleri arasında ($p<0,005$) ve CNO gününde test+ ve test- hayvanlar arasında ($p<0,001$) istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

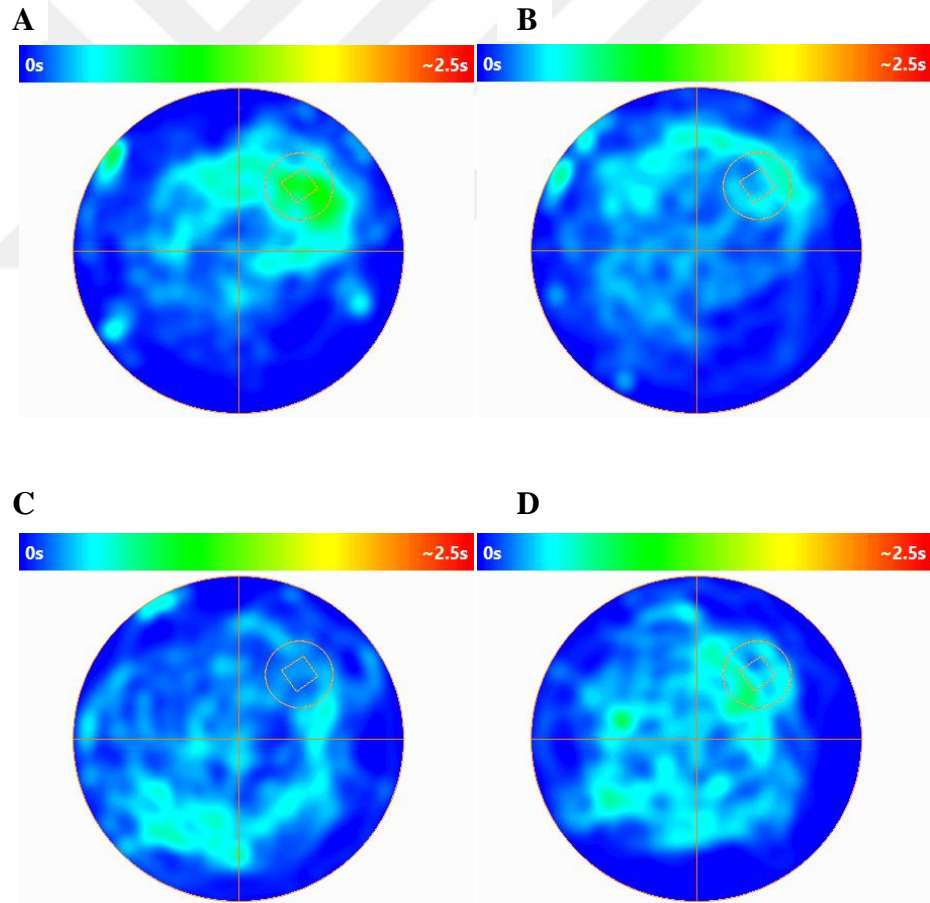


Şekil 6.5 Prob günlerinde hayvanların platformun etrafındaki alandan geçme sayıları.

A, kısa dönem bellek değerlendirmesi. B, uzun dönem bellek değerlendirmesi.



Şekil 6.6 Prob günlerinde hayvanların platformun etrafındaki alanda harcadıkları zaman (saniye). A, kısa dönem bellek değerlendirmesi. B, uzun dönem bellek değerlendirmesi

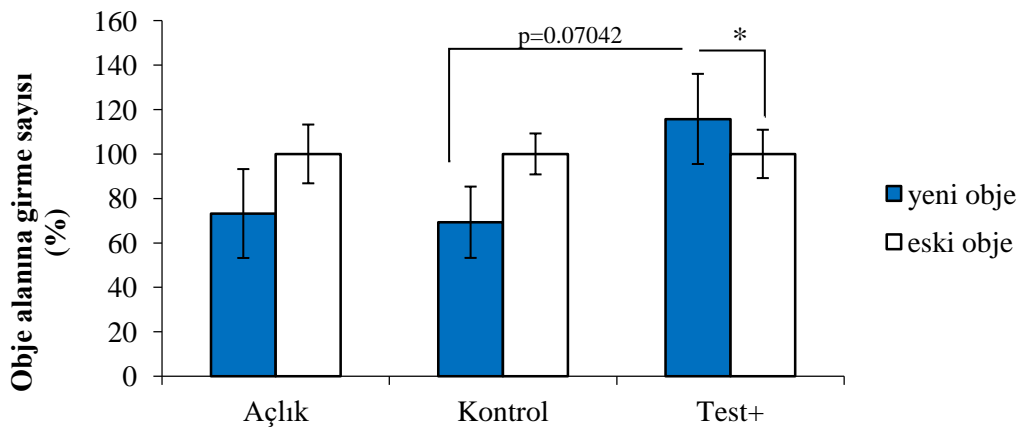


Şekil 6.7 Kısa dönem hafıza prob günlerindeki ortalama ısı haritası. A, Test+ grubu hayvanların prob+ günü. B, Test+ grubu hayvanların prob- günü. C, Test- grubu hayvanların prob+ günü. D, Test- grubu hayvanların prob- günü.

6.3.3 Novel Object Recognition Test

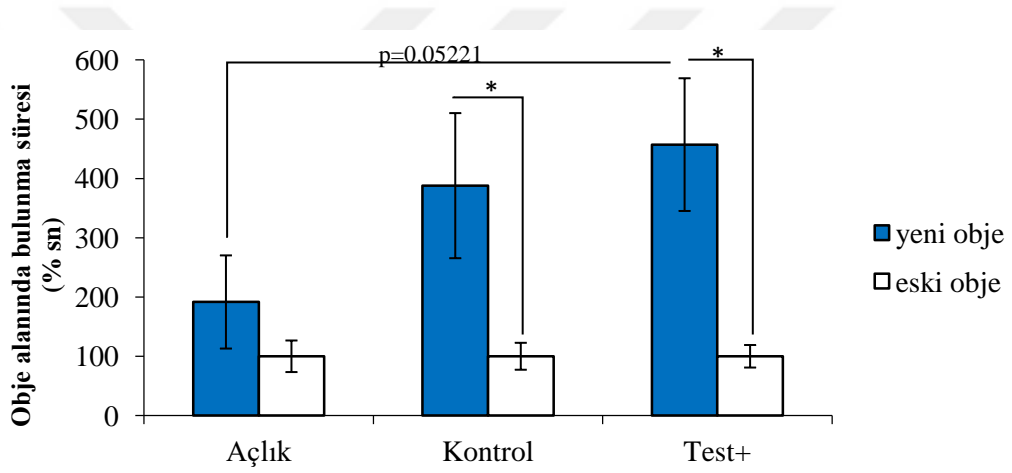
Açlık, kontrol ve test+ olarak 3 gruba ayrılan hayvanlar MWM testinden sonra 1 haftalık dinlenme süresine bırakılmış, geçen 1 hafta sonrasında Novel Object Recognition Testi (NOR) yapılmıştır. Test birbirini takip eden 3 gün boyunca habitasyon, familirizasyon ve test günleri olarak tek tekrarlı olarak uygulanmıştır. Hayvanlar ANY-Maze, Stoelting davranış takip sistemi ile izlenmiş ve testler kayıt altına alınmıştır.

Değerlendirmeler Tablo 5.12’de verilen ölçeklere göre yapılmıştır. Farelerin obje çevresindeki alana girme sayısına bakılarak test gününde, yeni objeye olan ortalama ilgi hesaplanmıştır. Açlık grubu hayvanların yeni obje çevresine 49,7 kez, eski obje çevresine 67,9 kez; kontrol grubunun yeni obje çevresine 34,4 kez, eski obje çevresine 46,7 kez; test+ grubunun ise yeni obje çevresine 52,4 kez, eski obje çevresine ise 45,3 kez giriş yaptığı görülmüştür. Bütün grupların eski objeye olan ilgisi yüzdeye vurularak yeni objeye olan ilgi yüzde cinsinden hesaplanmıştır (Şekil 6.8). Test+ grubunun yeni ve eski objelere ilgisi arasında anlamlı bir fark bulunurken ($p<0,005$), kontrol grubu ile test+ grubunun yeni objeye olan ilgisi arasında da anlamlıya yakın bir fark bulunmuştur.



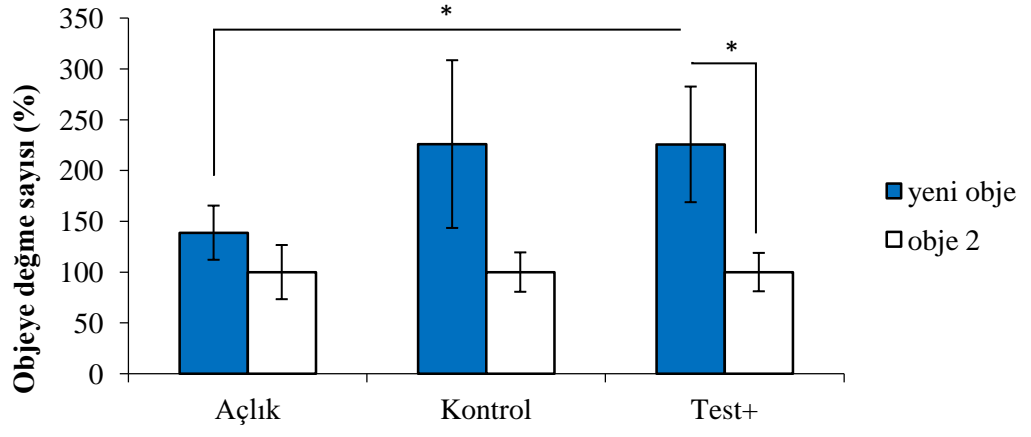
Şekil 6.8 Test günü objelerin çevresindeki alana girme sayısı

Farelerin obje çevresindeki alanda kalma sürelerine bakılarak test gününde, yeni objeye olan ortalama ilgi hesaplanmıştır. Açlık grubu hayvanlar yeni objenin çevresinde 130,1 sn., eski obje çevresinde 67,9 sn.; kontrol grubu yeni objenin çevresinde 192,9 sn., eski obje çevresinde 49,7 sn.; test+ grubu yeni obje çevresinde 223,1 sn., eski obje çevresinde 48,8 sn. durmuştur. Bütün grupların eski objeye olan ilgisi yüzdeye vurularak yeni objeye olan ilgi yüzde cinsinden hesaplanmıştır (Şekil 6.9). Test+ grubu ve kontrol grubunun yeni ve eski objelere ilgisi arasında anlamlı bir fark bulunurken ($p<0,005$), açlık grubu ile test+ grubunun yeni objeye olan ilgisi arasında da anlamlıya yakın bir fark bulunmuştur.



Şekil 6.9 Test gününde objelerin çevresindeki alanda bulunma süreleri

Farelerin objeye burunlarını değdirme sayılarına bakılarak test gününde, yeni objeye olan ortalama ilgi hesaplanmıştır. Açlık grubu farelerin burunlarının yeni objeye 43,3 kez, eski objeye 31,2 kez; kontrol grubunun 41,1 kez; eski objeye 18,1 kez; test+ grubunun 44,8 kez, eski objeye 19,8 kez değdiği görülmüştür. Bütün grupların eski objeye olan ilgisi yüzdeye vurularak yeni objeye olan ilgi yüzde cinsinden hesaplanmıştır (Şekil 6.10). Test+ grubunun yeni ve eski objelere ilgisi arasında ve açlık grubu ile test+ grubunun yeni objeye olan ilgisi arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,005$).



Şekil 6.10 Test gününde hayvanların burunlarının objelere değme sayısı

7.TARTIŞMA VE SONUÇ

Doğal yaşamda canlıların yaşamını sürdürmesini motive eden temel eylemler bulunmaktadır. Üreme, beslenme bunlardan bazılarıdır. Fizyolojik bir dürtü olan açlık doğal yaşamın devamlılığını sağlayan ve olay örgüsünü şekillendiren temel hissiyatlardan biridir. Canlılar hayatlarını idame ettirirken içinde buldukları enerji metabolizmasının sonucu olarak acıkırlar ve bu hissiyatı karşılamak temel amaçlarından biridir.

Hayvanlar aleminde beslenme eylemleri ve açlık-tokluk mekanizması iyi çalışılmış ve halen çalışılmakta olan bir alandır. Açlık durumunda hayvanlar yemeklerinin yerini ya da avlarını bularak beslenme eylemini gerçekleştirirler. Bu eylem süresince fizyolojik motivasyon olan açlığın yanı sıra bilişsel yeteneklerde devreye girmektedir. Besinlerini istifleyerek yaşamlarını sürdüren hayvanlar üzerinde yapılan araştırmalar kognitif yeteneklerin açlığın yatıştırılması üzerindeki rolünü açıkça ortaya koymuştur. İstifçi hayvanlardan biri olan kayın baştankarasının depoladığı besinlerin lokalizasyonunu rastgele arama faaliyeti ile değil hafızada tutarak tekrardan bulduğu gösterilmiştir (2). Yine aynı hayvanda yapılan araştırmalar bu türün istiflenen yemlerini depolama alanından çıkarıp çıkarmadığı bilgisini hafıza tarafından geri kazanarak ettiği söylenmektedir (42). Sıçanlar üzerinde yapılan bir araştırma göstermiştir ki yemlerin yerini bulmakta spatial bellek kullanılmakta ve bellekten bilgilerin geri çağırılması sırasında besin tercihinine göre bir hatırlama oranının değiştiği görülmektedir (43). Bu çalışmanın verileri dağ baştankarası veya çalıkargası gibi diğer istifçi hayvanlarla yapılmış çalışmaların çıktılarıyla da desteklenmiştir (44, 45). Ayrıca istifçi kuşların besinlerini depolayacakları lokalizasyonları belirlerken spatial bellekten yararlandıkları da bilinmektedir (46). Özetle, istifçi kuşlar ve diğer hayvanlar ile yapılan bu çalışmalar besinlerin lokalizasyonlarının belirlenmesinde spatial belleğin kullanıldığını göstermiştir. Bu bilgi yapılan bu çalışmanın çıkış noktalarından birini oluşturmuştur. Açlık ve açlık ile motive olan bu hatırlama, belleği geri çağırma işlemi arasında bir bağlantı olup olmadığı sorusu sorulmuştur.

Açlığın fizyolojik etkenlerinden biri olan ghrelin hormonu ve bellek ilişkisi literatürde yaygın olarak çalışılmıştır. Ghrelin hormonu ile yapılan birçok deneyde kognitif yetiler ile arasında ilişki olduğu bulunmuştur (3-7). Yapılan araştırmalarda, ghrelin peptidinin doza bağlı olarak intraserebroventriküler enjeksiyonu sonucu bellekte tutulma oranını arttırdığı ve belleği geliştirdiği gösterilmiştir (3, 47). Objeye tanınmasında ghrelin peptidinin ve peptid olmayan agonistlerinin beyin içi enjeksiyonu sonucu hafızada iyileşmeye yol açmıştır (7, 48). Farede yapılan nesne tanıma çalışması göstermiştir ki, kronik besin kısıtlaması ile azalan nesne tanıma performansı ghrelin uygulaması sonrasında giderilmiştir (48). Ghrelin agonistlerinin ve mimetiklerinin subkutan veya oral uygulamasının spatial belleği iyileştirdiği birden fazla grup tarafınca gösterilmiştir (4, 7). Bu çalışmaların yanında ayrıca, ghrelin reseptörünün eksikliğinin farelerde spatial öğrenmede güçlüğüne yol açtığı ancak bu farelerin yabancıl tip farelere kıyasla öğrenmeden kaçmadıkları gözlenmiştir (4). Literatürde bulunan bu çalışmalar açlık ile bellek arasında bulunan bağlantıyı ghrelin peptidi/hormonu üzerinden gösterirken bizi de bu çalışmada açlık nöronlarını hedef almaya yöneltmiştir. Ghrelinin spatial bellek üzerindeki pozitif etkisi sonucu bu çalışmada spesifik olarak açlık nöronlarının spatial bellekteki rolü araştırılmıştır.

Fizyolojik açlığın oluşumu sırasında çeşitli nöron aktiviteleri görülmektedir. Bu nöronların başında gelen ve literatürde de iyi çalışılmış olan Agrp nöronları temel açlık nöronları olarak bilinmektedir. Bu nöronlara spesifik manipülasyon yapabilmek adına deneyler *Agrp-cre* transgenik fare hattında yapılmıştır. Hipotalamusun arkuat çekirdeğinde bulunan Agrp nöronları rAAV-hSyn-FLEX-hM3D(Gq)-mCherry ve rAAV-FLEX-GFP virüsü ile enfekte edilerek çalışma boyunca akut olarak manipüle edilebilir hale getirilmiştir. Deney süresince Dizayn Edilmiş İlaçları Aktive Eden Dizayn Edilmiş Reseptörler (DREADD) teknolojisi kullanılarak enfekte edilen açlık nöronları akut stimülasyon için kullanılan dizayn edilmiş ilaç CNO'nun i.p. uygulanmasıyla uyarılmıştır.

Agrp nöronlarının davranışsal fenotipi günümüze dek yeterince çalışılmıştır. Agrp nöronlarının akut uyarımı sonucu besin tüketiminde ölçülebilir ve büyük miktarda değişim yaşandığı bilinen bilimsel bir gerçekliktir. Deneylerde kullanılacak farelerin Agrp nöronları kemogenetik olarak akut uyarılmış ve hepsinin besin tüketim değişiminde anlamlı bir artış yaşandığı ölçülmüştür. Bu deney ile *Agrp-cre*

hayvanlarımızın metabolik yanıtlarının düzenli olup olmadığı test edilirken aynı zamanda hepsinin enfeksiyon düzeylerinden de emin olunulmuştur.

Kognitif davranışları test etmek amacıyla hayvanlara öncelikle Morris Water Maze (MWM) testi uygulanmış ardından Novel object recognition (NOR) testi uygulanmıştır. İki kognitif davranış testi arasında 7 günlük aralar verilerek deney hayvanları dinlendirilmiştir.

MWM testinde 4 farklı deney grubu oluşturulmuştur. Açlık, kontrol ve test+ grupları dışında ayrıca eğitim günlerinde Agrp nöronları uyarılmadan öğrenen test- grubu oluşturulmuştur. Bu grup oluşturularak öğrenme sürecinde Agrp aktivitesinin varlığının spatial belleğe etkisi olup olmadığı sorusuna cevap aranmıştır. Günde 4 trial uygulanarak yapılan 4 eğitim günü boyunca hayvanların platforma kaçma süreleri (sn) ve trialler boyunca ortalama hızları (m/s) ölçülmüştür. Öğrenme süreci boyunca grupların platforma kaçma süreleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ortalama hızlar karşılaştırıldığında kontrol ve test gruplarının benzer hızlarda hareket ettiği, açlık grubunun ise ilk 2 gün daha yavaş hareket ederken 3. ve 4. günde diğer grupları yakaladığı gözlenmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkılarak Agrp aktivasyonunun öğrenmeye bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır. Spatial belleği test etmek amacıyla 2 farklı prob günü oluşturulmuştur ve hayvanların platformdan ve platform çevresinden geçme sayıları ölçülmüştür. Prob+ günü hayvanlar CNO ile uyarılırken, prob- günü placebo uygulanmıştır. Bu prob günleri kısa dönem ve uzun dönem hafızayı test etmek adına 5.-6. ve 15.-16. günlerde uygulanmıştır. Kısa dönem hafıza deneylerinde, açlık ve kontrol gruplarının her iki prob gününde de platformdan ve çevresinden geçme sayısı benzer iken test+ ve test- gruplarının prob günleri arasında anlamlı fark görülmüştür. Eğitim günleri boyunca Agrp nöronları aktive edilmiş halde öğrenmiş test+ grubu hayvanlarının açlık nöronları aktif iken anlamlı bir farkla daha iyi hatırladıkları bulunmuştur. Bunun yanı sıra, eğitim günlerinde Agrp nöronları aktive edilmeden halde öğrenmiş test- grubu hayvanlarının açlık nöronları aktif iken hafızada tutma yetilerinin azaldığı, Agrp nöronları aktif değil iken anlamlı şekilde daha iyi hatırladıkları görülmüştür. Test- grubu hayvanların Agrp aktivasyonuna bağlı hafızalarındaki bu anlamlı azalma uzun dönem hafıza deneylerinde de devam etmiştir. Ancak, diğer grup hayvanlarda uzun dönem hafıza probe günleri platformdan ve çevresinden geçme sayıları arasında anlamlı bir fark

bulunmamıştır. Bu sonuçlardan yola çıkılarak Agrp aktivitesine bağlı hafıza iyileşmesinin eğitim dönemindeki Agrp nöron aktivitesine bağlı gerçekleştiği söylenebilir. Ayrıca, öğrenme sürecinde Agrp nöronları aktif değil ise Agrp nöron aktivasyonu belleğin kötüleşmesine neden olduğu bulunmuştur.

Çalışma basit, zorlayıcı öğeler içermeyen ve anksiyetik olmayan Novel object recognition (NOR) testi ile devam ettirildi. NOR testinde dikkate alınan bellek ölçekleri olarak “objeye hayvanın burnunun değme sayısı” ve “objenin çevresinde geçirilen süre” dikkate alınmıştır. Her iki ölçekte de Agrp uyarımlı olarak aç hayvanların (test+ grubu) yeni objeye olan ilgisinin fizyolojik aç hayvanlarınkine (açlık grubu) oranla anlamlı olarak fazla olduğu hesaplanmıştır. Bu anlamlı fark göstermektedir ki spesifik Agrp aktivitesi hatırlama oranını arttırarak farkındalığı arttırmaktadır.

Yapılan tüm analizler ve kaydedilen bulgular spatial bellek ile açlık nöronu olarak adlandırılan Agrp nöronları arasında bağlantı olduğunu göstermektedir. Agrp nöron aktivitesine bağlı öğrenme sonrası bellek gelişmekte, tam tersi bir durumda ise akılda tutma oranı azalmaktadır. Aynı zamanda spatial belleğe olumlu etkinin fizyolojik açlığı oluşturan tüm etkenlerden ziyade Agrp nöronları tarafından sağlanmaktadır. Sonuç olarak, açlık nöronları olan Agrp nöronları spatial belleğe pozitif etki yaparak spatial belleği geliştirmekte ve arttırmaktadır.

8.KAYNAKLAR

1. Balda RP, Kamil AC. Long-term spatial memory in Clark's nutcracker, *Nucifraga columbiana*. *Animal Behaviour*. 1992;44(4):761-9.
2. Sherry DF, Krebs JR, Cowie RJ. Memory for the location of stored food in marsh tits. *Animal Behaviour*. 1981;29(4):1260-6.
3. Carlini VP, Monzón MaE, Varas MM, Cragolini AB, Schiöth HB, Scimonelli TN, et al. Ghrelin increases anxiety-like behavior and memory retention in rats. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002;299(5):739-43.
4. Diano S, Farr SA, Benoit SC, McNay EC, da Silva I, Horvath B, et al. Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance. *Nature neuroscience*. 2006;9(3):381.
5. Tóth K, László K, Lénárd L. Role of intraamygdaloid acylated-ghrelin in spatial learning. *Brain research bulletin*. 2010;81(1):33-7.
6. Carlini VP, Ghersi M, Schiöth HB, de Barioglio SR. Ghrelin and memory: differential effects on acquisition and retrieval. *Peptides*. 2010;31(6):1190-3.
7. Atcha Z, Chen W-S, Ong AB, Wong F-K, Neo A, Browne ER, et al. Cognitive enhancing effects of ghrelin receptor agonists. *Psychopharmacology*. 2009;206(3):415-27.
8. Aponte Y, Atasoy D, Sternson SM. AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nature neuroscience*. 2011;14(3):351.
9. Cansell C, Denis RG, Joly-Amado A, Castel J, Luquet SH. Arcuate AgRP neurons and the regulation of energy balance. *Frontiers in endocrinology*. 2012;3:169.
10. Morton G, Schwartz M. The NPY/AgRP neuron and energy homeostasis. *International Journal of Obesity*. 2002;25(S5):S56.
11. Altın Z. The Physiology of Hunger. *The Journal of Tepecik Education and Research Hospital*.27(3):179-85.
12. Minor RK, Chang JW, De Cabo R. Hungry for life: how the arcuate nucleus and neuropeptide Y may play a critical role in mediating the benefits of calorie restriction. *Molecular and cellular endocrinology*. 2009;299(1):79-88.
13. Betts J. *Anatomy & Physiology-Rice University OpenStax CNX pp 787-846. ISBN 1-938168-13-5, 2014.*

14. Lechan RM, Toni R. Functional anatomy of the hypothalamus and pituitary. 2016.
15. Dougherty P. Chapter 1: Hypothalamus: Structural Organization. Available from: <https://nba.uth.tmc.edu/neuroscience/s4/chapter01.html>.
16. Allen Brain Atlas. Available from: <https://goo.gl/jtFb5x>.
17. Joly-Amado A, Cansell C, Denis RG, Delbes A-S, Castel J, Martinez S, et al. The hypothalamic arcuate nucleus and the control of peripheral substrates. Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism. 2014;28(5):725-37.
18. Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB. Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. Journal of Neuroscience. 2004;24(11):2797-805.
19. Schwartz MW, Woods SC, Porte Jr D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. Nature. 2000;404(6778):661.
20. Cone R, Cowley M, Butler A, Fan W, Marks D, Low M. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. International Journal of Obesity. 2002;25(S5):S63.
21. Bilgin HM. Ghrelin; gündemdeki hormon. Dicle Tip Dergisi. 2006;33:4.
22. Klok M, Jakobsdottir S, Drent M. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. Obesity reviews. 2007;8(1):21-34.
23. Chan JL, Bullen J, Lee JH, Yiannakouris N, Mantzoros CS. Ghrelin levels are not regulated by recombinant leptin administration and/or three days of fasting in healthy subjects. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2004;89(1):335-43.
24. Date Y, Nakazato M, Murakami N, Kojima M, Kangawa K, Matsukura S. Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion. Biochemical and biophysical research communications. 2001;280(3):904-7.
25. Sun Y, Ahmed S, Smith RG. Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite. Molecular and cellular biology. 2003;23(22):7973-81.
26. Peeters T. Ghrelin: a new player in the control of gastrointestinal functions. Gut. 2005;54(11):1638-49.
27. Healy SD, Jozet-Alves C. Spatial Memory. Academic Press; 2010.

28. Vorhees CV, Williams MT. Assessing spatial learning and memory in rodents. *ILAR journal*. 2014;55(2):310-32.
29. Liu P, Bilkey DK. The effect of excitotoxic lesions centered on the hippocampus or perirhinal cortex in object recognition and spatial memory tasks. *Behavioral neuroscience*. 2001;115(1):94.
30. O'Keefe J, Dostrovsky J. The hippocampus as a spatial map: Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain research*. 1971.
31. Hebert AE, Dash PK. Nonredundant roles for hippocampal and entorhinal cortical plasticity in spatial memory storage. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2004;79(1):143-53.
32. Morris R, Garrud P, Rawlins Ja, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*. 1982;297(5868):681.
33. Eichenbaum H, Cohen NJ. From conditioning to conscious recollection: Memory systems of the brain: Oxford University Press on Demand; 2004.
34. Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(40):14515-20.
35. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of neuroscience methods*. 1984;11(1):47-60.
36. Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature protocols*. 2006;1(2):848.
37. Nunez J. Morris water maze experiment. *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2008(19).
38. Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive processing*. 2012;13(2):93-110.
39. Leger M, Quiedeville A, Bouet V, Haelewyn B, Boulouard M, Schumann-Bard P, et al. Object recognition test in mice. *Nature protocols*. 2013;8(12):2531.
40. Sternson SM, Atasoy D, Betley JN, Henry FE, Xu S. An emerging technology framework for the neurobiology of appetite. *Cell metabolism*. 2016;23(2):234-53.
41. Atasoy D, Aponte Y, Su HH, Sternson SM. A FLEX switch targets Channelrhodopsin-2 to multiple cell types for imaging and long-range circuit mapping. *Journal of Neuroscience*. 2008;28(28):7025-30.
42. Sherry DF. Food storage, memory, and Marsh Tits. *Animal Behaviour*. 1982.

43. Bird LR, Roberts WA, Abroms B, Kit KA, Crupi C. Spatial memory for food hidden by rats (*Rattus norvegicus*) on the radial maze: studies of memory for where, what, and when. *Journal of Comparative Psychology*. 2003;117(2):176.
44. Sherry DF, Vaccarino AL. Hippocampus and memory for food caches in black-capped chickadees. *Behavioral Neuroscience*. 1989;103(2):308.
45. Clayton NS, Dickinson A. Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays. *Nature*. 1998;395(6699):272.
46. Male LH, Smulders TV. Memory for food caches: not just for retrieval. *Behavioral Ecology*. 2007;18(2):456-9.
47. Goshadrou F, Kermani M, Ronaghi A, Sajjadi S. The effect of ghrelin on MK-801 induced memory impairment in rats. *Peptides*. 2013;44:60-5.
48. Carlini V, Martini A, Schiöth H, Ruiz R, De Cuneo MF, De Barioglio S. Decreased memory for novel object recognition in chronically food-restricted mice is reversed by acute ghrelin administration. *Neuroscience*. 2008;153(4):929-34.

9.ETİK KURUL ONAYI



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

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
27/12/2017	81		Yrd. Doç. Dr. Deniz ATASOY

“Agrp nöronlarının kognitif yeteneklere etkisinin incelenmesi” başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “Oybirliği” ile karar verilmiştir.
Etik Onay Geçerlilik Süresi: 3 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	Öykü	Soyadı	Dinçkol
-----	------	--------	---------

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji Ve Genetik	2015
Lise	Nazilli Anadolu Öğretmen Lisesi	2011

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl – Yıl)

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi

	Sayısal	Sözel	Eşit ağırlık
ALES Puanı	86,96	70,55	86,09
TOEFL IBT Puanı	85		

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Microsoft Office Programları	Çok iyi
ANY-Maze Soelting Davranış Takip Sistemi	Çok iyi

Sertifikalar

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