



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

BELLEK KONSOLİDASYONU MEKANİZMALARI

ÖZLEM MUTLU

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. LÜTFÜ HANOĞLU

İSTANBUL-2019

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının gerçekleşmesini sağlayan hem araştırmacılığı hem mentorluğuyla örnek olan değerli tez danışmanım Prof. Dr. Lütfü Hanoğlu'na, üstün laboratuvar olanakları ve sağladığı paylaşımcı ortam için İstanbul Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi müdürü Gürkan Öztürk'e,

Hem bilimsel hem manevi anlamda desteklerini gördüğüm kıymetli hocalarım Dr. Çağrı Temuçin Ünal ve Dr. Bengi Ünal'a, tavsiyeleriyle çalışmanın şekillenmesini sağlayan tez izleme komitesindeki hocalarım Prof. Dr. Bahar Güntekin ve Dr. Mehmet Ozansoy'a, öğrettikleri teknik bilgiler ve kazandırdıkları tecrübe için Dr. Deniz Atasoy ve Dr. Nilüfer Sayar Atasoy'a,

Doktora süresince 2211 doktora burs programı ile burs desteği sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na

Başta Hilmi Kaan Alkan, Taha Keleştemur, Mehtap Şimşek, Büşra Batği ve Ekrem Musa Özdemir olmak tüm REMER çalışanlarına ve İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırma Merkezi çalışanlarına,

Ekip arkadaşlarım Fadime Çadırcı, Nagihan Mantar, Zeynep Temel, Kübra Soğukkanlı, Tuba Oğuz, Fatmagül İlayda Aydınlı, Eşref Çelik, Merve Öncül, Utku Cebecioğlu ve tecrübesiyle en büyük desteği veren Dr. Halil Aziz Velioglu'na,

Her durumda olduğu gibi hem akademik hem manevi anlamda desteğini esirgemeyen sevgili arkadaşım Kübra Eren'e, beni hayata hazırlayan, her şeyimi borçlu olduğum sevgili annem Hatice Mutlu ve merhum babam Nidayil Mutlu'ya, varlığıyla güç bulduğum canım kardeşim Halil Mutlu'ya, son olarak hayatı paylaştığımız gibi bu süreçteki tüm zorlukları da paylaştığım sevgili eşim Arda Burnaz'a

Bana kattıkları her şey ve bu çalışmadaki emekleri için bu vesileyle teşekkür ederim.

Özlem Mutlu

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No.
TEZ ONAYI FORMU	i
BEYAN	ii
TEŞEKKÜR	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ	ix
RESİMLER LİSTESİ	x
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Bellek Konsolidasyonu	5
4.1.1. Sinaptik konsolidasyon	7
4.1.2. Sistemsel konsolidasyon	9
4.2. Uyku ve Bellek	10
4.3. Melanin Konsantre Edici Hormon Nöronları	12
5. MATERYAL VE METOT	13
5.1. Materyal	13
5.2. Metot	16
5.2.1. Deney hayvanları	16
5.2.2. Genotipleme	16
5.2.2.1. DNA pürifikasyonu	17
5.2.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)	17
5.2.2.3. Jel elektroforez ve görüntüleme	18
5.2.3. Kemogenetik manipülasyon	19
5.2.4. Stereotaktik enjeksiyon	21
5.2.5. Yeni nesne tanıma testi	25
5.2.5.1. Alışma evresi (Gün 1)	25
5.2.5.2. Tanıma evresi (Gün 2)	26

5.2.5.3. Test evresi (Gün 3)	26
5.2.6. Elektrofizyoloji	29
5.2.7. Kesit hazırlama.....	29
5.2.8. İmmunohistokimya ve görüntüleme.....	30
5.2.9. İstatistiksel Analiz	30
6. BULGULAR.....	31
6.1. Genotipleme.....	31
6.2. MCH Nöron İnhibisyonunun Konfirmasyonu.....	32
6.3. MCH İnhibisyonunun Bellek Performansına Etkisi	33
6.3.1. Burun dokunuşu skorları.....	33
6.3.2. Araştırma süresi skorları.....	35
6.4. MCH Nöronları Enfeksiyonunun Doku analiziyle Konfirmasyonu	37
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	41
8. EKLER	50
9. KAYNAKLAR	51
10. ETİK KURUL ONAYI	61
11. ÖZGEÇMİŞ	62

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

AAV	Adeno-Asosiye Virüs
aCSF	Yapay Beyin Omurilik Sıvısı
C57	C57BL/6 yaban tipi fare
CA1/3	Kornu Ammonis 1/3
CaMKII	Kalmodulin Bağımlı Kinaz II
CNO	N-Oksit Klozapin
CO ₂	Karbondioksit
Cre	Rekombinaz Enzimi
DIO	İkili Çevirici Ajan
DNA	Deoksiribonukleik Asit
DREADD	Tasarlanmış İlaçlarla Uyarılan Tasarlanmış Reseptörler
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EF1	Ökaryotik Faktör 1
EtOH	Etil Alkol
FLEX	Çevir-Kes Ajanı
fMRG	Fonksiyonel Manyetik Rezonans Görüntüleme
GABA	Gamma Aminobütirik Asit
GFP	Yeşil Floresan Protein
G _i	İnhibe Edici G Protein Yolağı
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HCl	Hidroklorik Asit
hM4D	insan Muskarinik Reseptörü 4D
hM3D	insan Muskarinik Reseptörü 3D
IEG	Erken Yanıt Veren Gen
KCl	Potasyum Klorür
LDT	Laterodorsal Tegmental Alan
LC	Lokus Serolous
Lox	Çaprazlama Lokusu
LTD	Uzun Süreli Depresyon
LTP	Uzun Süreli Potansiyasyon
MCH	Melanin Konsantre Edici Hormon
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
NaHCO ₃	Sodyum Bikarbonat
NaH ₂ PO ₄	Sodyum Fosfat
NMDA	N-Metil-D-Aspartat
NREM	Hızlı Göz Hareketleriyle Karakterize Olmayan Uyku
KO	Gen İfadesi durdurulmuş
KZ	Klozapin
O ₂	Oksijen

PBS	Fosfat Tamponlu Tuz
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFA	Paraformaldehit
Pmch	Pro-Melanin Konsantre Edici Hormon
PPN	Pedinkülopontin Çekirdek
PSD	Post-Sinaptik Densite
REM	Hızlı Göz Hareketleriyle Karakterize Olan Uyku
RN	Raphe Nükleus
SF	Serum Fizyolojik
SWS	Yavaş Dalga Uykusu
Syn	Sinaptofizin
TAE	Tris-Asetat-EDTA
Taq	Termus Akuatikus
T _e	Eski Nesne Zamanı
T _y	Yeni Nesne Zamanı
VTA	Ventral Tegmental Alan
ZT	Zeitgeber Zamanı

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 5.1. Cre-LoxP Sistemi.....	19
Şekil 5.2. DREADD Sistemi	20
Şekil 5.3. Stereotaktik enjeksiyonlar ve deney tasarımı	27
Şekil 5.4. Yeni nesne tanıma testi, deney planı ve kullanılan nesnelere	28
Şekil 6.1. Ex vivo spontan hücre aktivitesi takibi ve klozapin etkisi	32
Şekil 6.2. Burun dokunuşlarına göre bellek performansı bulguları.....	33
Şekil 6.3. Araştırma surelerine göre bellek performansı bulguları.....	35
Şekil 6.4. Korelasyon grafiği.....	39
Şekil 7.1. Melanin konsantrasyonu edici hormon nöronları projeksiyonları	45

TABLolar LİSTESİ

Tablo 5.1. Deneylerde kullanılan sarf malzemeleri	13
Tablo 5.2. Deneylerde kullanılan gereçler.....	14
Tablo 5.3. Cre geni primerleri.....	17
Tablo 5.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Karışımı.....	17
Tablo 5.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Protokolü.....	18
Tablo 5.6. Virüs Enjeksiyonları	23
Tablo 6.1. Dokulara göre enfekte olmuş MCH nöron sayıları ve oranları.....	39
Tablo 6.2. Spearman's rho korelasyonu.....	40
Tablo 8.1. AAV2-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry ve AAV2-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry ile enfekte edilmiş tüm farelerin araştırma süreleri skorlarının Student's ttest ile karşılaştırılması.....	50
Tablo 8.2. AAV2-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry ile enfekte edilmiş tüm farelerin araştırma süreleri skorlarının Student's ttest ile karşılaştırılması.....	50

RESİMLER LİSTESİ

Resim 5.1 Yeni nesne tanıma testi aparatı.....	25
Resim 6.1 Deneylede kullanılan transgenik hayvanların genotiplenmesi.....	31
Resim 6.2 Cre-bağımlı AAV2-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry virüsüyle hedeflenmiş MCH nöronları.....	37
Resim 6.3 Cre-bağımlı AAV2-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry ile hedeflenmiş MCH nöronları.....	38



1. ÖZET

BELLEK KONSOLİDASYONU MEKANİZMALARI

Beyindeki bellek süreçleri sinirbilim alanında üzerinde en çok araştırma yapılan konulardan biridir. Buna rağmen karmaşık yapısı sebebiyle hala gizemini korumaktadır. Elde edilen bulgular bize belleğin temsil edildiği beyin bölgeleri olduğunu, bu bölgelerin birbiriyle çeşitli ağlanmalarla bağlı olduğunu, dahası dinamik bir yapılanmanın mevcut olduğunu göstermektedir. Bu yapılanma içinde beynimizde üç farklı bellek ile ilişkili olay görülür: kodlama, konsolidasyon ve geri çağırma. Konsolidasyon aşaması çevresel ve içsel faktörlere bağlı olarak bilginin sağlamlığını belirler, kısa süreli bellekten uzun süreli belleğe geçişi sağlar. Uykunun hızlı göz hareketleriyle karakterize olan evresinin (REM) konsolidasyona önemli bir etkisi olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada, daha önce REM uykusunu artırdığı gösterilmiş olan melanin konsantr edici hormon (MCH) hücrelerinin inhibisyonunun bellek performansına olası etkisi, transgenik fareler ve kemogenetik yöntemler kullanarak incelenmiştir. Transgenik bir fare modeli olan Pmch-Cre (Pro-melanin konsantr edici hormon) fareler ile MCH hücreleri stereotaktik virus enjeksiyonuyla hedeflenebilir hale getirilmiştir. Bir kemogenetik yöntem olan Tasarlanmış İlaçlarla Tasarlanmış Reseptörlerin Uyarımı' nda (DREADD) kullanılan AAV2-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry virüsü enjeksiyonuyla MCH hücrelerinin bulunduğu lateral hipotalamus ve zona inserta bölgesinde tasarlanmış reseptörlerin üretimi sağlanmıştır. Bir diğer gruba kontrol amaçlı, DREADD etkisi olmayan AAV2/8-FLEX-GFP virüsü enjekte edilmiştir. Bellek performansını ölçmek için yeni nesne tanıma testi uygulanmıştır. Yeni nesne tanıma testi sonuçlarına göre MCH inhibisyonunun bellek performansında istatistik anlamlılığa ulaşan bir fark yaratmamakla birlikte olumsuz bir eğilime sebep olduğu gözlemlenmiştir.

Anahtar kelimeler: bellek, konsolidasyon, REM, MCH

2. ABSTRACT

THE MECHANISMS OF MEMORY CONSOLIDATION

Memory storage in brain is one of the most studied subjects in neuroscience; yet due to the highly complex structure of the memory related systems in brain, the mystery remains. Findings so far indicate that memory is represented in specific brain regions which are highly interconnected and there is a dynamic anatomical settlement. Also, memory related events in the brain are classified in three groups: encoding, consolidation and recall. Consolidation can be affected by environmental and inner factors. It is widely accepted that sleep plays a critical role in memory consolidation. In this context, Rapid Eye Movement (REM) stage is an important stage of sleep which has been a particular interest to many scientists in terms of the association between REM stage and memory consolidation. Here, we aimed to use Pmch-Cre animals in order to evaluate the pathophysiological relationship between MCH neuron activity and memory consolidation. Our goal was to observe the differences in memory consolidation which will be manipulated through MCH neurons with a unique chemogenetic approach. First, we targeted MCH neurons in the lateral hypothalamus and zona inserta with stereotaxic injection of AAV2-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry virus which is the first element of the chemogenetic technique called Designer Receptors Activated by Designer Drugs (DREADD) in order to produce designed receptors in one group of animals. Then, we injected the AAV2/8-FLEX-GFP virus with no manipulative effect to another group of animals as a control. Novel object recognition (NOR) test is used for measuring memory performance. After the comparison of two groups we observed a trend in memory decrease in MCH neuron inhibited animals without a statistically significant difference.

Key words: memory, consolidation, REM, MCH

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Bellek tüm organizmalar için yaşamsal öneme sahiptir. Çevre koşullarına ayak uydurmak, düşmandan kaçınmak, zararlı kokuları ayırt etmek veya yiyecek bulmak gibi aktiviteler bellek gerektiren aktivitelerdir. İnsanlarda bellek sayesinde kişinin kimliği oluşur. Bellek mekanizmasındaki bozukluklar hayat kalitesini düşürür. İleri derecedeki bellek bozuklukları kişinin kendisini tehlikeye atmasına bile sebep olabilir (Alzheimer ve diğer demans türlerinde olduğu gibi). Bu sebeple bellek mekanizmalarının anlaşılması önemlidir. Temel sistemler açığa çıkarıldıkça bellek ilişkili hastalıkların tedavi edilmesinde de yeni yaklaşımlar geliştirilebilir.

Bellek, bir uyarı etkisiyle (içsel veya çevresel) kodlanır, konsolide edilir ve gerektiğinde geri çağırılır. Konsolidasyon, kısa süreli bellek uzun süreli belleğe dönüşürken sinapslarda ve beyin ağlarında meydana gelen değişikliklerdir (1,2). Bu çalışmada esas olarak belleğin hangi sinirsel ağlarla konsolide edildiği araştırılmıştır.

Her bellek türü için beyinde gerçekleşen olaylar farklılık gösterir. Genel olarak bu türler; alışkanlıklar, duygusal içerikli bellek ve açık bellek şeklinde sınıflandırılır. Bu çalışmada hipokampus ve korteksin karşılıklı iletişimiyle gerçekleşen açık bellek türü araştırılmıştır (3).

Bellek konsolidasyonu çoğunlukla uyku sırasında gerçekleşir (4–8). Bu sebeple bellek konsolidasyonu için gerekli karmaşık beyin ağlanmasını deşifre etmeye yardımcı olacak bilgiler elde etmek için uyku evreleri sırasındaki hücrel aktivite haritası önemli bir yol göstericidir. Bu tez çalışmasında uykunun düzenlenmesinde önemli rolü olan hipotalamustaki melanin konsantrasyonu edici hormon nöronlarının (9) bellek konsolidasyonu sinirsel devrelerindeki rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda MCH nöronlarının bir kemogenetik manipülasyon yöntemi olan Tasarlanmış İlaçlarla Tasarlanmış Reseptörlerin Uyarımı (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs (DREADD)) ile inhibisyonu, ardından bu

inhibisyonun yeni nesne tanıma testi ile bellek performansı açısından değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

MCH nöronları uyku/ uyanıklık döngüsünü kontrol eden merkezlerimizden biridir (9). Uyarıldığında özellikle REM uykusunu tetiklediği gözlemlenmiştir (10). REM uykusunun bellek üzerindeki olumlu etkisi göz önüne alınarak oluşturulan hipotezimize göre MCH nöronları da bellek üzerinde olumlu bir etkiye sahip olabilir. Bu tez çalışmasının amacı bu hipotezi test etmek için kemogenetik manipülasyon yöntemiyle MCH nöronlarını inhibe ederek bellek performansındaki değişiklikleri gözlemlemektir.



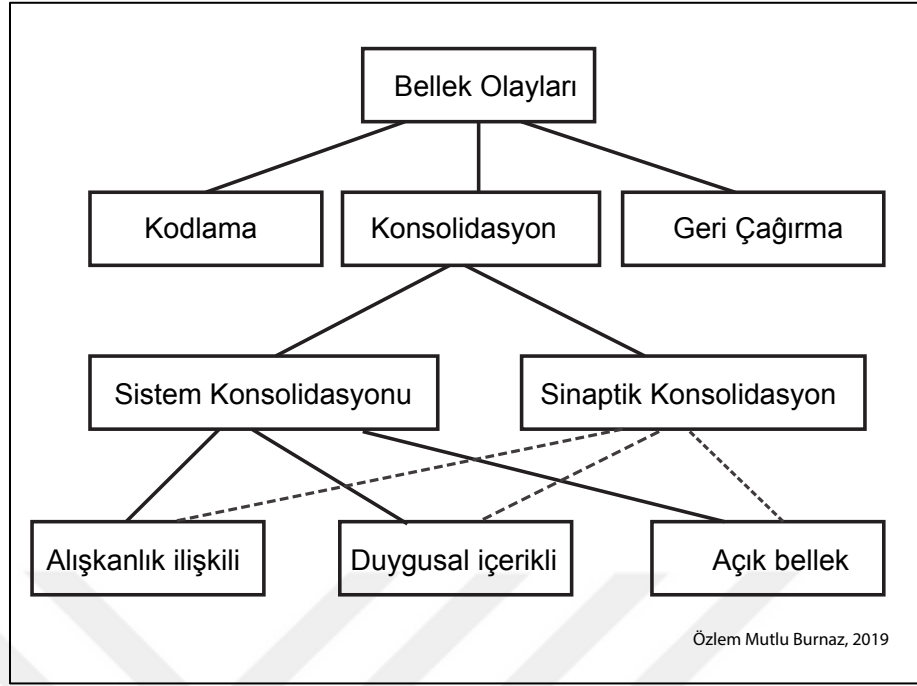
4. GENEL BİLGİLER

4.1. Bellek Konsolidasyonu

Belleğin konsolidasyonu sırasında beyinde gerçekleşen olaylar iki sınıfta incelenmektedir: sinaptik konsolidasyon ile sistem konsolidasyonu. Sinaptik konsolidasyon kodlama gerçekleştikten sonra hücre içinde ve sinapslarda meydana gelen değişimleri kapsar. Sistem konsolidasyonu ise sinapslardaki değişiklikler sonucunda ağlanmanın değişmesidir. Sinaptik konsolidasyon dakikalar içinde gerçekleşirken sistem konsolidasyonu yıllar sürebilir (1,11). Sistem konsolidasyonu ile ilgili 90'lı yılların en geçerli teorisi belleğin öncelikle hippocampus bölgesinde depolandığı ve zaman geçtikçe neokortekse aktarılacak daha az kırılgan hale geldiği ve konsolide olduğu (sağlamlaştırıldığı) yönünde olmuştur (12). Buna standart konsolidasyon teorisi denir (11). Bilim insanlarının bu konuda uzlaşmalarına, retrograd amnezi hastalarının medial temporal loblarındaki hasar sonucu, sadece son birkaç yıla dair bellek kaybı yaşamaları neden olmuştur (11,13). Bu teori, çeşitli hayvan lezyonları ve farmakolojik çalışmalarla da desteklenmiştir (14–17). Fakat daha sonraki çalışmalarda medial temporal lob hasarı miktarı ve amnezi şiddetinin her bellek türünde aynı şekilde korelasyon göstermediği, hasar sonucunda episodik bellekte hem yakın hem de uzak bellek kayıpları yaşandığı tespit edilmiştir. Bu da çoklu iz teorisini (multiple trace theory) doğurmuştur. Çoklu iz teorisine göre semantik bellek kodlanırken tıpkı standart konsolidasyon teorisinde olduğu gibi hippocampusun geçici bir işlevi varken epizodik bellek türü için hippocampus korteksle daima iletişim içinde kalır. Her yeni tecrübe hippocampus ve neokorteks arasında yeni bir bellek izi oluşur. Böylece eski tecrübeler yenilere göre daha iyi korunur (12,18–21).

Günümüzde bu teori transformasyon teorisine evrilmiştir. Farklı bellek türleri için farklı beyin bölgeleri söz konusu olsa da bellek kodlanırken ve geri çağrılırken hippocampus ve medial prefrontal korteks başta olmak üzere belli beyin bölgelerinin aktiflediği, bu bölgelerin dinamik bir ağ oluşturarak koordineli bir şekilde çalıştığı ve bellek gücüne ve geri çağırmadaki koşullara göre kortikal yapıların veya hippocampusun katkısının değişiklik gösterdiği genel olarak kabul edilmektedir. Söz konusu bu ağlanmaların değişime açık olduğu da bilinmektedir (22).

Klinikte ve hayvan çalışmalarında bellek konsolidasyonunu araştırabilmek için kullanılacak yöntemin doğru seçilmesi gerekmektedir. Her yöntemde hangi bellek türünün test edildiği önemlidir; çünkü farklı bellek türleri farklı mekanizmalarla kodlanıyor ve/veya geri çağrılıyor olabilir. İnsan belleği ilk olarak duyuşal bellek (sensory), kısa süreli bellek (working) ve uzun süreli (long-term) bellek olmak üzere üçe ayrılır. Uzun süreli bellek ise açık (explicit-declarative) ve örtük (implicit-procedural) bellek olmak üzere ikiye ayrılır. Açık bellek için yaşadığımız olaylar, tecrübelerimiz, edindiğimiz bilgiler örnek olarak sayılırken, örtük belleğe bisiklete binme yeteneği örnek verilebilir. Retrograd amnezi hastalığından bahsederken daha çok açık bellek türündeki kayıplardan bahsedilir. Açık bellek kendi içinde epizodik (anısal) ve semantik (anlamsal) bellek türlerine ayrılır. Epizodik bellekte yaşanan olaylar, tecrübeler ve bunların organize edilmesi söz konusuysen, semantik bellekte mekânsal ve zamansal bilgiden yoksun gerçekler yer alır (Şekil 4.1)(3,23). İster hayvan ister insan çalışması olsun kullanılan yöntem, çalışılan bellek türüne uygun seçilmelidir. Örneğin, bu çalışmadaki yeni nesne tanıma paradigması açık belleğin alt kategorilerinden biri olan tanıma belleği (recognition memory) (24) araştırmaları için kullanılmaktadır. Önceden sunulmuş bir uyarı tanıma becerisi amnezi modelleme çalışmalarının temelini oluşturur (24). Yeni nesne tanıma testi, klinik araştırmalarda kullanılan görsel eşleştirme paradigmasından türetilmiştir (25).



Şekil 4.1. Bellek türleri. Beyindeki bellek olayları depolanan bilginin çeşidine göre sınıflandırılır.

4.1.1. Sinaptik konsolidasyon

Beynimize kaydedilen her yeni bilgi kodlanırken ve sağlamlaştırılırken (konsolidasyon) bazı hücrel değişiklikler meydana gelir. Bu hücrel değişikliklerin diğer yapısal değişiklikleri tetiklediği düşünülmektedir (26). Bu değişiklikler arasında glutamat reseptörlerini, ikincil mesajcı sinyal molekülleri, protein kinazlar ve erken yanıt veren gen (immediate early gene (IEG)) denilen hızlı ifade edilen bazı genlerin aktivitelerindeki değişiklikler sayılabilir (27,28).

Hücrel değişiklikleri tanımlamak için öne sürülen teorilerden en çok kabul göreni birlikte ateşlenen nöronların bağlantısalılıklarının arttığını öne süren Hebb teorisidir (26,29). Daha sonra bu teoriye dayanan bir hücrel mekanizma olan uzun süreli potansiyasyon (Long-term potentiation (LTP)) keşfedilmiştir. Bunun tersi olan sinaptik bağlantıların zayıflaması durumuna da uzun süreli depresyon (Long-term depression (LTD)) adı verilir (28,30,31).

Terje Lomo ve Tim Bliss tarafından keşfedilen uzun süreli potansiyasyon hippocampus başta olmak üzere beynin pek çok bölgesinde gözlemlenmiştir. Güçlü

bir inputla uyarılan nöronlar protein birikimi ve gen ifadesi değişmesi sonucu bir sonraki uyarıya daha hızlı cevap verebilir hale gelirler. LTP'nin oluşması için her zaman güçlü bir input gerekir. Frekans artışı LTP için etkili olmaz. LTP olayı sinapslarda meydana gelir. Genellikle voltaja bağımlı N-Metil-D-Aspartat (NMDA) veya metabotropik glutamat reseptörlerine bağımlı olarak gerçekleşir. Hippokampusun perforan yolağında (hem entorinal korteksten dentat girusa hem de CA3'ten CA1'e giden yolda) gerçekleşen ve üzerinde en çok çalışılan LTP tipi NMDA bağımlı LTP olayıdır (29).

NMDA reseptörleri post-sinaptik nöronda olduğu için LTP bu yönde ilerler. LTP'nin karakteristik özelliklerinden biri post-sinaptik densite (PSD) denilen kalınlık artışıdır. Bu kalınlığı; reseptörler, katlanmış proteinler, sitoskelet proteinleri, adezyon proteinleri ve sayısız sinyal proteinleri oluşturur. alfa-Amino-3-Hidroksi-5-Metil-4-izoksasole propiyonik asit (AMPA) reseptörleri, NMDA reseptörleri, glutamat reseptörleri de bu biriken proteinlere dahildir. Ayrıca post-sinaptik dendritlerde dallanma (dendritic spine) denen çıkıntılar bulunur ve kalsiyum artışına bağlı olarak kalmodulin bağımlı kinaz II (CaMKII) vasıtasıyla dentritik dallanmalar genişler. NMDA antagonisti olan APV uygulamasında ve CamKII susturulmuş (knock out (KO)) farede LTP bastırıldığında öğrenmenin bundan olumsuz etkilendiği gözlemlenmiştir (29,32,33).

LTP'nin öğrenme gerçekleştikten sonraki ilk bir saat içinde olduğu düşünülmektedir. Sonuç olarak presinaptik nöronlardan vezikül salınımının yüksekliği ve post sinaptik nöronlarda protein birikmesine bağlı bir post sinaptik densite görülmesi uzun süreli potansiyasyon modelini oluşturmaktadır (29).

LTP aktivitesi sonucunda sitoplazmik poliadenilasyon elamanına bağlanma proteinleri (CREB) proteinleri c-fos, zif268 ve arc IEG genlerinin sentezlenmesine yol açar. Bu genlerden c-fos hücre aktivitesiyle ilişkilendirilirken diğer ikisi plastisite işaretçisi olarak kabul edilmiştir. Bu işaretçiler sayesinde davranışın hücre düzeyindeki etkisi takip edilebilmektedir (28,34,35).

4.1.2. Sistemsel konsolidasyon

Öğrenmeye bağlı hücrel olaylar sonucu nöronlar arasındaki bağlantısallığın değişmesi beyin ağlanmalarında da değişikliklere neden olur. Öğrenme ve ilişkili beyin olayları çok çeşitli beyin bölgesinin kooperatif aktivitesiyle mümkündür. Çeşitli bellek türleri için farklı beyin bölgeleri söz konusudur. Bunları en temel sınıfları alışkanlıklar, duygusal içerikli bellek ve açık bellek olarak adlandırılır. Bu farkın sebebi farklı öğrenme biçimleri için farklı bağlantıların kurulmasının gerekmesidir. Örneğin alışkanlıklar ile ilgili bilgiyi kodlarken uyarı ve davranış arasında ilişki kurulur. Duygusal içerikli bir bilgi kodlanırken uyarının tetiklediği olumlu veya olumsuz durum kaydedilir. Açık bellek içinse farklı olayların tek bir tecrübe biçimine sokulması ve organize edilmesi gerekir. Alışkanlıklar ile ilgili bilgiler kodlanırken striatum, serebellum ve beyin sapı gibi yapıların rolü bulunmaktadır. Duygusal bilgiler, amigdalanın ve hipotalamusun ortak çalışmasına ihtiyaç duyar. Bizim ilgilendiğimiz açık bellekte ise hipokampus ve korteks etkileşimi öne çıkmaktadır (3).

Konsolide olmuş belleğin beyindeki temsiline bellek izi veya engram denir (3). Engramları tanımlayabilmek için genellikle bir davranış sırasında aktif olan nöronları işaretleme ve daha sonra bu nöron grubuna müdahale edip davranışı tekrar kontrol etme stratejisi izlenir. Davranışı gözlemlerken moleküler, sinaptik, DNA veya network seviyesinde araştırma yapılabilir. Ayrıca indirekt olarak elektriksel kayıt alarak veya fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme (fMRG) tekniği ile hücreler topyekun izlenebilir. Kodlama sırasında gerçekleşen olaylar genellikle geri çağırma sırasında da gerçekleşir (36).

Beyin-davranış ilişkisi incelenirken lokasyon haricinde nörotransmitter farklılıklarına bakılarak da değerlendirme yapılabilir. Kolinergic ve monoaminergic sistemlerin bellek ile ilgili işlevlerde büyük öneme sahip olduğu düşünülmektedir. Örneğin, bellekle ilişkilendirilen yavaş dalga uykusu (slow wave sleep (SWS)) sırasında kolinergic aktivite düşüktür ve bunun hipokampal engramları tekrar aktive ettiği, CA3 ve CA1 nöronlarındaki tonik inhibisyonu azalttığı düşünülmektedir. Bu

esnada kolinesteraz inhibitörü verilerek kolinerjik aktiviteyi artırmak kelime eşleştirme performanslarında azalmaya sebep olmuştur. Ayrıca uyanırken kolinerjik aktivitenin bastırılması konsolidasyonu artırırken kodlamayı bozmuştur. Bu da asetilkolinin kodlama ve konsolidasyon arasında bir anahtar görevi olduğunu ima etmektedir. Bu ikili fonksiyon kortizol tarafından da desteklenmektedir. O da asetilkolin gibi SWS sırasında minimum miktarda bulunur. Hızlı göz hareketleri ile karakterize olan uyku evresi (Rapid Eye Movement (REM)) sırasındaki yüksek kolinerjik aktivitenin de IEG aktivitesi için ve dolayısıyla LTP için gerekli olduğu düşünülmektedir. Buna bağlı olarak sıçanlarda REM sırasında muskarinik asetilkolin reseptörleri bloke edildiğinde (scopolamine ile) dairesel labirent testi ile ölçülen bellek bozulmuştur. İnsanda REM'deki kolinerjik iletim engellendiğinde parmak motor yeteneği oluşumu bozulmuştur. Benzer şekilde kolinerjik sinyalin artırılması vizuel-motor yeteneği konsolidasyonunu artırmıştır. Kolinerjik etkinin yalnızca miktara bağlı olarak değil, uyku evresine göre etki ettiği görülmektedir. Asetilkolinin yanı sıra SWS sırasında glukokortikoid artışı da konsolidasyonu engeller. Noradrenerjik etkiye bakıldığında sıçanlarda lokus seroloustan (locus coeruleus (LC)) tetiklenen dopaminerjik bir boşalmanın (burst) IEG aktivitesine sebep olduğu görülmüştür. İnsanlarda, SWS sırasındaki noradrenerjik aktivite bastırıldığında koku belleği konsolidasyonu bozulmuştur (4,37).

4.2. Uyku ve Bellek

Konsolidasyonun nasıl bir mekanizmayla gerçekleştiğinin anlaşılmasının önemi, belleği geri çağırmadaki başarının konsolidasyonun ne kadar iyi sağlandığına bağlı olmasından gelir. Bu mekanizmayı etkileyen faktörlerin bilinmesinin önleyici tedavilere ışık tutabileceği düşünülmektedir. Uykunun bellek performansını artırdığına ilişkin pek çok kanıt mevcuttur (38–40). Dahası konsolidasyonun çoğunlukla uyku sırasında gerçekleştiği düşünülmektedir (5,41,42). Uykunun etki mekanizmasının çözülmesi, bu mekanizmaya müdahale edebilmeyi ve konsolidasyonu artırmanın yollarının keşfini sağlayabilir. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada uykunun hızlı göz hareketlerinin olmadığı (Non-Rapid Eye Movement (NREM)) evresinde görülen, bir önceki gün uzaysal öğrenme sırasında aktifleşen bölgelerin aynı sırayla aktifleştiği gözlenmiştir (43). Tekrar aktifleşme; insanlarda

(44,45), insan dışı primatlarda (46) ve kuşlarda (47) da gözlemlenmiştir. NREM uykusunun yavaş dalga uykusu (SWS) sırasında gerçekleştiği gözlemlenen tekrar aktifleşmelerin keskin dalga ölçümleriyle ilişkili olduğu ve bu aktiviteye müdahale edildiğinde konsolidasyonun olumsuz etkilendiği de gösterilmiştir (4,48,49). Ayrıca NREM evresinde EEG kaydında görülen ve bellek ile ilişkilendirilen içciklerin (spindle) insan deneklerde öğrenme sonrasında yoğunlaştığı gösterilmiştir (50). Buna paralel olarak REM uykusunun da konsolidasyon için önemli olduğuna dair klinik çalışmalar yapılmıştır (51–53). Hayvan modellerinde ise görülmüştür ki öğrenme sonrası REM miktarı artmaktadır (54). Uyku evreleriyle ilgili bulguların bu gözlemleri birleştiren bir başka teoriye göre ise sinaptik konsolidasyon, SWS'yi takip eden REM sırasında gerçekleşmektedir. Her iki uyku evresi kadar bu geçiş de önemlidir (55). Bu görüşü destekler bir biçimde IEG ifadesinin REM ile ilişkili olduğu ama SWS ile ilişkili olmadığı görülmüştür. Bu da REM sırasında LTP'nin gerçekleşiyor olabileceğini düşündürmektedir (4,56). Farelerde REM sırasında hippocampuste CREB ve siklik AMP miktarında görülen artış, bu görüşü desteklemektedir (57,58). SWS ve REM'in birlikte çalışarak bellek konsolidasyonunu sağladığı yönündeki hipoteze sekansal hipotez (sequential hypothesis) denir. Sekansal hipoteze göre SWS sırasında duyuşal girdiler tekrar aktifleşir ve REM sırasında da LTP ile birlikte konsolidasyon gerçekleşmektedir (27,55).

REM uykusunun beyin sapındaki laterodorsal tegmental alandan ve pedinkülopontin çekirdekten (PPN) gelen kolinerjik akımla başladığı bilinmektedir (59). Bu sebeple uykudaki nöromodülasyonun bellek konsolidasyonu ile sıkı bir ilişki içerisinde olabileceğini düşünmek mümkündür. Ayrıca REM sırasında ventral tegmental alan (VTA)'daki dopaminerjik akım da artmaktadır. REM sırasında hippocampustan ve korteksten ölçülen teta ritmi de bellek ile ilişkilendirilmektedir. 2016'da yapılan bir çalışmaya göre REM esnasında medial septum (MS)'daki GABA akışı durdurularak teta ritmi engellendiğinde (optogenetik yöntemlerle) bellek performansında azalma yaşanmıştır (60). Ayrıca demans türlerinde uyku bozukluğunun yaygın olduğu da bilinmektedir. REM miktarındaki azalma demans oluşumu ile korelasyon göstermektedir (61).

4.3. Melanin Konsantre Edici Hormon Nöronları

Lateral hipotalamus genetik açıdan çeşitli hücre tiplerini birlikte barındıran bir bölgedir. Bu hücre tiplerinden en baskın olanları orexin ve melanin konsantre edici hormon (MCH) hücreleridir. Orexin hücreleri ve MCH hücrelerinin uyku-uyanıklık döngüsünü kontrol ettiği düşünülmektedir (9,62–64). MCH peptidinin görevleri arasında ise enerji metabolizması, duygusal süreçler, sosyal davranış, uyku-uyanıklık döngüsü sayılabilir. Orexin nöronları optogenetik olarak uyarıldığında NREM evresindeki SWS evresinden uyanıklık evresine geçiş gözlenirken (65) MCH nöronları kemogenetik yöntemlerle aktive edildiğinde REM uyku penceresi sayısının arttığı gözlemlenmiştir. Bu artış günün diğer saatlerinde hiçbir şekilde telafi edici fizyolojik olaylara sebep olmamıştır (66).

MCH nöronlarının projeksiyon yaptığı bölgeler arasında hipokampus, nükleus akumbens, medial septum, periakvaduktal gri madde gibi bellek ile ilişkili bölgeler bulunur (67). Bunların dışında MCH nöronları tüm kortikal alanlara da projeksiyon yapmaktadır (68).

5. MATERYAL VE METOT

5.1. Materyal

Tablo 5.1. Deneylerde kullanılan sarf malzemeleri

Kimyasal adı	Kullanıldığı yer	Marka	Katalog Numarası
Cre_Primer	Genotipleme	Sentegen	-
SafeViewTM	Genotipleme	ABM	G108
OneTaq® Quick-Load® Master Mix	Genotipleme	NEB	M0484S
Quick-Load® Purple 2-Log DNA Ladder	Genotipleme	NEB	N0550S
Anti-MCH antikoru	İmmunohistokimya	Phoenix Pharmaceuticals	H-070-47
Keçi serumu	İmmunohistokimya	Capricorn	GOA-1A
Triton X-100	İmmunohistokimya	Sigma-Aldrich	X100
AF 568 sekonder antikoru	İmmunohistokimya	Invitrogen	A11011
AF 488 sekonder antikoru	İmmunohistokimya	Invitrogen	A11008
Sodyum Klorür (NaCl)	Elektrofizyoloji	Sigma-Aldrich	S7653
Potasyum Klorür (KCl)	Elektrofizyoloji	Sigma-Aldrich	P9541
Sodyum Fosfat (NaH ₂ PO ₄)	Elektrofizyoloji	Sigma-Aldrich	S8282
Sodyum Bikarbonat (NaHCO ₃)	Elektrofizyoloji	Sigma-Aldrich	S6014
Magnezyum Klorür (MgCl ₂)	Elektrofizyoloji	Sigma-Aldrich	208337
Kalsiyum Klorür (CaCl ₂)	Elektrofizyoloji	Sigma-Aldrich	C1016
Clozapine	Davranış Analizi	Leponex	-
Sükroz	Doku Sabitleme	Sigma-Aldrich	389
Paraformaldehit (PFA)	Doku sabitleme	Sigma-Aldrich	15827

Agar	Kesit Alımı	Multicell	800-015-EG
Fluoromount Mounting Medium	Kesit Alımı	Sigma-Aldrich	F4680
Izofloran	Genel Kullanım	-	-
Fosfat Tamponlu Tuz (PBS)	Genel Kullanım	Biomatik	A3602

Tablo 5.2. Deneylerde kullanılan gereçler

Gereç Adı	Kullanıldığı Yer	Marka	Katalog Numarası
0,2 mL plastik tüp	Genotiplleme	Isolab	123.01.002
ChemiDoc™ MP Sistemi	Genotiplleme	BioRAD	-
PowerPac™ Evrensel Güç Kaynağı	Genotiplleme	BioRAD	1645070
Santrifüj	Genotiplleme	Orto Alsera	Biocen 22R
T100™ Termal Döndürücü	Genotiplleme	BioRAD	1861096
Kulak etiketleri	Genotiplleme	Harvard Apparatus	52-4717
Portatif Anestezi Cihazı	Stereotaktik enjeksiyon	Beyza Medikal	-
Mikromotor	Stereotaktik enjeksiyon	İstanbul Dış Deposu	-
Hidrolik Mikromanipülâtör	Stereotaktik enjeksiyon	Narishige	MO-10
Kalibre Mikropipet	Stereotaktik enjeksiyon	Fisher scientific	21-176-2A
Stereo Mikroskop	Stereotaktik enjeksiyon	Zeiss	Discovery V8
Mikropipet Çekici	Stereotaktik enjeksiyon	Sutter Instruments	P-1000
Çalkalayıcı	İmmunohistokimya	Benchmark Scientific	BR2000
pH metre	Doku Sabitleme	Isolab	pH7110

Peristaltik Pompa	Doku sabitleme	Ministar	-
Manyetik Karıştırıcı	Genel Kullanım	Benchmark Scientific	H400HSB
Su Distile Cihazı	Genel Kullanım	Millipore	ZRQSV8W
Hassas Terazi	Genel Kullanım	Ohaus Explorer	EX124-US
Vorteks	Genel Kullanım	Benchmark Scientific	BV1000
Konfokal Mikroskop	Görüntüleme	Zeiss	LSM-800
Vibratom	Kesit Alımı	Leica	VT1000S
Ozmometre	Elektrofizyoloji	Advance Instruments	3250
SliceScope Pro3000	Elektrofizyoloji	Scientifica	Pro300
Portatif üst plaka	Elektrofizyoloji	Scientifica	-
PatchPad	Elektrofizyoloji	Scientifica	-
Programlanabilir Perfüzyon Sistemi	Elektrofizyoloji	Scientifica	-
Monokrom Kamera	Elektrofizyoloji	Watec Cameras	WAT-902H
Hava Kompresörü	Elektrofizyoloji	Stanley	DN200/8/6
Axon Digidata Digitizer	Elektrofizyoloji	Molecular Devices	Model 1550
Multiclamp Çoğaltıcı	Elektrofizyoloji	Molecular Devices	Model 700B
Programlanabilir Sinyal Stimülatörü	Elektrofizyoloji	A.M.P.I	Master 9
pE Excitation System Ana Ünite	Elektrofizyoloji	CoolLED	244-1400
pE Excitation System Remote POD	Elektrofizyoloji	CoolLED	244-1500
Digital Storage Osiloskop	Elektrofizyoloji	Tektonix	TDS2001C
Yeni Nesne Tanıma Testi Aparatı	Davranış Analizi	Özel Yapım	-
Davranış Kamerası	Davranış Analizi	Logitech	C920 webcam

Deneyleerde kullanılan materyal ve gereçler sırasıyla Tablo 5.1. ve Tablo 5.2.'de gösterilmiştir.

5.2. Metot

5.2.1. Deney hayvanları

Çalışmamızda Jackson Lab tarafından sağlanan Tg(Pmch-cre)¹Lowl/J transgenik erkek fareler kullanıldı (Stok no: 14099) (69). MCH nöronlarında cre gen ifadesi mevcut olan bu hayvanlar kemogenetik manipülasyon yapabilme amacıyla üretildi. Fareler 12 saatlik karanlık/aydınlık döngüde *ad libitum* besin ve su ihtiyacını karşılayabilecek koşullarda barındırıldı. Bir adet hemizigot erkek fare ile yaban tipi dişi farelerin çaprazlanmasıyla elde edilen yavrular 6 haftalık olduklarında cre geni için genotiplendi. 10-12 haftaya ulaştıklarında cre-pozitif yavrulara stereotaktik enjeksiyon gerçekleştirildi. Toplamda 16 adet erkek fare ile davranış deneyi tamamlandı. 5.2.4. Stereotaktik enjeksiyon bölümünde bahsedilecek olan AAV2-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry ile hedeflenmiş 3 adet fare, mikroskopik görüntüleme sırasında kullanılan virüsün bozulduğunun fark edilmesi sonucu deneyden çıkarıldı. Davranış deneyinden çıkarılan farelerin bulguları ekler bölümünde, Tablo 8.1 ve 8.2'de verilmiştir. Transgenik farelerin bakımı ve üretimi İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırma Merkezi (MEDİTAM) gözetimi altında gerçekleştirildi. Hayvan deneyleri, İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İMÜ-HADYEK) tarafından onaylanmıştır (Karar no: 62).

5.2.2. Genotipleme

Üretilen her yavru 6. haftaya ulaştığında genotipleme işlemleri gerçekleştirildi.

5.2.2.1. DNA pürifikasyonu

Yavrulardan genomik DNA elde etmek için kulak delme aparatı vasıtasıyla kulak dokusu örnekleri alındı. Bu esnada kulak etiketleri de takılarak hayvan numaralama işlemi gerçekleştirildi. Tüm işlemler anestezi altında ve temiz koşullarda yapıldı. Kulak örnekleri 75 µL alkali liziz solüsyonuna alındı (25 mM NaOH/EDTA) ve 1 saat 98°C sıcaklıkta T100TM Termal Dönüştürücü Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) cihazında kaynatıldı. 1 saat sonunda 75 µL nötralize edici solüsyon (40 mM Tris/HCl) eklendi ve 3 dakika 4000 rpm hızla oda sıcaklığında santrifüj edilerek DNA dokunun geri kalanından ayrıldı. 100 µL süpernatant ayrı bir tüpe alındı.

5.2.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Elde edilen genomik DNA'dan PZR kiti (OneTaq® Quick-Load® 2X Master Mix) kullanılarak varsa cre geni çoğaltıldı. Kontrol olarak yaban tipi fare DNA'sı kullanıldı. Cre primer dizisi, polimeraz zincir reaksiyonu bileşenleri ve reaksiyon protokolü aşağıdaki tablolarda gösterildiği gibidir (Tablo 5.3., Tablo 5.4., Tablo 1.5).

Tablo 5.3. Cre geni primerleri

Cre Primer Dizisi Forward	GCCAGCTAAACATGCTTCATC
Cre Primer Dizisi Reverse	ATTGCCCTGTTCCTACTATCC

Tablo 5.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Karışımı

OneTaq® Quick-Load® Master Mix	6 µL
Cre Forward primer	0,5 µL
Cre Reverse primer	0,5 µL
ddH ₂ O	4,6 µL
DNA	0,5 µL

Tablo 5.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Protokolu

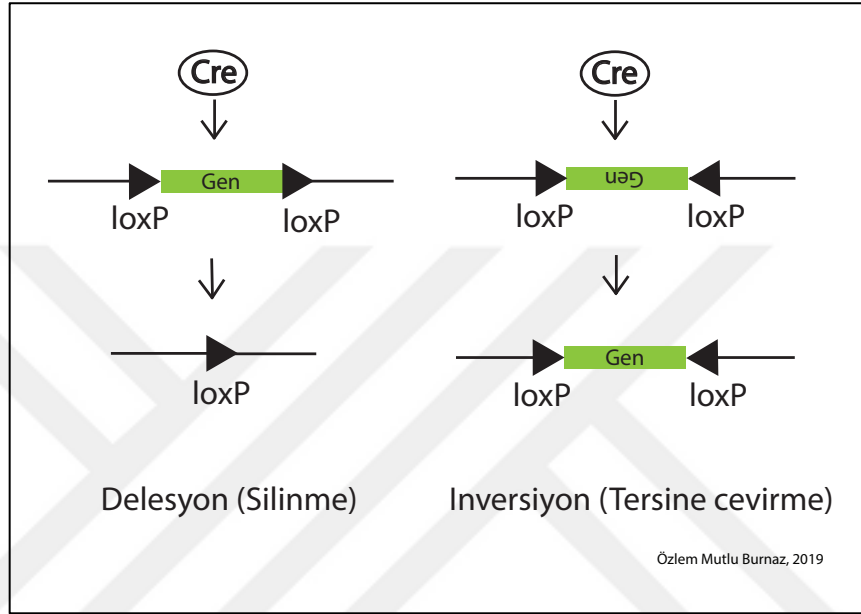
Döngü sayısı	Plaka Sıcaklığı	Süre (dk)
1	95°C	01:00
	95°C	00:30
37	60°C	00:20
	68°C	00:45
1	72°C	05:00

5.2.2.3. Jel elektroforez ve görüntüleme

Çoğaltılan DNA, hazırlanan agaroz jel içerisinde jel elektroforez yöntemiyle yürütülerek ağırlıklarına göre ayrıldı ve BioRAD ChemiDoc cihazında görüntülendi. Agaroz jel 3 g agaroz ve 100 µL 1X TAE (40 mM Tris, 20mM glasiyal asetik asit, 1Mm pH:7,6 EDTA- LifeTech (24710030)) çözeltisi ile hazırlandı. Agarın TAE içinde çözünebilmesi için mikrodalga fırında ısıtıldı. Katılaşmasına izin vermeden soğuduktan sonra 5 µL Safeview™ eklendi. Jel tepsiyi DNA kuyucukların oluşmasını sağlayan tarakların takılmasıyla hazırlandı ve daha sonra jel karışımı henüz sıvı haldeyken tepsiye döküldü. Jel soğuyup katılaştıktan sonra ilk kuyucuğa 5 µL DNA belirteci, diğer kuyucuklara 10 µL dokusu alınan hayvanların genomik DNA'ları ve negatif kontrol olarak yaban tipi bir hayvanın DNA'sı yüklendi. PZR kitinde yükleme boyası mevcut olduğu için ayrıca yükleme boyası eklenmedi. Jel elektroforez tankı içinde 15 dakika 100 Volt'ta yürütülen DNA karışımları BioRAD ChemiDoc cihazında görüntülendi. 727 bp uzunluğa sahip DNA bandı bulunduran fare dokularının transgenik olduğu belirlendi. Negatif kontrol olarak kullanılan yaban tipi fare örneğinde cre bandı görülmemesine dikkat edildi.

5.2.3. Kemogenetik manipülasyon

MCH hücrelerinin kemogenetik aktivasyonu için “cre” kodlayan transgenik farelerden (Şekil 5.1) ve DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs) yönteminden faydalanıldı (Şekil 5.2)(70).



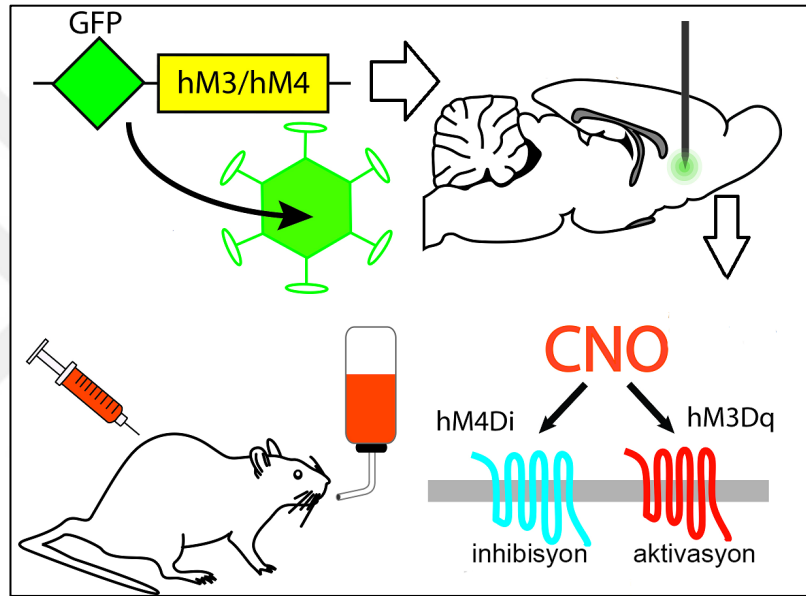
Şekil 5.1. Cre-LoxP Sistemi. Cre enzimi loxP bağlanma bölgelerinin dizilimine göre delesyon veya inversiyon yapar.

Cre bir rekombinaz enzimidir. Substratı “loxP” denen DNA bağlanma bölgeleridir. Cre enzimi loxP bölgelerini tanıdığıında bu bölgeler arasında kalan genetik materyali rekombinasyona uğrattır. Bu rekombinasyon delesyon veya inversiyon şeklinde olabilir. Birden fazla DNA zinciri varlığında translokasyon da gerçekleşebilir. Seçici genetik modifikasyonlar yapmak için cre enzimi kodlayan transgenik fareler üretilir. Bu yöntem tekrarlanabilir bir şekilde nöronları işaretlemeyebilmemizi ve bu nöronları manipüle edebilmemizi sağlar.

Cre geni genomun belirli bir bölgesine yerleştirilir. Örneğin; bu çalışmadaki Pmch-Cre farelerde MCH geninin promotörü sayesinde cre enzimi sentezlenir, böylece MCH’in bolca ifade edildiği bölgelerde cre geni de ifade edilir.

Cre’nin substratı olan loxP bölgeleri de genetik mühendislik yöntemleriyle adeno-ilişkili virus (adeno-associated virus (AAV)) içine paketlenerek kullanılabilir.

LoxP bölgeleri ile seçilen “Gen” birlikte paketlenir ve fareye enjekte edilir. Bu çalışmada kullanılan virüslerdeki “Gen” bölgesi DREADD sisteminin bir elemanı olan sentetik reseptör kodlayan hM4D (insan muskarinik reseptörü 4D (Aspartik asit)) genidir (Şekil 5.2.3.1). LoxP bölgeleri ise cre enziminin inversiyon yapabileceği şekilde dizilidir. MCH sentezleyen nöronlardaki cre enzimleri loxP bölgeleriyle reaksiyona girdiğinde önceden inaktif (ters) durumda bulunan hM4D düz (RNA polimerazın okunabileceği) bir hale gelerek sadece MCH nöronlarında sentezlenir ve hücre zarındaki yerini alarak aktifleşir.



Şekil 5.2. DREADD Sistemi. Floresan işaretçi ve tasarlanmış reseptörü içeren virus beynin hedeflenen bölgesine enjekte edilir. Virus enjeksiyonu yapılmış fare, intraperitoneal veya ağız yoluyla tasarlanmış ilacı aldığı anda aktivasyon/ inhibisyon olayları gerçekleşir (<https://neuwritesd.org/2016/01/28/dawn-of-the-dreadd/> web sayfasından uyarlanmıştır).

DREADD yöntemini biraz daha açıklayacak olursak; bu yöntemde G protein bağlayıcı reseptörler, genetik modifikasyon ile N-Oksit Klozapin (Clazopine–N-Oxide (CNO)) kimyasalını ligand olarak kullanabilir hale getirilir (Doğal ligandı asetilkolindir). Böylece yapılan manipülasyonda zamansal kontrol sağlanmış olur. CNO, hayvana dışarıdan çeşitli yöntemlerle verilebilir.

Bu çalışmada intraperitoneal enjeksiyon yöntemi tercih edildi. Enjeksiyonu takiben ortalama 45 dakika içinde etki görülmesi beklendi. hM4D virüsü hücre

içindeki siklik AMP miktarını azaltarak hücre içi aktiviteyi azaltan bir özellik gösterir (71). hM4D'nin yanında hM3D (insan muskarinik reseptörü 3D) sentetik reseptörü de yaygın olarak kullanılır. hM4D'nin tersine uyarıcı etkisi vardır.

Intraserebral virüs enjeksiyonuyla MCH nöronlarına yerleştirilen hM4D reseptörü intraperitoneal olarak verilen CNO ligandı vasıtasıyla istenilen zamanda nöron inhibisyonunu gerçekleştirir. Davranış testinin öğrenme aşaması sonrasında inhibisyon işlemi gerçekleştirildi. Literatüre göre bellek konsolidasyonu yoğun olarak öğrenme sonrasındaki ilk birkaç saat içinde gerçekleşmektedir (72). Amacımız bu aralıkta hücrel manipülasyonu sağlayarak, spesifik olarak bu manipülasyonun etkilerini araştırmak olmuştur.

Her ne kadar DREADD yönteminde CNO'nun sadece hM4D veya hM3D muskarinik reseptörlerini etkilediği belirtilse de 2017'de yapılmış bir çalışma CNO'nun kan-beyin bariyerini geçemediğini, klozapine dönüşerek etkisini gösterdiğini kanıtlamıştır. Bu sebeple CNO yerine klozapin kullanıldı (73).

5.2.4. Stereotaktik enjeksiyon

Kemogenetik manipülasyonu gerçekleştirme amacıyla 6-10 haftalık erkek farelerin kafa tüyleri tıraş edildi ve stereotaktik çerçeveye yerleştirildi. Kafatasının kaymasını engellemek ve dolayısıyla koordinatların doğru belirlenebilmesini sağlamak amacıyla kulaklara yerleştirilen demir çubuklar yardımıyla kafa iyice sabitlendi. Betadin ile temizlenen kafa derisi bisturi yardımıyla yeterli miktarda kesildi. Kafatasının net bir şekilde görünür duruma geldiği stereo mikroskop (Stereo Discovery V8) yardımıyla kontrol edildi. Bu noktadan itibaren mikroskop ile işlemlere devam edildi. Öncelikle kafatasının üzerindeki ince deri hidrojen peroksit (H_2O_2) ile ayrıldı ve kafatası kemikleri ortaya çıkarıldı. Bu işlem sırasında çok fazla H_2O_2 kullanılmamasına dikkat edildi. Tüm bu işlemler portatif anestezi cihazıyla verilen %1 izofloran (%30 O_2 , %70 N_2O) anestezisi altında gerçekleştirildi. Kafatası kemikleri ortaya çıktıktan sonra bregma ve lambda denilen kafatası kemiklerinin kesişim bölgeleri ardındaki mesafe ölçüldü ve not edildi. Bu mesafe ölçülürken "Narishige mikromanipülatör" kullanıldı. Ölçülen mesafeye uygun olacak şekilde

lateral hipotalamus bölgesi için ortalama x: -1.4/+1.4, y: -1.5, z:-4,7 koordinatları belirlendi ve çift taraflı olacak şekilde mikromotor yardımıyla enjeksiyon pipetinin girebileceği büyüklükte iki delik açıldı. Enjeksiyon koordinatları belirlenirken Paxinos ve Franklin'in beyin atlasından yararlanıldı (74). Delme işlemi sırasında kanama gerçekleşmemesi için basınç uygulamaktan kaçınıldı. Önceden hazırlanmış mikropipet çekici ile uygun boyutlara sahip, içine mineral yağ doldurulmuş mikropipetlere "Narishige enjektörü" ile kullanılacak virüsler çekildi. belirlenen koordinatlara her iki tarafa da 750 nl olacak şekilde virus enjeksiyonu gerçekleştirildi. 10 dakika süre boyunca virüsün dağılması beklendi ve ardından yavaşça pipet beyinden çıkarıldı. Bisturiyle kesilen kafa derisi dikilerek hayvanın anesteziden çıkması beklendi. Enjeksiyonlar üç farklı virus ile gerçekleştirildi. Deney grubuna stereotaktik çerçevede 750 nl cre-bağımlı AAV2-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry ve AAV2-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry virüsü, kontrol grubuna genetik manipülasyon yapıcı bir özelliği bulunmayan cre-bağımlı AAV2/8-FLEX-GFP virüsü enjekte edildi (Şekil 5.4). Operasyon geçiren fareler post-operasyon odasında en az iki hafta süresince iyileşmeye bırakıldı ve virüslerin aktivitesi beklendi.

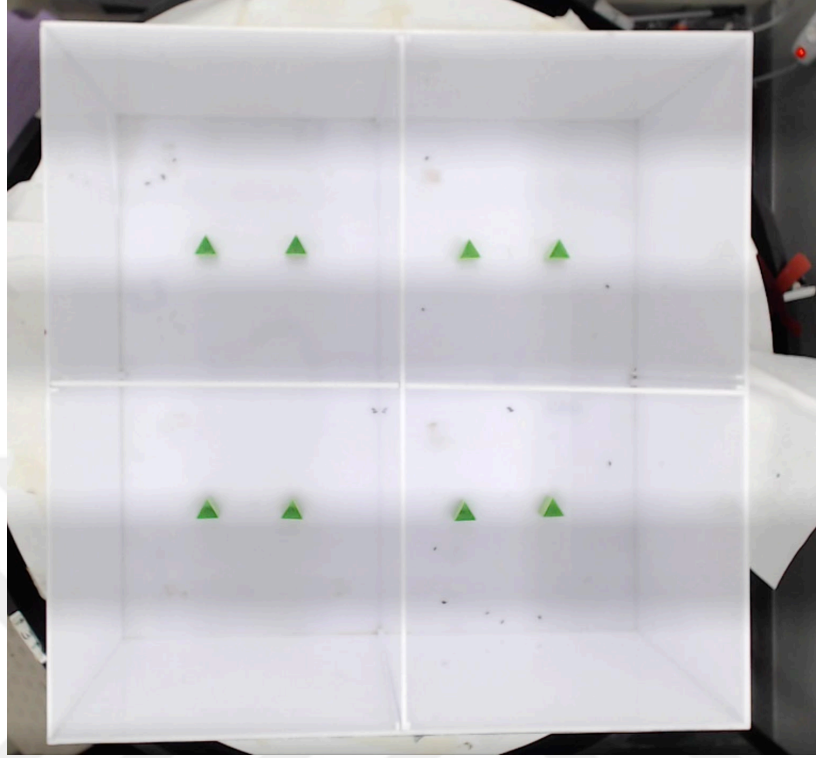
Enjeksiyonlar ve davranış deneyleri iki set halinde yapılmış olup deney tarihleri ve kullanılan virus türleri aşağıdaki tabloda ayrıntılı bir biçimde belirtilmiştir (Tablo 5.6). Deney grubundaki farelerin MCH hücrelerinde değiştirilmiş hM4D reseptörlerinin ifade edilmesi beklenirken kontrol grubunda bir değişiklik beklenmedi. Kafesleme sırasında fareler dört veya üç hayvandan oluşan gruplara ayrıldı ve mümkün olduğunca gruplar kafeslere eşit dağıtıldı (iki deney, iki kontrol hayvanı olacak şekilde).

Tablo 5.6. Virüs Enjeksiyonları

Hayvan Kodu	Doğum Tarihi	Operasyon Tarihi	Operasyon Türü	Davranış Analizi Tarihleri	Sakrifikasyon Tarihi
369	15.10.17	09.01.18	AAV2/8-FLEX-GFP	SF:09-10-11.4.18 CZ: 25-26.4.18	03.05.18
370	15.10.17	10.01.18	AAV2-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry	SF:09-10-11.4.18 CZ: 25-26.4.18	04.05.18
368	15.10.17	10.02.18	AAV2-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry	SF:09-10-11.4.18 CZ: 25-26.4.18	03.05.18
320	15.11.18	18.01.18	AAV2-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry	SF:14-15-16.4.18 CZ: 27-28.4.18	04.05.18
322	15.11.18	18.01.18	AAV2/8-FLEX-GFP	SF:14-15-16.4.18 CZ: 27-28.4.18	04.05.18
747	19.02.18	18.01.18	AAV2/8-FLEX-GFP	SF:2-3-4.6.18 CZ: 16-17.6.18	26.06.18
797	19.02.18	11.05.18	AAV2/8-FLEX-GFP	SF:2-3-4.6.18 CZ: 16-17.6.18	26.06.18
799	19.02.18	11.05.18	AAV2-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry	SF:2-3-4.6.18 CZ: 16-17.6.18	26.06.18
746	19.02.18	13.05.18	AAV2-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry	SF:2-3-4.6.18 CZ: 16-17.6.18	26.06.18
744	19.02.18	13.05.18	AAV2-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry	SF:28.5-1-2.6.18 CZ: 12-13.6.18	25.06.18
745	19.02.18	13.05.18	AAV2-EF1a-DIO-	SF:28.5-1-2.6.18	25.06.18

			hM4D(Gi)-mCherry	CZ: 12-13.6.18	
750	19.02.18	13.05.18	AAV2/8-FLEX-GFP	SF:28.5-1-2.6.18 CZ: 12-13.6.18	25.06.18
749	19.02.18	13.05.18	AAV2/8-FLEX-GFP	SF:28.5-1-2.6.18 CZ: 12-13.6.18	25.06.18
901	01.03.18	14.05.18	AAV2/8-FLEX-GFP	SF:4-5-6.6.18 CZ:18-19.6.18	27.06.18
748	01.03.18	14.05.18	AAV2/8-FLEX-GFP	SF:4-5-6.6.18 CZ:18-19.6.18	27.06.18
907	01.03.18	14.05.18	AAV2/8-FLEX-GFP	SF:6-10-11.6.18 CZ:20-21.6.18	28.06.18
902	01.03.18	14.05.18	AAV2-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry	SF:4-5-6.6.18 CZ:18-19.6.18	27.06.18
904	01.03.18	14.05.18	AAV2-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry	SF:4-5-6.6.18 CZ:18-19.6.18	27.06.18
908	01.03.18	14.05.18	AAV2-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry	SF:6-10-11.6.18 CZ:20-21.6.18	28.06.18

5.2.5. Yeni nesne tanıma testi



Resim 5.1. Yeni nesne tanıma testi aparatı. Aynı anda en fazla dört fare ile deney yapılabilir. Fareler alışma evresinde hangi bölmeye alındıysa deney süresince o bölmede izlenmiştir.

Yeni nesne tanıma testi, farelerin önce iki aynı tip, daha sonra biri öncekiyle aynı diğeri yeni olan nesnelere aynı ortam içinde bırakılarak yeni ve eski nesnelere ilgilenme miktarının karşılaştırıldığı bir testtir. Bellek çalışmalarında yaygın olarak kullanılır. En yaygın kullanılanı üç günlük versiyonudur. Bu çalışmada da aşağıda anlatılan üç günlük versiyon kullanılmıştır. Hayvan biriminde on ikişer saatlik aydınlık/karanlık çizelgesi uygulanır ve ışıklar sabah 7:30'da açılır. Davranış analizi ışıklar açıldıktan bir saat sonra başlayacak şekilde planlanmıştır.

5.2.5.1. Alışma evresi (Gün 1)

Fareler davranış deneyinin yapılacağı odaya getirilip otuz dakika boyunca tekli kafeslerde bekletildikten sonra (bu bekleme aşaması her deney gününde gerçekleştirilir) alkolle temizlenmiş boş aparat içine alındı ve altı dakika araştırma yapmaları için bekletildi (Resim 5.1).

5.2.5.2. Tanıma evresi (Gün 2)

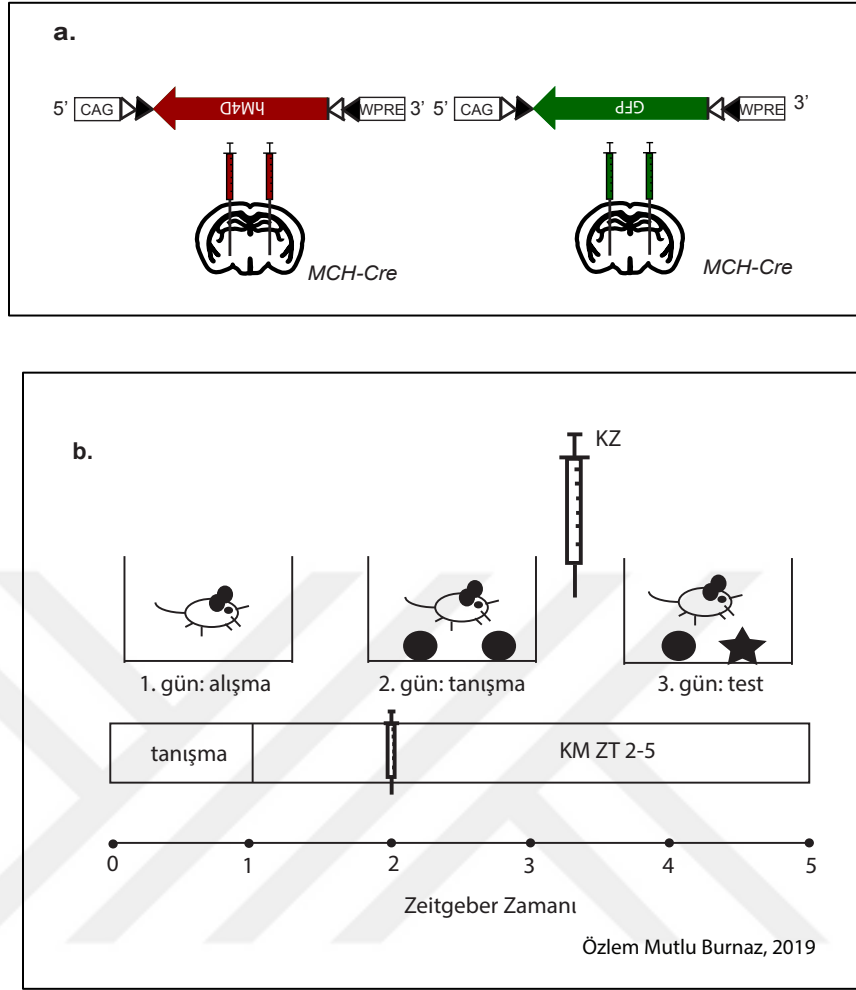
Bekleme aşamasından sonra fareler tekrar boş aparat içine bırakıldı ve altı dakika bekletildi. Süre sonunda tekli kafeslerine geri alındı. Üç dakika tekli kafeste vakit geçirdikten sonra içine Şekil 5.5a ve c'de görüldüğü gibi birbirinin aynısı iki nesnenin olduğu aparata tekrar koyuldu. Aynı farenin her zaman aynı aparata koyulmasına dikkat edildi. Altı dakikanın sonunda tekrar tekli kafeslere alındılar ve bu işlem iki kez daha tekrarlandı. Deney sonunda hayvanlar tartıldı ve bir saat beklemeye alındı. Bir saatin bitiminde ikincil DREADD ajanı olan klozapin veya serum fizyolojik enjeksiyonu gerçekleştirildi. Enjeksiyon sonrasında beklemeden dinlenme odasına götürülürler. Klozapin konsantrasyonu 0.01mg/kg olacak şekilde belirlendi (73).

5.2.5.3. Test evresi (Gün 3)

Bekleme aşamasından sonra herhangi bir alışma evresi olmaksızın fareler Şekil 5.5b veya d'deki gibi bir tanesi yenisiyle değiştirilmiş nesnelerin yanına bırakıldı. Test bitiminde fareler tartılarak dinlenme odasına alındı.

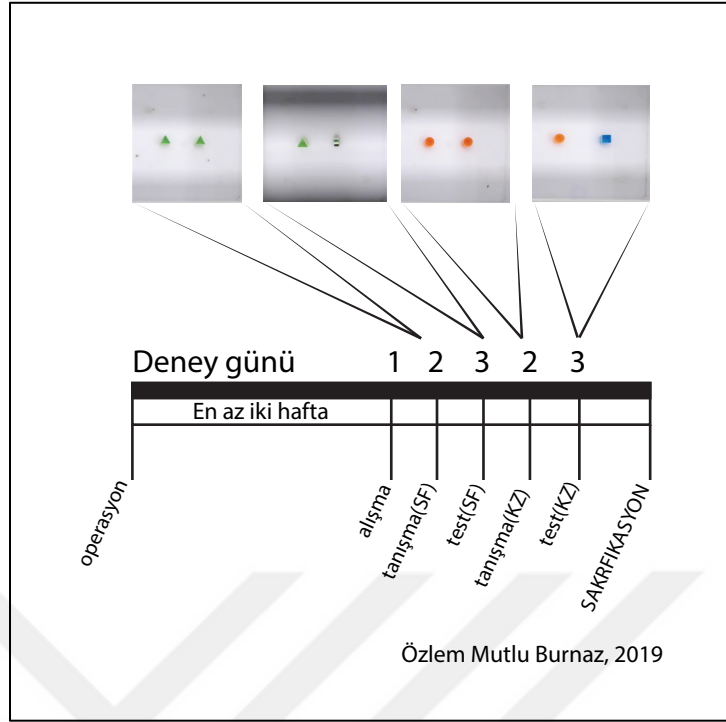
Test evresinde farelerin yeni gelen nesneyle daha yoğun bir etkileşim içine girdiği bilinmektedir. Bu durum, eski nesnenin hatırlandığının bir göstergesidir. Farelerin her bir nesneyle ne kadar vakit geçirdiği, kaç kere burun dokunuşunda bulunduğu, cisimlerin etrafında belirlenen bir bölgede ne kadar vakit geçirdiği ölçülebilir (25).

Bu protokol Prince ve arkadaşlarının çalışmaları referans alınarak oluşturuldu (72). Test günü kamerayla (Logitech C920) 6 dakika boyunca kaydedildi. Videolar manuel olarak kronometreyle ölçülerek analiz edildi ve skorlardı. Test aşamasında farelerin her bir nesneye kaç kere dokunduğu (burun dokunuşu skoru) ve nesnelere ne kadar sürede inceledikleri (araştırma süresi skoru) kaydedildi. Daha sonra yeni nesne ve eski nesne skorları arasındaki fark bellek skoru olarak kullanıldı.



Şekil 5.3. Stereotaktik enjeksiyonlar ve deney tasarımı. a. Bir grup MCH nöronlarının inhibe olmasını sağlayacak olan cre-bağımlı AAV2-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry virüsüyle enfekte edilirken diğer grup sadece floresan işaretçi taşıyan cre-bağımlı AAV2/8-FLEX-GFP virüsüyle enfekte edildi. **b.** Alışma, tanışma ve test evrelerinden oluşan üç günlük yeni nesne tanıma testi uygulandı. her gün deneye aynı saatte başlandı (ZT 0). Tanışma günündeki nesnelere öğrenme evresi ZT 0 ile ZT 1 arasında tamamlandı. ZT 2'de intraperitoneal klozapin enjeksiyonu gerçekleştirildi. KM: kemogenetik manipülasyon; ZT: zeitgeber zamanı (Zeitgeber time); KZ: klozapin; CAG: sitomegalovirus kolaylaştırıcı/ tavuk beta aktin promotörü (cytomegalovirus early enhancer/chicken β actin promoter); WPRE: woodchuck hepatit virüsü (woodchuck hepatitis virus)

Nesnelerle tanışma evresinin ardından MCH nöron inhibisyonu gerçekleştirildi. Günde sadece bir adet klozapin enjeksiyonu uygulandı. Bu inhibisyonun farenin nesnelere tanışma evresinin ardından gelen REM uykusu miktarını azaltması ve bu azalmanın bellek konsolidasyonu olumsuz etkilemesi beklenmekteydi.



Şekil 5.4. Yeni nesne tanıma testi, deney planı ve kullanılan nesnelere. Üstte yeni nesne tanıma testinde kullanılan nesnelere, altta deney tasarımı şeması gösterilmektedir. Nesnelere iki set halinde kullanılmıştır, setlerden birinde serum fizyolojik, diğerinde klozapin uygulaması yapılmıştır. SF: serum fizyolojik; KZ: klozapin

Deneye bir bazal ölçüm sağlayabilmek için de klozapin enjeksiyonu yapılan davranış deneyinden önce aynı hayvanlara serum fizyolojik ve alkol çözeltisiyle bir set daha uygulama yapıldı. Böylece klozapinin tek başına bellek konsolidasyonu üzerindeki etkisi de kontrol edildi. İlk sette serum fizyolojik (SF) içinde klozapinle (KZ) aynı miktarda %100 EtOH, ikincisinde 0,01 mg/kg oranında klozapin içeren 200 µl %100 EtOH vererek klozapinin bellek performansını etkileyici bir etkisi varsa bunu da değerlendirmeye alabilmek amaçlandı. Bunun yanında Şekil 5.5.'te görülen iki nesne grubunu kafesler arasında randomize ederek herhangi bir dış etkenin deney sonuçlarını etkilemesinin önüne geçmeye çalışıldı. Ayrıca aynı gün deneyi yapılan her dört hayvandan ikisinin deney grubu, ikisinin kontrol grubu olmasını sağlandı. Böylece çok katmanlı bir kontrol sistemi kurulmuş oldu.

Nesne tanıma testi sırasında hipokampus, insular korteks, perirhinal korteks, medial prefrontal korteksin aktif olduğu belirtilmiştir (35).

5.2.6. Elektrofizyoloji

Klozapinin hücre inhibisyonunu gerçekleştirdiğini göstermek amacıyla hM4D virüsü enjekte edilmiş Pmch-Cre fare kesitinden *ex vivo* elektrofizyolojik kayıt alındı.

Öncelikle hücre aktivitesi ölçülecek 300 µm kalınlığındaki fare kesitleri fikse edilmeden yapay kesme solüsyonu (234 g/mM sükröz, 28 g/mM NaHCO₃, 7 g/mM dekstroz, 7 g/mM MgCl₂, 0,5 g/mM CaCl₂, 1 g/mM sodyum askorbat, 3 g/mM sodyum pürivat, 1,25 mM NaH₂PO₄) içerisinde hazırlandı. Kesitler hazırlanırken “Leica VT1000S vibratom cihazı” kullanıldı. Kesme küveti %95 O₂ ve %5 CO₂ içeren gaz karışımı ile durmaksızın havalandırıldı. Daha sonra hazırlanan kesitler -80°C’de 20 dakika soğumaya bırakıldı. Soğuyan kesitler yapay beyin omurilik sıvısına (artificial cerebrospinal fluid (aCSF)) (119 g/mM NaCl, 25 g/mM NaHCO₃, 7 g/mM dekstroz, 2,5 g/mM KCl, 7 g/mM MgCl₂, 0,5 g/mM CaCl₂, 1 g/mM sodyum askorbat, 3 g/mM sodyum pürivat, 1,25 mM NaH₂PO₄) alınarak yama kıskacının floresan mikroskopunda incelendi ve enfekte olan hücreler belirlendi. Yama kıskacı düzeneğindeki doku aynı şekilde %95 O₂ ve %5 CO₂ gazıyla havalandırılan bir perfüzyon sisteminde tutuldu. Cam mikropipet çekiciyle uygun ölçülerde çekilerek içine aCSF eklendi ve hücre-bağlantılı (cell-attached) spontan elektriksel aktivite ölçümü başlatıldı.

Aktivite kaydedildikten sonra perfüzyon banyosuna 3,5 mM klozapin eklendi ve oluşan değişiklik kaydedildi.

5.2.7. Kesit hazırlama

Davranış deneyinin bitimini takip eden birkaç gün içinde tanışma evresi yeni nesnelere tekrar edildi. Bu yeni nesnelere eğitimin ardından tıpkı davranış deneyinde olduğu gibi ZT 2’de ikincil DREADD elementi klozapinin sistemik enjeksiyonu gerçekleştirildi. Sonrasında beyin diseksiyon işlemi uygulandı ve kardiyak perfüzyon tekniğiyle beyin dokusu %4 paraformaldehit (PFA) ile fikse edildikten sonra 80 mikrometrelik kesitler halinde vibratom cihazı (Leica VT1000S) kullanılarak ince kesitler alındı ve morfolojik inceleme yapıldı.

5.2.8. İmmunohistokimya ve görüntüleme

İmmunohistokimya antikorların istenilen proteinlere bağlanması prensibine dayanır. Floresan işaret barındıran antikor doku üzerindeki istenilen proteinlerine bağlanan bir başka antikora bağlanarak proteininin yoğun olarak sentezlendiği bölgeleri işaretler.

Virus enjeksiyonundan sonra enfekte edilen bölgenin doku analizi ile konfirme edilmesi amacıyla immunohistokimya çalışması gerçekleştirildi. Anti-MCH (Phoenix Pharmaceuticals-H-070-47) kullanılarak yapılan immunohistokimya ile toplam MCH hücre sayısı, stereotaktik olarak enjekte edilen virus içine paketlenmiş floresan işaretçi (mcherry) ile enfekte olan hücre sayısı belirlendi. 80 mikrometre kalınlığında alınmış her üç kesitten biri hücre sayımı işlemine tabi tutuldu. Görüntüler LSM 800 konfokal mikroskobu ile alındı.

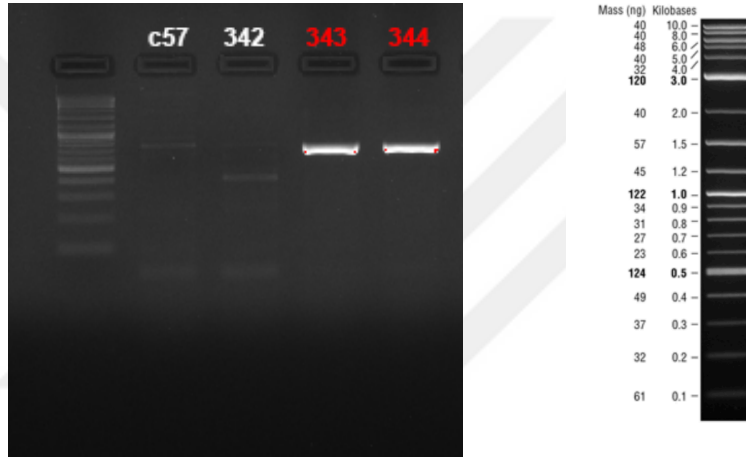
5.2.9. İstatistiksel Analiz

Davranış deneyinin test aşamasında farelerin nesnelere araştırma miktarı manuel olarak kronometre kullanılarak kaydedildi. Yeni nesne ile ilgilenme süresi T_y eski nesne ile ilgilenme süresi T_e 'dir. $T_y - T_e$ fark değeri her hayvan için bellek performansını verir. Her bir bellek performansı serum fizyolojik (SF) koşulunda deney ve kontrol hayvanlarının karşılaştırılması, klozapin (KZ) koşulunda deney ve kontrol grubunun karşılaştırılması, her grubun klozapin ve serum fizyolojik durumunda karşılaştırılması ile değerlendirildi. İlk iki karşılaştırma için eşleşmesiz, sonuncu için eşleşmeli Student's t test istatistik analizi Microsoft Office Excel yazılımı kullanılarak uygulandı.

6. BULGULAR

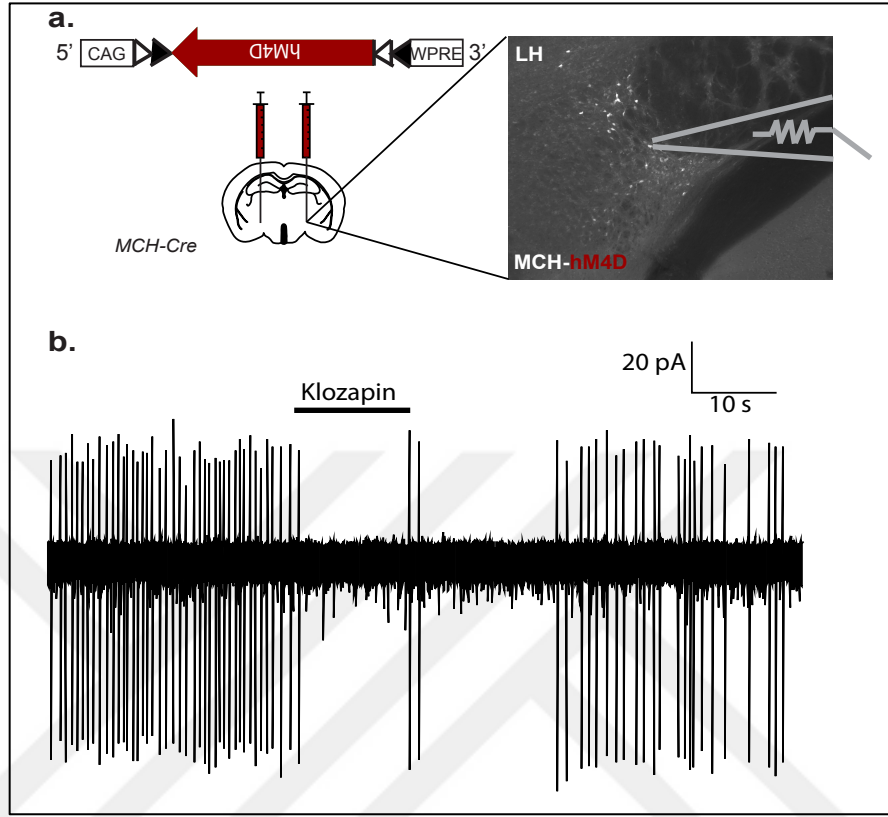
6.1. Genotipleme

BioRAD ChemiDoc cihazıyla yapılan görüntüleme sonucuna ve DNA belirteci ile yapılan karşılaştırma sonucuna göre cre bantları belirlendi ve bu bantlara sahip olan hayvan dokuları transgenik; sahip olmayan dokular yaban tipi olarak ayrıldı. Deneylede sadece transgenik cre hayvanlar kullanıldı (Cre gen uzunluğu: 727 bp) (Resim 6.1.).



Resim 6.1. Deneylede kullanılan transgenik hayvanların genotiplenmesi. Solda genotipleme sonucu gösterilmektedir. Üstte DNA örneklerinin ait olduğu farelerin kodları belirtilmiştir. Parlak bantlar çoğalan cre DNA'sıdır. Sağda jel yürütme sırasında kullanılan DNA belirteci gösterilmektedir. c57: C57BL/6 yaban tipi fare

6.2. MCH Nöron İnhibisyonunun Konfirmasyonu

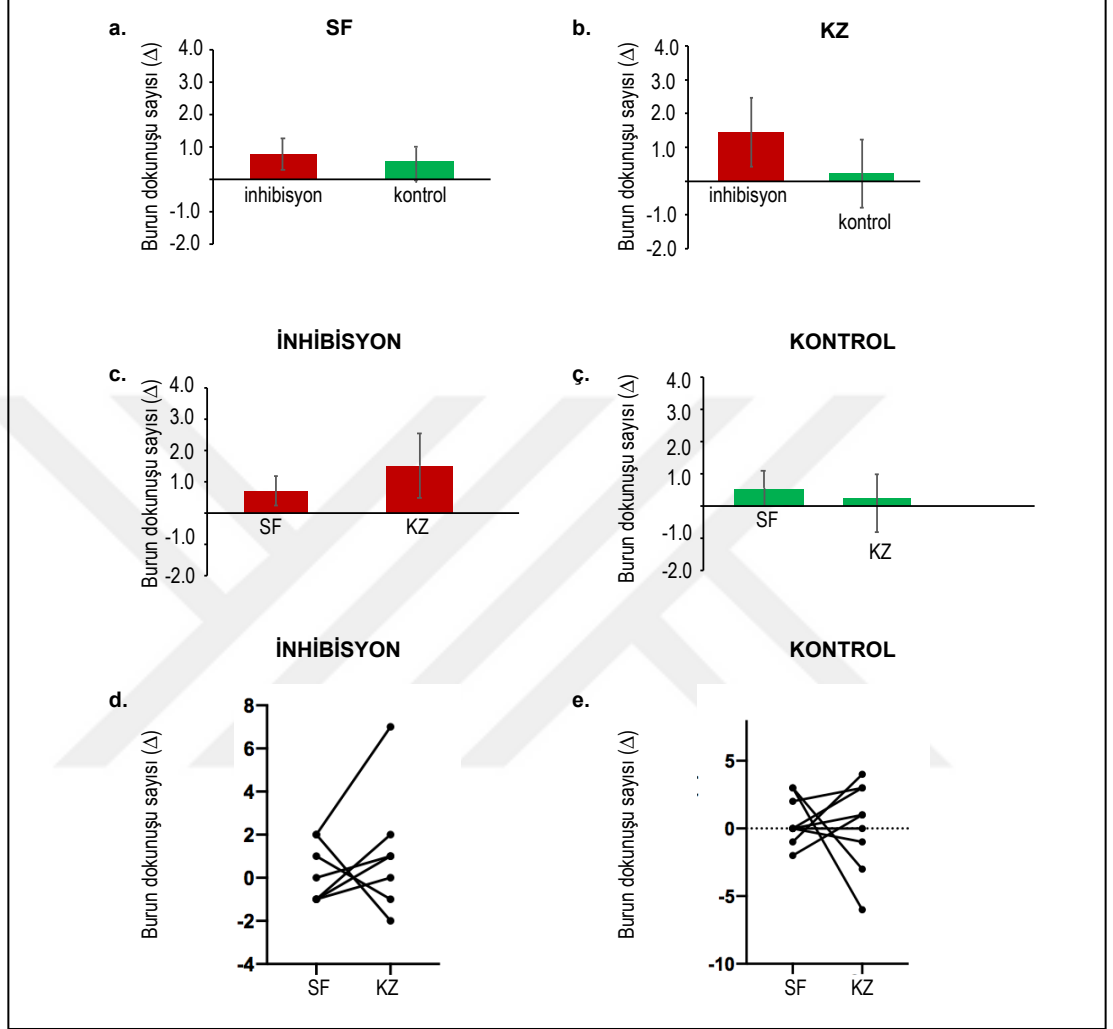


Şekil 6.1. Ex vivo spontan hücre aktivitesi takibi ve klozapin etkisi. a. Lateral hipotalamusa yapılan AAV2/1-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry virüsü enjeksiyonunun şematik gösterimi ve yama kısıkcı (patch clamp) mikroskobunda görülen enfekte olmuş nöronlar. İşaretli bölgeden nöron seçilerek kayıt alınmıştır. **b.** Hücre aktivitesi Clampfit yazılımı ile kaydedilmiştir. Kayıt başladıktan sonra yama kısıkcı banyosuna klozapin eklendiğinde hücre aktivitesinin durduğu ve klozapin perfüzyon sistemiyle atılarak konsantrasyonunun düşmesiyle aktivitenin yeniden arttığı gözlenmiştir.

Cre-bağımlı AAV2/1-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry virüsü enjekte edilmiş *Pmch-Cre* farenden iki haftanın sonunda canlı kesit alındı. Enjeksiyonun başarıyla gerçekleştiği düzenek üzerindeki floresan mikroskobu ile belirlendi ve enfeksiyona bağlı floresan ışımaya yapan MCH nöronlarındaki spontan aktivite hücre bağlantılı yama kısıkcı (cell-attached patch clamp) yöntemiyle kaydedildi. Banyo solüsyonuna klozapin eklendiğinde (3,5 mM) nöron aktivitesinin bir süre durduğu gözlemlendi (Şekil 6.1.).

6.3. MCH İnhibisyonunun Bellek Performansına Etkisi

6.3.1. Burun dokunuşu skorları



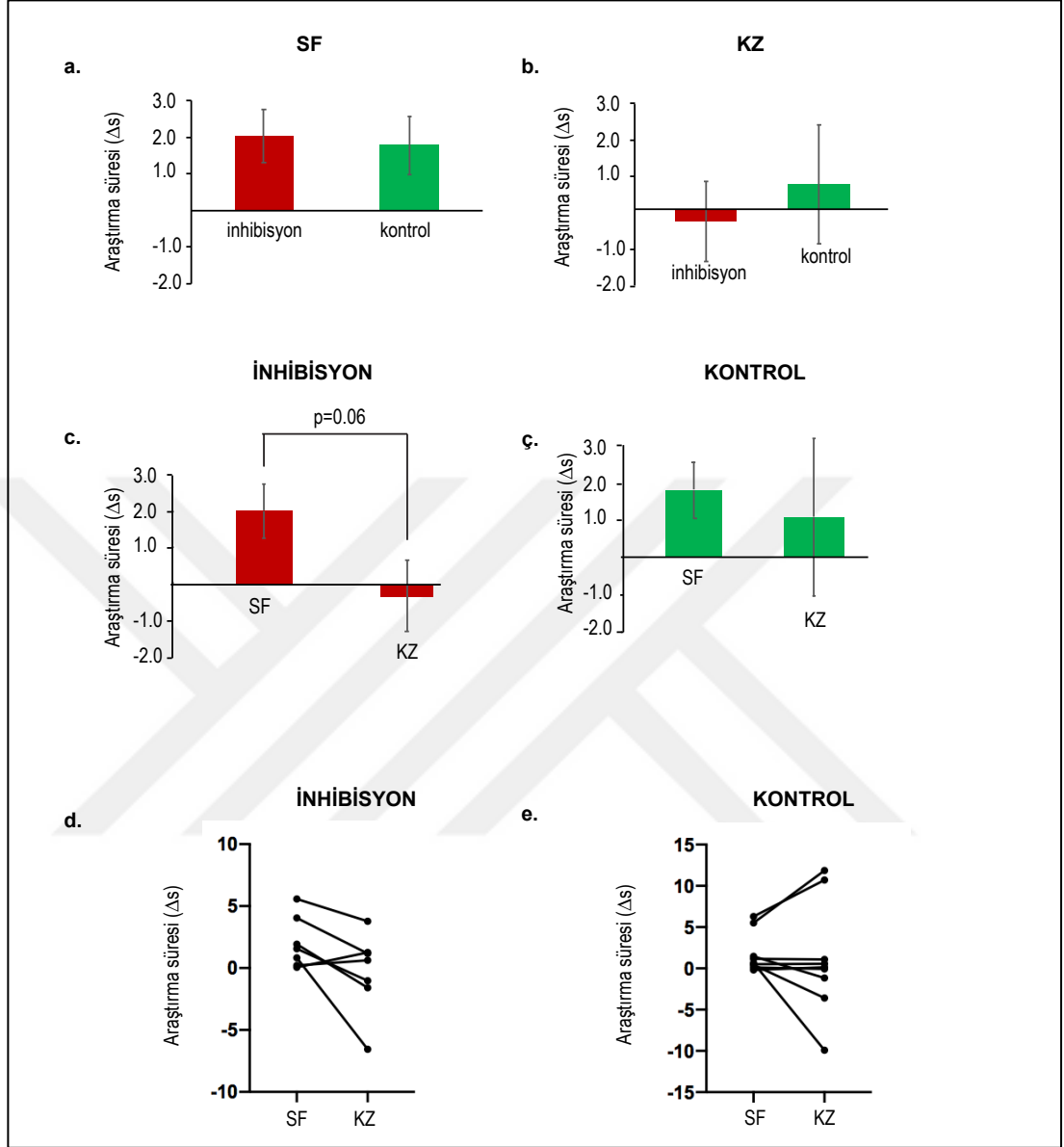
Şekil 6.2. Burun dokunuşlarına göre bellek performansı bulguları. a. Tanıma evresinde intraperitoneal SF verildiği koşulda stereotaktik cre-bağımlı AAV2/1-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry yapılmış fareler ile stereotaktik AAV2/8-FLEX-GFP enjeksiyonu yapılmış farelerin burun dokunuşlarının ortalama değerlerinin karşılaştırılması. b. Tanıma evresinde intraperitoneal KZ verildiği koşulda cre-bağımlı AAV2/1-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry yapılmış fareler ile AAV2/8-FLEX-GFP enjeksiyonu yapılmış farelerin burun dokunuşlarının ortalama değerlerinin karşılaştırılması. c. Cre-bağımlı AAV2/1-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry virüsüyle stereotaktik enjeksiyon uygulanmış farelerin SF ve KZ koşullarında kendi içinde burun dokunuşlarının ortalama değerlerinin karşılaştırılması. ç. Cre-bağımlı AAV2/8-FLEX-GFP stereotaktik enjeksiyonu yapılmış farelerin SF ve KZ koşullarında kendi içinde burun dokunuşlarının ortalama değerlerinin karşılaştırılması. d. Cre-bağımlı AAV2/1-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry virüsüyle stereotaktik enjeksiyon uygulanmış farelerin ayrı ayrı burun dokunuşu skorlarının SF ve KZ koşullarındaki değişiminin gösterimi e. Cre-

bağımlı AAV2/8-FLEX-GFP mCherry virüsüyle stereotaktik enjeksiyon uygulanmış farelerin ayrı ayrı burun dokunuşu skorlarının SF ve KZ koşullarındaki değişiminin gösterimi. SF: serum fizyolojik; KZ: klozapin

Test evresi boyunca farelerin nesnelere dokunma miktarları eski ve yeni nesnelere için sayıldı. Sayma işlemi kör (blind test) gerçekleştirildi. Daha sonra yöntemde belirtildiği şekilde değerlerin farkları alındı ve bu farklar bellek performansı değerleri olarak kaydedildi. Deney sonucunda inhibisyon ve kontrol grubu arasında eşleşmesiz (unpaired) Student's t test ile yapılan karşılaştırmada serum fizyolojik (SF) şartlarında da klozapin (KZ) uygulaması şartlarında bir fark görülmedi (Şekil 6.2. a,b).

Aynı şekilde grupların kendi içinde eşleşmeli (paired) Student's t test ile yapılan karşılaştırmalarında da SF ve KZ şartlarının burun dokunuşu farkı ortalamalarında bir değişiklik yaratmadığı görüldü (Şekil 6.3.1.c,ç). İnhibisyon ve kontrol gruplarındaki her bir fare için her bir burun dokunuşuna bağlı bellek performansı değerindeki SF ve KZ durumlarına bağlı değişim alt alta çizgi grafiği ile gösterilmiştir (Şekil 6.2.d,e).

6.3.2. Araştırma süresi skorları

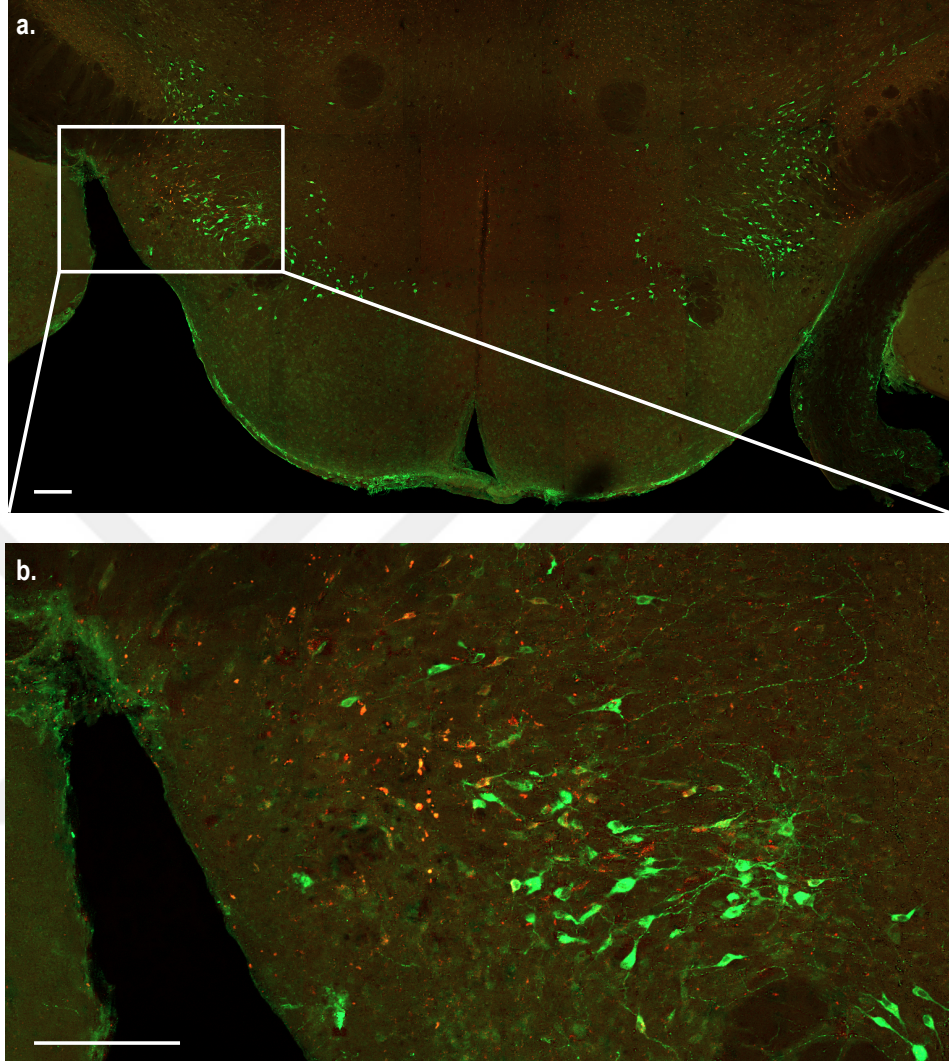


Şekil 6.3. Araştırma sürelerine göre bellek performansı bulguları. a. Tanıma evresinde intraperitoneal SF verildiği koşulda stereotaktik cre-bağımlı AAV2/1-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry yapılmış fareler ile stereotaktik AAV2/8-FLEX-GFP enjeksiyonu yapılmış farelerin araştırma sürelerinin ortalama değerlerinin karşılaştırılması. b. Tanıma evresinde intraperitoneal KZ verildiği koşulda cre-bağımlı AAV2/1-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry yapılmış fareler ile AAV2/8-FLEX-GFP enjeksiyonu yapılmış farelerin araştırma sürelerinin ortalama değerlerinin karşılaştırılması. c. Cre-bağımlı AAV2/1-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry virüsüyle stereotaktik enjeksiyon uygulanmış farelerin SF ve KZ koşullarında kendi içinde araştırma sürelerinin ortalama değerlerinin karşılaştırılması. d. Cre-bağımlı AAV2/1-EF1a-DIO-hM4D(Gi) araştırma sürelerinin SF ve KZ koşullarındaki değişiminin

gösterimi e. Cre-bağımlı AAV2/8-FLEX-GFP mCherry virüsüyle stereotaktik enjeksiyon uygulanmış farelerin ayrı ayrı araştırma sürelerinin SF ve KZ koşullarındaki değişiminin gösterimi. SF: serum fizyolojik; KZ: klozapin

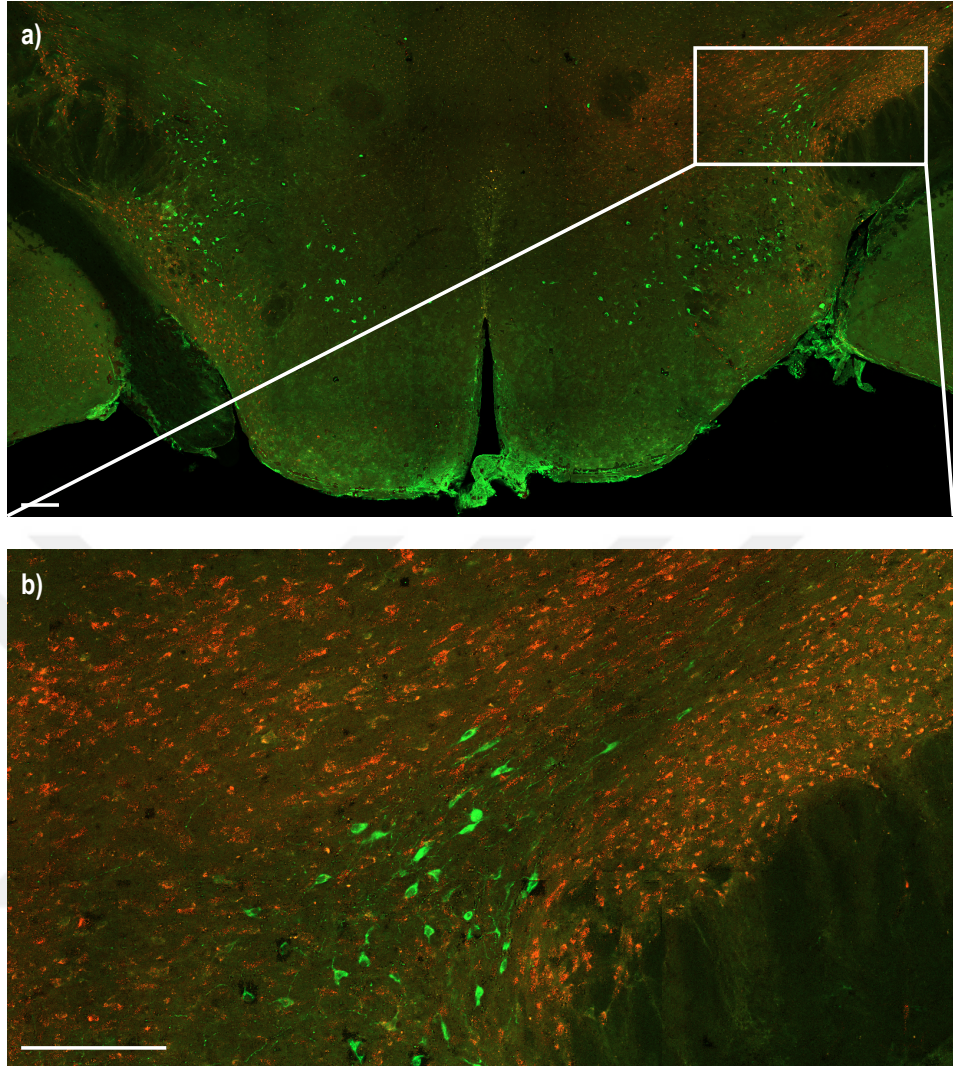
Nesnelere dokunma sayısının haricinde nesnelere ilgilenme ve onları araştırma süreleri de kaydedildi. Tıpkı burun dokunuşuna bağlı bellek performansının hesaplandığı gibi eski ve yeni nesnelere arasındaki araştırma süresi farkı da kaydedildi. Kontrol farelerinde ve deney farelerinde bellek performansları, SF ve klozapin aşamalarındaki skorlara göre eşleşmesiz Student's t test ile kıyaslandığında herhangi bir fark görülmedi (Şekil 6.3. a,b); ancak gruplar kendi içlerinde eşleşmeli Student's t test ile kıyaslandıklarında KZ şartında SF şartına göre azalan bir bellek performansına yakın bir durum gösterdiler. ($p=0,06$). Bu durum kontrol grubunda tekrarlanmadı. İnhibisyon grubundaki karşılaştırmada gözlemlenen fark istatistiksel açıdan anlamlı çıkmadı. Her bir fare için değerlerdeki değişim ayrı ayrı incelendiğinde inhibisyon grubunda çoğunlukla azalma eğilimi olduğu gözlemlendi (Şekil 6.3 c-e).

6.4. MCH Nöronları Enfeksiyonunun Doku analiziyle Konfirmasyonu



Resim 6.2. Cre-bağımlı AAV2-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry virüsüyle hedeflenmiş MCH nöronları. **a.** Lateral hipotalamus ve zona inserta'ya bilateral stereotaktik enjeksiyon sonrası uygulanan anti-MCH (Phoenix Pharmaceuticals-H-070-47) immunohistokimya görüntüsü (Büyütme: 20x). **b.** Cre-bağımlı AAV2-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry virüsüyle enfekte olmuş (kırmızı), MCH nöronlarının (yeşil) yakın plan görüntüsü. Barlar: 100 μ m

AAV2-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry virüsüyle enfekte edilmiş nöronlar MCH antikoruyla boyandı. Yeşil renk MCH antikoruyla boyanmış nöronları, kırmızı renk virüsle başarılı bir şekilde enfekte edilmiş nöronları göstermektedir (Resim 6.2).



Resim 6.3. Cre-bağımlı AAV2-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry ile hedeflenmiş MCH nöronları a. Lateral hipotalamus ve zona inserta'ya bilateral stereotaktik enjeksiyon sonrası uygulanan anti-MCH (Phoenix Pharmaceuticals-H-070-47) immunohistokimya görüntüsü (Büyütme: 20x) Bar: 200 μm **b.** Cre-bağımlı AAV2-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry virüsüyle enfekte olmuş nöronların (kırmızı) ve MCH nöronlarının (yeşil) eşleşme görülmeyen yakın plan görüntüsü. Barlar: 100 μm .

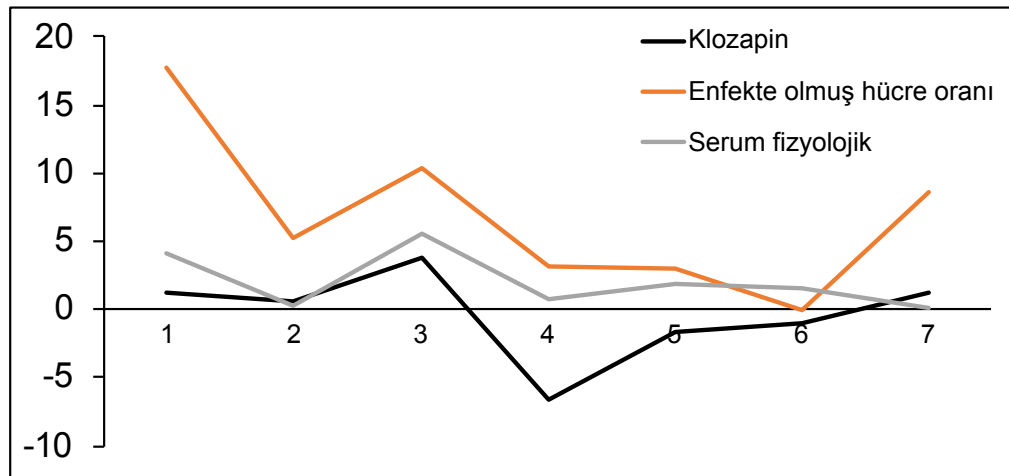
AAV2-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry virüsüyle enfekte edilmiş üç farenin dokularında anti-MCH immunohistokimya çalışması sonucunda sistemin çalışmadığı tespit edildi. Enfekte olan hücreler (kırmızı) MCH antikoruyla boyanmadı (yeşil) (Resim 6.3). Sistemin çalışmadığı tespit edilen fareler davranış analizinden çıkarıldı.

Tablo 6.1. Dokulara göre enfekte olmuş MCH nöron sayıları ve oranları

Hayvan Kodu	Enfekte Hücre Sayısı	MCH nöron sayısı	Enfekte olan MCH hücre oranı (%)
744	47	264	17,8
746	90	869	10,3
799	46	1453	3,1
904	0	1366	0
908	94	1088	8,6
902	33	1081	3
745	53	1002	5,2

MCH antikoru ile boyanan hücreler (yeşil) ve virus floresan işaretçisini içeren hücreler sayıldı (kırmızı). Sağ sütun hayvan kodlarını göstermektedir (Şekil 6.4) (Şekil 6.5).

Hücreler ImageJ Fiji uygulamasıyla manuel olarak sayıldı ve enfekte olan hücrelerin MCH hücrelerinin toplamına olan oranları belirlendi (Tablo 6.1)



Şekil 6.4. Korelasyon grafiği. Enfekte olmuş MCH hücreleri oranının klozapin ve serum fizyolojik şartlarında kemogenetik inhibisyon uygulanmış farelerin bellek performanslarıyla korelasyonu.

Enfeksiyon oranının belirlenmesinin ardından AAV2-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry virüsüyle enfekte olmuş farelerin klozapin ve serum fizyolojik koşullarındaki bellek skorları enfekte olmuş hücre oranlarıyla Spearman's rho korelasyon hesaplaması kullanılarak SPSS programı ile analiz edildi. Klozapin koşulundaki korelasyon katsayısı ve p değerleri Tablo 6.2'de gösterilmiştir (Ayrıca bkz: Şekil 6.4). Klozapin koşulundaki hücre oranı korelasyonu anlamlılık sınırında olarak belirlenirken serum fizyolojik koşulundaki hücre oranı korelasyonu istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Tablo 6.2. Spearman's rho korelasyonu. N: örnek sayısı

			(SF) Araştırma Süresi	(KZ) Araştırma Süresi
Spearman's rho	Hücre oranı	Korelasyon katsayısı	0,286	0,750
		P değeri	0,535	0,052
		N	7	7

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bellek konsolidasyonu pek çok beyin bölgesinin koordineli çalışmasını ve uygun bir nörotransmitter dengesinin sağlanmasını gerektirir. Sistem konsolidasyonu olarak da adlandırılan bu işlemleri araştırmak için sistemin elemanlarının tek tek deşifre edilmesi ve bilgisayar programcılığında yararlanarak elemanların birbiriyle bağlantısallığının incelenmesi gerekmektedir. Sistemdeki elemanları deşifre etmek için daha önce bahsedilen engram tanımlama yöntemlerinden yararlanılır. İster hücresele düzeyde ister indirekt görüntüleme teknikleriyle yapılan bir çalışma olsun karşılaşılabilecek engellerden biri her deneyin, bellek türünün ve organizmanın kendine özgü elemanlar barındırabileceği ve bunların arasından evrensel kuralları ayırt etmenin getirdiği zorluklardır. Bu sebeple kullanılan tekniğin özenle seçilmesi, araştırılan bellek türüne uygun olması gerekmektedir.

Retrograd amnezi hastalarındaki medial temporal lob hasarlarının bellekle ilişkilendirilmesiyle başlayan hikayenin günümüzde daha hücre odaklı bir bakış açısıyla örölmeye devam ettiğı söylenebilir. Artık tek sinir hücrelerinden elektriksel kayıt, c-fos immunohistokimya aktivite analizi, fos aktivitesinin ölçüldüğü transgenik fare yöntemleri, kalsiyum görüntülemesi, kemogenetik ve optogenetik yöntemler ve her geçen gün çoğalan çeşitli hücresele etiketleme yöntemleriyle daha önce lezyon, klinik beyin hasarı gözlemleri, farmakolojik inhibisyon ve ablasyonlarla elde edilemeyen bilgilere ulaşmak mümkündür (75). Örneğın korku şartlanması için 2013'te c-fos analizi kullanılarak yapılmış ayrıntılı bir çalışmada korku şartlanması deneyinden sonra aktive olan beyin bölgeleri c-fos boyaması yapılarak tek tek incelenmiş ve aralarındaki bağlantısallıklarının analiz edilerek ağlanmanın yapısı deşifre edilmiştir (76). Bulunan yapıda korku şartlanması için üç temel şebeke belirlenmiştir; bunlar nükleus reuniens, prelimbik korteks ve anterior singulat kortektir (76). Ancak bunların tüm bellek türleri için geçerli olduğı söylenemez. Yeni nesne tanıma testi için yapılmış farklı bir çalışmada ise hippokampusun, insular korteksin, perirhinal korteksin ve medial prefrontal korteksin nesne öğrenme (kodlama) için gerekli beyin bölgeleri olduğı öne sürölmüştür. Diğeri kadar kapsamlı

bir çalışma olmamakla birlikte koordineli çalışan beyin bölgelerini deşifre etmek adına güzel bir temel teşkil eder. Bu çalışmada incelenen bölgeler hippocampus, insular korteks, perirhinal korteks, medial prefrontal korteks, infralimbik bölgeler, anterior singulat korteks, amigdala, olfaktor bulb, temporal ve entorinal korteksten oluşmaktadır (35). Hipotalamus bölgesi incelenmemiştir.

C-fos immunohistokimya tekniği beyin aktivitesi için çok önemli bir rehberdir ve kolay uygulanabilirliği sayesinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır; fakat yeni gelişen teknolojiler arasında bilgi verme açısından o da zayıf kalır. Sadece immunohistokimya ile genetik karakterizasyon yapmak değerlendirildiğinde yetersiz kaldığı görülmektedir. Fonksiyona dair kesin bilgiler vermez. Nedensel ilişki kurulamaz.

Genetik karakteri hedefleyen tekniklerde ise çok daha rafine bir yaklaşımla nöronlar ifade ettiği genlere göre etiketlenir ve gözlemlenir. Bu teknikler geliştirilmeden önce beyin hücreleri, sadece lokasyona, iletişimde kullandığı nörotransmittere ve morfolojisine göre ayırt edilebilmekteydi. Bu özellikler beynimizdeki milyonlarca nöronun ve bağlantının işlevini belirlemek, davranışlarımızla eşleştirmek için yetersiz kalmaktadır. Genetik karakterizasyon, aynı lokasyonda ve aynı morfolojiye sahip olsa dahi farklı işlevleri olan, farklı bağlantılar kuran nöronları ayırt etmemize olanak tanımıştır. Bu yöntemlerden önce kullanılan lezyon çalışmaları veya farmakolojik yaklaşımlarda kalıcı hasar veya hedefe yönelik olmayan ilaç etkileşimleri gibi sorunlar ortaya çıkıyordu. Kalıcı hasar verilen nöronların görevlerinin başka sistemler tarafından devralınması veya hasar verilen bölgedeki hangi nöronların soruna yol açtığı belirlenememesi, elde edilen sonuçlara şüpheyle yaklaşılmamasına ve bazı sonuçların tekrar edilememesine sebep oluyordu. Bu çalışmada kullanılan, yeni geliştirilen tekniklerden olan kemogenetik manipülasyon belli bir beyin bölgesindeki genetik karakterlerine göre işaretlenmiş nöronların hedeflenmesini ve istenilen zamanda bir anahtar sistemi gibi açılıp kapatılabilmesini sağlamaktadır. Kemogenetik manipülasyona benzer bir yöntem olan nöronların ilaç yerine ışıkla uyarılması prensibine dayanan optogenetik manipülasyon yöntemi bile invaziv bir yöntem olması açısından kemogenetik manipülasyona göre

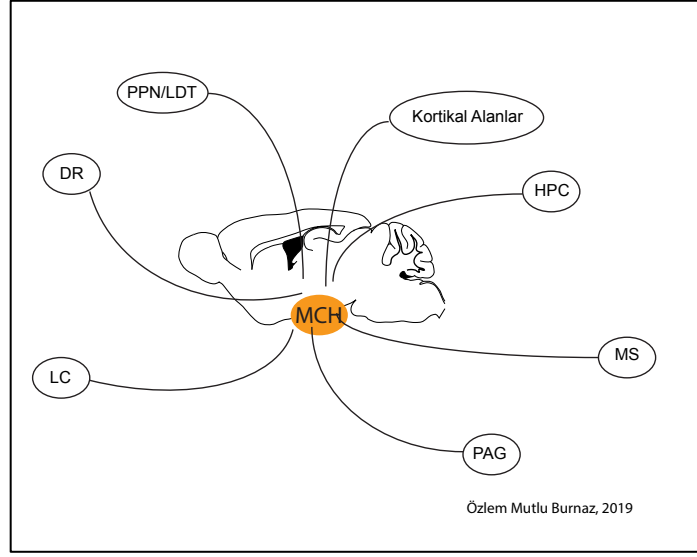
ciddi bir dezavantaja sahiptir. Sonuç olarak kemogenetik manipülasyon; genetik hedefleme, kolay uygulanabilirlik, düşük maliyet, davranış testi sırasında invaziv olmayan yöntemlerle ikincil ajanın verilebilmesi, zamansal kontrol sağlama gibi özellikleriyle öne çıkan etkili bir yöntemdir (77). Kemogenetik manipülasyonda karşılaşılabilecek en büyük sorun bölgedeki tüm hücrelerin hedeflenememesi olasılığıdır. Bu, özellikle inhibisyon yapmak istenen durumlarda soruna yol açabilmektedir. Enfekte olmayan nöronların işlev için yeterli olup olmayacağını kesin olarak belirlemek mümkün değildir.

Sahip olduğu avantajlardan dolayı tercih ettiğimiz son yılların en gelişkin biyoteknolojik tekniklerinden biri olan kemogenetik manipülasyon yöntemi DREADD'in yanı sıra yukarıda bahsedilen beyindeki bellek ile ilişkili süreçlerinin bellek türüne göre değişiklik göstermesinden ötürü araştırmanın kapsamı tek bir bellek türüne özel beyin bölgeleriyle sınırlanmıştır. Yeni nesne tanıma testi sayesinde emosyonel süreçlerin etkisi minimize edilerek özel olarak hippokampuse bağlı bilgi kodlanmasının altında yatan süreçler araştırılmıştır. Bu süreçlerdeki beyin ağlanmalarını deşifre etmek için lateral hipotalamus ve zona inserta bölgelerinde yayılmış halde bulunan MCH nöronları geçici olarak inhibe edilerek davranışa yansıyan sonuç gözlemlenmiştir. MCH nöronlarının bellek ağlanması üzerinde önemli bir yeri olabileceğini bize düşündüren söz konusu nöron grubunun REM uyku sürecindeki aktif rolü olmuştur.

MCH hücreleri orexin hücreleriyle birlikte hipotalamusta uyku/ uyanıklık döngüsünü belirleyen merkezlerden biridir. MCH hücreleri aktive edildiğinde REM uyku süresi ve sayısı artar (10). Bellek konsolidasyonunun NREM ve REM evrelerinin peş peşe gerçekleşmesiyle mümkün olacağını öne süren sekansal hipoteze göre REM sırasında LTP'nin gerçekleştiği düşünülmektedir (27). Bu durumda REM'e geçişi sağlayan nöronlar bellek konsolidasyonunu sağlayan ağlanmada kilit bir göreve sahip olabilir. Bugüne kadar yapılmış çalışmalarda REM'e geçiş aşamasında beyin sapında bulunan retiküler sistemin elemanları olan LDT ve PPN'in kolinerjik aktivitesinin önemli olduğu gösterilmiştir. MCH nöronları bu bölgelere yoğun projeksiyonlar yapar (59). Bu projeksiyonlar vasıtasıyla MCH nöronları REM uykusunu tetikliyor ve bellek

konsolidasyonuna olası bir olumlu etki de bu şekilde gerçekleşiyor olabilir. MCH ve beyin sapı nöronlarının eş zamanlı manipüle edilebildiği bir sistemde bu hipotez test edilebilir. Alternatif olarak MCH manipülasyonu sonrasında c-fos veya diğer erken yanıt veren genlerle yapılacak immunohistokimya analizi de bu konuda bilgi verici olabilir.

MCH hücrelerinin retiküler sistemden başka tüm kortikal alanlara, hipokampuse ve bellek ile ilişkili pek çok bölgeye yaptığı bağlantılar bilinmektedir. Dahası MCH peptidinin dışarıdan verildiğinde hipokampuse bağlı bellek olaylarında, pasif kaçınma testinde ve hipokampüsten gelen uyarıcı sinyallerin artmasında olumlu bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Amigdala veya hipokampüse verilen MCH peptidinin de korku şartlanmasında artışa sebep olduğu bilinmektedir (68)(78)(63). Bu veriler MCH nöron grubunun, etkisini doğrudan hipokampus üzerinden gösteriyor olabileceğini de düşündürmektedir. Hipokampus haricindeki projeksiyonları incelendiğinde ise uyku ritmini düzenleyen nörotransmitter düzeyindeki değişiklikleri modüle ediyor olabileceğini destekleyen bulgular dikkat çekmektedir. MCH nöronları hipokampüsten başka medial septum, periakvaduktal gri, nukleus akkumbens, lokus serolus (LC), raphe nukleus (RN) gibi noromodülatör özelliği yüksek alanlara da uzanır. Özellikle lokus serolus kaynaklı dopaminin bellek üzerindeki etkisi bilinmektedir (37,63,67,78). Lokus serolusa projeksiyon yapan MCH nöronlarının dopamin salınımını kontrol ediyor olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca yine uyku ritmi için büyük önem taşıyan asetilkolininin hipokampuse salınımının MCH nöronlarıyla ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (63). MCH nöronlarının beyin sapına yaptığı bu projeksiyonlar kendi arasında karşılaştırıldığında ağırlıklı bir kısmın dopaminerjik (LC) veya serotonerjik (RN) alanlardan ziyade kolinerjik alanlara doğru olduğu ölçülmüştür (59). Bu da REM sırasında artan kolinerjik aktivitenin MCH'ten kaynaklanıyor olabileceğini akla getirir. Sonuç olarak direkt olarak hipokampüse etki etme olasılığı ile yukarıda bahsi geçen farklı ağlar üzerinden modulatuar etki etme olasılığı eşit derecede mümkündür. Kolinerjik etkinin beyin sapından kaynaklı olduğu da kesin olarak iddia edilemez; çünkü MCH nöronları MS bölgesi yakınlarına da projeksiyon yapar ve MS nöronlarına uygulanan optogenetik inhibisyon bellek üzerinde olumsuz bir etki yaratmıştır (58).



Şekil 7.1. Melanin konsantre edici hormon nöronları projeksiyonları. MCH nöronlarının projeksiyon yaptığı bölgeler arasında kortikal alanlar, hippocampus (HPC), dorsal raphe (DR), medial septum (MS), lokus serolus (LC), periaqueductal gri (PAG), pedinkulopontin çekirdek (PPN) ve laterodorsal çekirdek (LDT) bulunur.

MCH nöronlarının REM uykusuyla ilişkisi ve yaptığı projeksiyonlar göz önünde bulundurulduğunda bellek için önemli bir devre elemanı olma potansiyeli görülmektedir. Bu hipotezi test edebilmek için MCH nöronları geçici olarak inhibe edilmiş hayvanlar ile inhibisyon işlemi uygulanmamış hayvanların yeni nesne tanıma testindeki bellek performanslarını karşılaştırılmıştır.

Yeni nesne tanıma testinin birinci gününde öğrenme gerçekleşikten bir saat sonra ikincil kemogenetik ajanı olan klozapin intraperitoneal yolla enjekte edilmiştir; çünkü bellek konsolidasyonu için öğrenme gerçekleşikten sonraki birinci ve dördüncü saatler arasındaki zamanın çok önemli olduğu bilinmektedir (72). Klozapinin de enjeksiyon gerçekleşikten sonra en geç kırk beş dakika sonra aktifleştiğini göz önünde bulundurarak enjeksiyon bu sırada gerçekleştirilmiştir (79). Amaç, öğrenme sonrasında gerçekleşmesi muhtemel REM uykusu sırasında aktifleşen MCH nöronlarının varsa bellek konsolidasyonu üzerindeki etkilerini gözlemlemektir. Enjeksiyonu takiben hayvanlar hızlıca dinlenme odasına götürüldü. Ertesi gün test aşamasında hayvanların bellek performansları kaydedilmiştir. Deney veya skorum sırasında uygulayıcı, deney gruplarının bilgisine sahip değildir (blind test). Bir bazal

ölçüm elde edebilmek için klozapin (KZ) uygulamaları öncesinde aynı süreç serum fizyolojik (SF) ile de uygulanmıştır. SF ve KZ uygulamaları sırasında farklı nesne setleri kullanılmıştır. Bu farklılığın sonuçlarımıza etki etmemesi için deney hayvanlarımızın yarısı nesne setini Şekil 5.5'teki sırayla görürken diğer yarısı tam tersi sırayla görmüştür.

Bellek performansı ölçülürken burun dokunuşu ve araştırma süresi parametrelerinden yararlanılmıştır. Hayvan davranışı manuel olarak videoların uygulayıcı tarafından izlenmesi vasıtasıyla skorlanmıştır. Burada amaç yapay zekanın hayvan davranışını ayırt etmede zorlandığı noktaları gözden kaçırmamak olmuştur. Burun dokunuşu parametresinde hayvanların fiziksel olarak nesnelere burunlarıyla dokunma sayıları tutulurken araştırma süresi için inceleme davranışının süresi kronometreyle kaydedilmiştir. İstatistiksel analiz kısmında anlatıldığı gibi yeni nesne ile ilgili skorların eski nesne ile ilgili skordan çıkarılması ile bellek performansı skoru elde edilmiştir.

Burun dokunuşu skorlarına bakıldığında deney grubu ve kontrol grubunun arasında SF ve KZ koşullarında anlamlı bir bellek performansı farkı görülmemiştir (Şekil 6.2a,b). Deney ve kontrol grupları kendi içinde eşleşmeli Student's t test ile karşılaştırıldığında da aynı şekilde bir fark görülmemiştir (6.2c-e). Analiz süresince her burun dokunuşu nesneyle ilgilenmekten kaynaklanmadığı, bu sebeple araştırma süresi parametresinin nesnelere olan ilgiyi daha iyi yansıttığı gözlemlenmiştir. Bazı durumlarda fareler nesnelere üstünden zıplamak için, anksiyete davranışı veya sadece yoluna çıktığı için nesnelere dokunma davranışı gösterdiği kaydedilmiştir.

Araştırma süresi skorları da tıpkı burun dokunuşu skorlarında olduğu gibi SF ve KZ koşullarında deney ve kontrol grupları arasında karşılaştırılmıştır. Şekil 6.3a,b'de eşleşmesiz Student's t test sonuçları, Şekil 6.3c,ç'de eşleşmeli Student's t test sonuçları gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre yine deney ve kontrol gruplarında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Şekil 6.3c'de görülen inhibisyon grubunun kendi içinde SF ve KZ koşullarındaki bellek performansları karşılaştırıldığında p değerinin 0,06 çıkmasına ve her bir değer için iki koşulda gösterdiği değişikliğe bakıldığında (Şekil

6.3d) MCH inhibisyonunun istatistiksel olarak anlamlı bir bellek performansı değişikliğine yol açmadığı görülmektedir; fakat enfekte edilmiş hücre oranının düşük olması göz önünde bulundurulduğunda MCH nöron aktivitesi durdurulduğunda bellek performansının bozulmaya doğru bir eğilim içinde olabileceği düşünülmektedir.

Bütün bunların yanında deney ve kontrol gruplarının beraber deneye alınmış olmasından dolayı ultrasonik vokalizasyon, koku gibi ipuçlarının gruplar arasında paylaşılmış olabileceği de unutulmamalıdır.

Davranış performanslarını incelediğimiz farelerin beyin dokuları immunohistokimya yöntemiyle anti-MCH antikoruyla boyandıklarında AAV2-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry virüsüyle enfekte edilen nöronların MCH sentezi gerçekleştirdiği (Şekil 6.4); ancak AAV2-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry virüsüyle enfekte edilen nöronların MCH boyamasıyla örtüşmediği (Şekil 6.5) görülmüştür. MCH nöronlarının enfekte olduğu doğrulanmamış olan, AAV2-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry virüsü ile enfekte olan üç fare davranış analizinden çıkarılmıştır. Bu farelerin bilgileri Tablo 5.6'da mevcuttur.

Yukarıda da bahsedildiği gibi inhibisyon çalışmalarında enfekte olan nöron sayısı önemlidir. Yapılan manipülasyon hedeflenen tüm nöronlara ulaşamayabilir. Hedeflenen nöronların hangi oranda etkilendiğini tespit edebilmek için anti-MCH antikor kullanılarak immunohistokimya çalışması yapılmıştır. İmmunohistokimya sonucu MCH nöronlarının yarısından fazlasının enfekte olmadığını göstermektedir (Tablo 6.1). Virüsten gelen sinyalin immunohistokimya sonucu elde edilen sinyale göre daha az oluşu da buna etkindir; fakat enfeksiyondan kurtulan nöronların doğal süreçleri yerine getirmede yeterli gelmiş olabileceğini düşünmek gerekir. Ayrıca başka bellek türleriyle ilgili yapılan benzer çalışmalar göstermiştir ki bellek ağlanmaları fonksiyon açısından birbirinin yerine geçebilecek pek çok elemana sahiptir (76). Burada da MCH nöronlarının rolü başka bir grup nöron tarafından devralınmış olabilir. Bu tür karmaşık süreçlerde işlemler tek bir nöron grubunun kaybedilmesiyle bozulmayabilir. Bu sebeple küçük bir performans azalması bile dikkate değerdir. Dolayısıyla vardığımız sonucun MCH hücrelerinin bellek üzerinde etkisi olmadığı

gibi bir anlama geldiğini söylemek yanlış olur. Ayrıca literatürde MCH nöronlarının bellek üzerinde olumlu etkisinin olduğunu destekleyen bir çalışma da mevcuttur. MCH/ataxin3 (ataxin3 bir pro-apoptotik toksindir) transgenik farelerinin kullanıldığı bu çalışmada MCH nöronları, fareler yetişkinliğe eriştiğinde ölüme sürüklenmiş ve bu durumun bellek performansı üzerindeki etkisi davranış deneyleri ve plastisite analizleri ile tespit edilmiştir. Deneylerin sonuçları göstermiştir ki MCH reseptörleri silinen fareler kontrol grubuna göre T labirentinde öğrendikleri besin lokasyonunu ararken daha çok tereddüt etme davranışı göstermişlerdir (68). Hücreleri tamamen silmek lezyon çalışmalarının sahip olduğu dezavantajlara benzer olumsuz özelliğe sahip olsa da MCH nöronu eksikliğinde bellek performansına böyle bir olumsuz etki görmek ilginçtir.

Çalışmamızda enfekte olmuş hücre sayısının yeterli gelmemiş olabileceği göz önünde bulundurularak, MCH nöronlarının konsolidasyon üzerindeki etkisini daha iyi anlayabilmek için gelecek çalışmalarda yeni nesne tanıma testi Pmch-Cre farelerin hM4D raporlayıcı farelerle çaprazlanması ile elde edilecek yavrularla tekrar edilebilir. hM4D raporlayıcı fareler tüm nöronlarında hM4D reseptörlerinin ifade edildiği farelerdir. Pmch-Cre farelerle çaprazlandıklarında yavrular, tüm nöron gelişimi süresince MCH geni ifade edilen nöronlarında hM4D genini de ifade eder. Böylece stereotaktik enjeksiyona gerek kalmaksızın MCH hücreleri hedeflenebilir hale getirilir. Bu yöntemin dezavantajları yetişkinlik düzeyinde MCH geni yoğun olarak ifade edilmese bile gelişimin bir aşamasında bu geni ifade etmiş olan hücrelerde de hM4D reseptörlerinin bulunacak olması ve stereotaktik enjeksiyonla sağlanan lokasyon kontrolünden yoksun olmasıdır. Yine de inhibisyon için uygun bir seçenektir; çünkü MCH geni beyinde çok yaygın olarak ifade edilmez. En yoğun bölgeler lateral hipotalamus ve zona inserta bölgeleridir (80).

Ayrıca fare gruplarının aralarında ultrasonik vokalizasyon, koku ve benzeri ipuçlarını paylaşmış olması ihtimalini ortadan kaldırmak adına farklı gruplar için farklı zamanlarda yapılan testlerle ek bir ölçüm yapılabileceği düşünülmektedir.

Bu tez çalışması ile ilk defa MCH nöronlarının kemogenetik inhibisyonunun bellek konsolidasyonuna etkisi incelenmiş olup, REM uykusunun konsolidasyona bilinen etkisinin mekanizması araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre geçici olarak MCH nöronlarının Tablo 6.1’de verilen oranlarda susturulması yeni nesne tanıma testi ile ölçülen bellek performansında azalma eğilimine sebep olmuş; ancak istatistiksel açıdan anlamlı bir fark yaratmamıştır. AAV2-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry stereotaktik enfeksiyonu uygulanmış farelerde klozapin koşulunda enfekte olmuş hücre sayısının bellek skorlarıyla korelasyon göstermesi ise dikkate değerdir. MCH nöronlarının REM uykusundaki aktif rolü ve REM uykusunun bellek süreçleri üzerindeki etkisi göz önünde bulundurulduğunda farklı yöntemlerle söz konusu beyin ağının araştırılmaya devam edilmesinde fayda vardır.

8. EKLER

Tablo 8.1. AAV2-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry ve AAV2-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry ile enfekte edilmiş tüm farelerin araştırma süreleri skorlarının Student's ttest ile karşılaştırılması

Tüm fareler		
P değerleri	FD (serum fiz.)	FD (klozapin)
inhibisyon/kontrol	0,170145717	0,457639814
	FD (kontrol)	FD (inhibisyon)
klozapin/serum fiz.	0,033490074	0,673232379

Tablo 8.2. AAV2-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry ile enfekte edilmiş tüm farelerin araştırma süreleri skorlarının Student's ttest ile karşılaştırılması

Çıkarılan fareler		
P değerleri	FD (serum fiz.)	FD (klozapin)
inhibisyon/kontrol	0,08511956	0,177636517
	FD (kontrol)	FD (inhibisyon)
klozapin/serum fiz.	0,414451386	0,673232379

9. KAYNAKLAR

1. Frankland PW, Bontempi B. The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci* (Internet). 2005 Feb 1 (cited 2018 May 1);6(2):119–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15685217>
2. Squire LR, Genzel L, Wixted JT, Morris RG. Memory consolidation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* (Internet). 2015;7(8):a021766. Available from: <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a021766><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26238360><http://cshperspectives.cshlp.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=26238360>
3. Eichenbaum H. Still searching for the engram. *Learn Behav* (Internet). 2016 Sep 4 (cited 2017 Jun 19);44(3):209–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26944423>
4. Diekelmann S, Born J. The memory function of sleep. *Nat Rev Neurosci* (Internet). 2010;11(2):114–26. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20046194
5. Fenn KM, Nusbaum HC, Margoliash D. Consolidation during sleep of perceptual learning of spoken language. *Nature* (Internet). 2003;425(6958):614–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14534586>
6. Stickgold R. Sleep-dependent memory consolidation. *Nature*. 2005;437(7063):1272–8.
7. Born J, Rasch B, Gais S. Sleep to remember. *Neuroscientist* (Internet). 2006;12:410–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16957003>
8. Rasch B, Born J. Maintaining memories by reactivation. *Curr Opin Neurobiol*. 2007;17(6):698–703.
9. Jones BE, Hassani OK. The Role of Hcrt/Orx and MCH Neurons in Sleep-Wake State Regulation. *Sleep* (Internet). 2013 Dec 1 (cited 2017 Apr 7);36(12):1769–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24293746>

10. Vetrivelan R, Kong D, Ferrari LL, Arrigoni E, Madara JC, Bandaru SS, et al. Melanin-concentrating hormone neurons specifically promote rapid eye movement sleep in mice. *Neuroscience* (Internet). 2016 Nov 12 (cited 2017 Apr 7);336:102–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27595887>
11. Dudai Y. The Neurobiology of Consolidations, Or, How Stable is the Engram? *Annu Rev Psychol* (Internet). 2004;55(1):51–86. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.psych.55.090902.142050>
12. Moscovitch M, Nadel L, Winocur G, Gilboa A, Rosenbaum RS. The cognitive neuroscience of remote episodic, semantic and spatial memory. *Curr Opin Neurobiol* (Internet). 2006 Apr (cited 2017 Apr 18);16(2):179–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16564688>
13. Squire LR, Clark RE, Knowlton BJ. Retrograde amnesia. *Hippocampus*. 2001;11(1):50–5.
14. Maviel T, Durkin TP, Menzaghi F, Bontempi B. Sites of Neocortical Reorganization Critical for Remote Spatial Memory. *Science* (80-) (Internet). 2004 (cited 2017 Apr 18);305(5680). Available from: <http://science.sciencemag.org/content/305/5680/96>
15. Bontempi B, Laurent-Demir C, Destrade C, Jaffard R. Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature* (Internet). 1999 Aug 12 (cited 2017 Apr 18);400(6745):671–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10458162>
16. Anagnostaras SG, Maren S, Fanselow MS. Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination. *J Neurosci* (Internet). 1999 Feb 1 (cited 2017 Apr 18);19(3):1106–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9920672>
17. Zola-Morgan SM, Squire LR. The primate hippocampal formation: evidence for a time-limited role in memory storage. *Science* (Internet). 1990 Oct 12 (cited 2017 Apr 18);250(4978):288–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2218534>
18. Moscovitch M, Rosenbaum RS, Gilboa A, Addis DR, Westmacott R, Grady

- C, et al. Functional neuroanatomy of remote episodic, semantic and spatial memory: a unified account based on multiple trace theory. *J Anat* (Internet). 2005 Jul 4 (cited 2019 Jul 18);207(1):35–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16011544>
19. Winocur G, Moscovitch M, Sekeres M. Memory consolidation or transformation: context manipulation and hippocampal representations of memory. *Nat Neurosci* (Internet). 2007 May 1 (cited 2017 Apr 18);10(5):555–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17396121>
 20. Sutherland RJ, O'Brien J, Lehmann H. Absence of systems consolidation of fear memories after dorsal, ventral, or complete hippocampal damage. *Hippocampus* (Internet). 2008 Jul (cited 2017 Apr 18);18(7):710–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18446823>
 21. Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE. Reversible hippocampal lesions disrupt water maze performance during both recent and remote memory tests. *Learn Mem* (Internet). 2006 Mar 1 (cited 2017 Apr 18);13(2):187–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16585794>
 22. Tonegawa S, Morrissey MD, Kitamura T. The role of engram cells in the systems consolidation of memory. *Nat Rev Neurosci* (Internet). 2018;19(8):485–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41583-018-0031-2>
 23. Squire LR. Nondeclarative Memory: Multiple Brain Systems Supporting Learning. *J Cogn Neurosci*. 1992;4(3):232–43.
 24. Baxter MG. “I’ve seen it all before” Explaining age-related impairments in object recognition. Theoretical comment on Burke et al. (2010). *Behav Neurosci*. 2010;124(5):706–9.
 25. Leger M, Quiedeville A, Bouet V, Haelewyn B, Boulouard M, Schumann-Bard P, et al. Object recognition test in mice. *Nat Protoc* (Internet). 2013;8(12):2531–7. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nprot.2013.155>
 26. Lamprecht R, LeDoux JE. Structural plasticity and memory. *Nat Rev Neurosci* (Internet). 2004;5(1):45–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14708003>

27. Almeida-Filho DG, Queiroz CM, Ribeiro S. Memory corticalization triggered by REM sleep: mechanisms of cellular and systems consolidation. *Cell Mol Life Sci* (Internet). 2018;(0123456789). Available from: <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2886-9>
28. Mayford, M. , Siegelbaum S. A. KE. Synapses and Memory Storage. 2016;1–18.
29. Nicoll RA. A Brief History of Long-Term Potentiation. *Neuron* (Internet). 2017;93(2):281–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.015>
30. Lømo T. The discovery of long-term potentiation. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2003;358(1432):617–20.
31. Bliss TVP, Collingridge GL, Morris RGM. Introduction. Long-term potentiation and structure of the issue. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* (Internet). 2003 Apr 29 (cited 2017 Jun 19);358(1432):607–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12740102>
32. Morris RGM, Anderson E, Lynch GS, Baudry M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* (Internet). 1986 Feb (cited 2019 Jul 19);319(6056):774–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2869411>
33. Silva A, Stevens C, Tonegawa S, Wang Y. Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* (80-) (Internet). 1992 Jul 10 (cited 2019 Jul 19);257(5067):201–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1378648>
34. Genzel L, Rossato JI, Jacobse J, Grieves RM, Spooner PA, Battaglia FP, et al. The Yin and Yang of Memory Consolidation: Hippocampal and Neocortical. *PLoS Biol*. 2017;
35. Tanimizu T, Kono K, Kida S. Brain networks activated to form object recognition memory. *Brain Res Bull* (Internet). 2017 Jun 3 (cited 2017 Jun 19); Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28587862>
36. Josselyn SA, Köhler S, Frankland PW. Finding the engram. Vol. 16, *Nature Reviews Neuroscience*. 2015.

37. Takeuchi T, Duszkiwicz AJ, Sonneborn A, Spooner PA, Yamasaki M, Watanabe M, et al. Locus coeruleus and dopaminergic consolidation of everyday memory. *Nature* (Internet). 2016 Sep 7 (cited 2017 Mar 22);537(7620):357–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27602521>
38. Mednick SC, Nakayama K, Cantero JL, Atienza M, Levin AA, Pathak N, et al. The restorative effect of naps on perceptual deterioration. *Nat Neurosci*. 2002;5(7):677–81.
39. Stickgold R, James L, Hobson JA. Visual discrimination learning requires sleep after training. *Nat Neurosci*. 2000;3(12):1237–8.
40. Maheshwari G, Shaukat F. Impact of Poor Sleep Quality on the Academic Performance of Medical Students. *Cureus* (Internet). 2019;11(4):3–8. Available from: <https://www.cureus.com/articles/19016-impact-of-poor-sleep-quality-on-the-academic-performance-of-medical-students>
41. Marshall L, Born J. The contribution of sleep to hippocampus-dependent memory consolidation. *Trends Cogn Sci* (Internet). 2007 Oct (cited 2017 Apr 19);11(10):442–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17905642>
42. Gais S, Born J. Low acetylcholine during slow-wave sleep is critical for declarative memory consolidation. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101(7):2140–4.
43. Wilson M a, McNaughton BL. Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. *Science* (80-). 1993;5(14):14–7.
44. Peigneux P, Perrin F, Reggers J, Phillips C, Degueldre C, Fiore G Del, et al. Are spatial memories strengthened in the human hippocampus during slow wave sleep? *Neuron* (Internet). 2004;44(3):535–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15504332>
45. Huber R, Ghilardi MF, Massimini M, Tononi G. Local sleep and learning. 2004;430(July):4–7.
46. Trunk BM, Total CT. Coordinated Reactivation of Distributed Memory Traces in Primate Neocortex. *Science* (80-). 2002;297(September):2070–3.
47. Dave AS. Song Replay During Sleep and Computational Rules for Sensorimotor Vocal Learning. *Science* (80-). 2010;812(2000).

48. Girardeau G, Benchenane K, Wiener SI, Buzsáki G, Zugaro MB. Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory. *Nat Neurosci* (Internet). 2009;12(10):1222–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nn.2384>
49. Ego-Stengel V, Wilson MA. Disruption of ripple-associated hippocampal activity during rest impairs spatial learning in the rat. *Hippocampus*. 2010;20(1):1–10.
50. Gais S, Mölle M, Helms K, Born J. Learning-dependent increases in sleep spindle density. *J Neurosci* (Internet). 2002;22(15):6830–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12151563>
51. Blaskovich B, Szöllösi Á, Gombos F, Racsomány M, Simor P. The Benefit of Directed Forgetting Persists After a Daytime Nap: The Role of Spindles and Rapid Eye Movement Sleep in the Consolidation of Relevant Memories. *Sleep* (Internet). 2017 Mar 1 (cited 2017 Apr 7);40(3). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28364418>
52. Solomonova E, Stenstrom P, Schon E, Duquette A, Dubé S, O'Reilly C, et al. Sleep-dependent consolidation of face recognition and its relationship to REM sleep duration, REM density and Stage 2 sleep spindles. *J Sleep Res* (Internet). 2017 Mar 31 (cited 2017 Apr 7); Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28370532>
53. Nishida M, Pearsall J, Buckner RL, Walker MP. REM Sleep, Prefrontal Theta, and the Consolidation of Human Emotional Memory. *Cereb Cortex* (Internet). 2009 May 1 (cited 2017 Apr 19);19(5):1158–66. Available from: <https://academic.oup.com/cercor/article-lookup/doi/10.1093/cercor/bhn155>
54. Smith C. Sleep states and memory processes. *Behav Brain Res* (Internet). (cited 2017 Apr 19);69(1–2):137–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7546305>
55. Giuditta A, Ambrosini M V, Montagnese P, Mandile P, Cotugno M, Grassi Zucconi G, et al. The sequential hypothesis of the function of sleep. *Behav Brain Res* (Internet). 1995 (cited 2017 Apr 19);69(1–2):157–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7546307>
56. Ribeiro S, Mello C V, Velho T, Gardner TJ, Jarvis ED, Pavlides C. Induction

- of hippocampal long-term potentiation during waking leads to increased extrahippocampal zif-268 expression during ensuing rapid-eye-movement sleep. *J Neurosci* (Internet). 2002 Dec 15 (cited 2019 Jul 23);22(24):10914–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12486186>
57. Brain gene expression during REM sleep depends on prior waking experience. - PubMed - NCBI (Internet). (cited 2019 Jul 23). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=brain+gene+expression+during+rem+sleep+depends+on+prior+waking+experience>
58. Boyce R, Williams S, Adamantidis A. REM sleep and memory. *Curr Opin Neurobiol* (Internet). 2017;44:167–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2017.05.001>
59. Yoon YS, Lee HS. Projections from melanin-concentrating hormone (MCH) neurons to the dorsal raphe or the nuclear core of the locus coeruleus in the rat. *Brain Res* (Internet). 2013;1490:72–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2012.08.022>
60. Boyce R, Glasgow SD, Williams S, Adamantidis A. Causal evidence for the role of REM sleep theta rhythm in contextual memory consolidation. *Science* (80-). 2016;352(6287):812.
61. Pase MP, Himali JJ, Grima NA, Beiser AS, Satizabal CL, Aparicio HJ, et al. Sleep architecture and the risk of incident dementia in the community. *Neurology* (Internet). 2017;10.1212/WNL.0000000000004373. Available from: <http://www.neurology.org/lookup/doi/10.1212/WNL.0000000000004373>
62. Maisson DJ-N, Gemzik ZM, Griffin AL. Optogenetic suppression of the nucleus reuniens selectively impairs encoding during spatial working memory. *Neurobiol Learn Mem* (Internet). 2018 Nov 22 (cited 2018 Aug 1);155:78–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29940254>
63. Lu Z, Fukuda S, Minakawa Y, Yasuda A, Sakamoto H, Sawamura S, et al. Melanin concentrating hormone induces hippocampal acetylcholine release via the medial septum in rats. *Peptides* (Internet). 2013 Jun (cited 2017 Apr 7);44:32–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23531605>
64. Romine M. Genetic deletion of Melanin-Concentrating Hormone (MCH)

- neurons impairs hippocampal short-term synaptic plasticity and hippocampal-dependent forms of short-term memory. 2017;
65. Adamantidis AR, Zhang F, Aravanis AM, Deisseroth K, Lecea L De, de Lecea L. Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature* (Internet). 2007;450(7168):420–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17943086>
 66. Sasaki K, Suzuki M, Mieda M, Tsujino N, Roth B, Sakurai T. Pharmacogenetic modulation of orexin neurons alters sleep/wakefulness states in mice. *PLoS One*. 2011;6(5).
 67. Lima FFB, Sita L V., Oliveira AR, Costa HC, da Silva JM, Mortara RA, et al. Hypothalamic melanin-concentrating hormone projections to the septo-hippocampal complex in the rat. *J Chem Neuroanat* (Internet). 2012 Jan (cited 2018 Aug 1);47:1–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23123956>
 68. Le Barillier L, Léger L, Luppi P-H, Fort P, Malleret G, Salin P-A. Genetic deletion of melanin-concentrating hormone neurons impairs hippocampal short-term synaptic plasticity and hippocampal-dependent forms of short-term memory. *Hippocampus* (Internet). 2015 Nov (cited 2017 Apr 7);25(11):1361–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25808129>
 69. Kong D, Vong L, Parton LE, Ye C, Tong Q, Hu X, et al. Glucose Stimulation of Hypothalamic MCH Neurons Involves KATP Channels, Is Modulated by UCP2, and Regulates Peripheral Glucose Homeostasis. *Cell Metab* (Internet). 2010 Nov 3 (cited 2019 Feb 11);12(5):545–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21035764>
 70. Armbruster BN, Li X, Pausch MH, Herlitze S, Roth BL. Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* (Internet). 2007 Mar 20 (cited 2014 Oct 28);104(12):5163–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1829280&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 71. Huang ZJ, Zeng H. Genetic approaches to neural circuits in the mouse. *Annu Rev Neurosci* (Internet). 2013 Jul 8 (cited 2015 Jul 17);36:183–215. Available

from: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-neuro-062012-170307>

72. Prince TM, Wimmer M, Choi J, Havekes R, Aton S, Abel T. Sleep deprivation during a specific 3-hour time window post-training impairs hippocampal synaptic plasticity and memory. *Neurobiol Learn Mem* (Internet). 2014;109:122–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2013.11.021>
73. Gomez JL, Bonaventura J, Lesniak W, Mathews WB, Sysa-Shah P, Rodriguez LA, et al. Chemogenetics revealed: DREADD occupancy and activation via converted clozapine. *Science* (Internet). 2017 Aug 4 (cited 2018 Jan 17);357(6350):503–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28774929>
74. Franklin KBJ, Paxinos G. Paxinos and Franklin's The mouse brain in stereotaxic coordinates. 2012.
75. Tayler KK, Wiltgen BJ. New methods for understanding systems consolidation. *Learn Mem* (Internet). 2013;20(10):553–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24042851>
76. Wheeler AL, Teixeira CM, Wang AH, Xiong X, Kovacevic N, Lerch JP, et al. Identification of a Functional Connectome for Long-Term Fear Memory in Mice. *PLoS Comput Biol*. 2013;9(1).
77. Sternson SM, Roth BL. Chemogenetic Tools to Interrogate Brain Functions. 2014;
78. Devera A, Pascovich C, Lagos P, Falconi A, Sampogna S, Chase MH, et al. Melanin-concentrating hormone (MCH) modulates the activity of dorsal raphe neurons. *Brain Res* (Internet). 2015 Feb 19 (cited 2017 Apr 7);1598:114–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25541366>
79. Smith KS, Bucci DJ, Luikart BW, Mahler S V. DREADDs: Use and Application in Behavioral Neuroscience. *Behav Neurosci* (Internet). 2016 Apr (cited 2019 Jun 11);130(2):137. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26913540>
80. Croizier S, Franchi-Bernard G, Colard C, Poncet F, La Roche A, Risold P-Y. A comparative analysis shows morphofunctional differences between the rat

and mouse melanin-concentrating hormone systems. PLoS One (Internet).
2010 Nov 17 (cited 2017 Nov 17);5(11):e15471. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21103352>



10. ETİK KURUL ONAYI



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

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.35949
Konu : Etik Kurulu Kararı

09/10/2017

Sayın Prof. Dr. Lütfü HANOĞLU

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz "Belek Konsolidasyonunun Oluşum Mekanizmaları" isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(İMÜ-HADYEK) Başkanı

EK:
-Karar Formu (1 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 09.10.2017 tarihinde e-İmzalanmıştır. Evragnızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 2382C1E4XA kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi

Kavacık Mah. Ekinçiler Cad.No:19 Kavacık Kavşağı 34810
Beykoz/İSTANBUL

Tel: 444 85 44

İnternet: www.medipol.edu.tr

Ayrıntılı Bilgi İçin : bilgi@medipol.edu.tr



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

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
06/10/2017	62		Prof. Dr. Lütfü HANOĞLU

“Belek Konsolidasyonunun Oluşum Mekanizmaları” başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “Oybirliği” ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 24 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. Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Uzm.Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Fahriye ŞENBAHÇE	

11. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Özlem	Soyadı	Mutlu Burnaz
------------	-------	---------------	--------------

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	I.D. Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji Ve Genetik	2013
Lise	Aydın Süleyman Demirel Anadolu Lisesi	2007

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl – Yıl)

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

	Sayısal	Eşit ağırlık	Sözel
ALES Puanı			
YDS Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Microsoft Office Programları	Çok iyi

Sertifikalar

Ihsan Doğramacı Bilkent Üniversitesi	Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	2013
---	--	------

