



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**UZUN DÖNEM YAĞLI BESLENMENİN HİPOTALAMUSTAKİ
GLUTAMATERJİK NÖRONLAR ÜZERİNDEN DAVRANIŞSAL
SÜREÇLERE ETKİSİ**

HATİCE KÜBRA IŞILDAR ŞENTÜRK

SİNİRBİLİM ANABİLİMDALI

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi MUHAMMED İKBAL ALP

İstanbul – 2021

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()
Anabilim Dalı : Sinirbilim
Tez Sahibi : Hatice Kübra IŞILDAR
Tez Başlığı : Uzun Dönem Yağlı Beslenmenin Hipotalamustaki
Glutamaterjik Nöronlar Üzerinden Davranışsal Süreçlere
Etkisi
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kuzey Kampüsü
Sınav Tarihi : 05.01.2021

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

Danışman

Kurumu

İmza

Dr.Öğr.Üyesi Muhammed İkbāl ALP İstanbul Medipol Üniversitesi

Sınav Jüri Üyeleri

Dr.Öğr.Üyesi Taha KELEŞTEMUR İstanbul Medipol Üniversitesi

Prof.Dr. Ramazan BAL

Gaziantep Üniversitesi

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

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür V.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Hatice Kübra Işıldar Şentürk

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda sağladığı imkan ve destekler için Prof. Dr. Gürkan Öztürk'e ve İstanbul Medipol Üniversitesi REMER çalışanlarına,

Sinirbilime ilgi duymamı sağlayan, her daim sabırla öğreticiliğini sürdüren ve teşekkürden fazlasını borçlu olduğum danışmanım Dr. Öğr. Üye Muhammed İkbâl Alp'e

Bu çalışmanın her adımında emeği ve maddi manevi desteği olan Rumeysa Atayolu'na, destek ve yardımları için Pelin Dilsiz'e,

Her daim yanımda olan arkadaşlarım Betül Ceylan, Beste Pulat ve İrem Şerolar'a,

Bana olan inanç ve hiç bitmeyen destekleriyle en büyük dayanaklarım olan annem Şule, babam Veysel, kardeşlerim Ayşe ve Zeynep Berra Işıldar'a,

Bu çalışma sürecinde hayatımı birleştirdiğim, beni her an tüm kalbiyle destekleyen eşim Uğur Şentürk'e, teşekkürlerimi sunarım.

Hatice Kübra Işıldar Şentürk

İÇİNDEKİLER

Sayfa No.

TEZ ONAYI.....	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER ve TABLOLAR LİSTESİ.....	vi
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	6
4.1. Yeme Kontrolünde Merkezi Yolaklar.....	6
4.2. Yağlı Beslenme.....	9
4.3. Glutamat.....	12
4.4. Öğrenme ve Bellek.....	15
4.5. Kemogenetik Stimülasyon.....	19
5. METOT	23
5.1. Deney Hayvanları.....	23
5.2. Genotipleme ve DNA Eldesi	23
5.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	24
5.4. Agoroz Jel Elektroforezi Ve Görüntüleme.....	25
5.5. Aav Virüs Üretimi.....	25
5.6. İntrakranial Virüs Enjeksiyonu.....	26
5.7. Yüksek Yağlı Beslenme.....	27
5.8. Glutamat Nöron Aktivasyonu.....	27
5.9. Beslenme Takibi.....	28
5.10. Açık Alan Testi.....	28
5.11. Obje Tanıma Testi.....	28
5.12. Glukoz Tolerans Testi.....	30
5.13. Doku Fiksasyonu ve Kesit Alma.....	30
5.14. Mikroskopik Görüntüleme ve Analiz	30

6. BULGULAR.....	31
6.1. Genotipleme.....	31
6.2. Mikroskopik Analiz.....	31
6.3. Besin Tüketimi.....	32
6.4. Açık Alan Testi.....	33
6.5. Obje Tanıma Testi.....	34
6.6. Glikoz Tolerans Testi.....	37
7. TARTIŞMA.....	39
8. SONUÇ.....	46
9. KAYNAKLAR.....	47
10. ETİK KURUL ONAYI.....	62
11. ÖZGEÇMİŞ.....	63

ŞEKİL VE TABLolar LİSTESİ

Sayfa No.

Şekil 4.1.1. Hipotalamusun mediolateral bölümleri	7
Şekil 4.1.2. Medial hipotalamusun organizasyonu	7
Şekil 4.5.1. DREADD metodu ile kemogenetik manipölasyon	20
Şekil 4.5.2. Cre-Lox Sistemi	22
Tablo 5.1.1. Deney Hayvanları Dağılımı	23
Tablo 5.3.1. Kullanılan Primer Dizileri	24
Tablo 5.3.2. PZR Protokolü	24
Tablo 5.9.1. Besin Tüketim Kaydı İçin Uygulanan İntraperitoneal Enjeksiyonlar.....	28
Tablo 5.11.1. Obje Tanıma Testi İçin Uygulanan İntraperitoneal Enjeksiyonlar	29
Şekil 5.11.1. Obje Tanıma Testi Planı	29
Şekil 6.2.1 pAAV-EF1a-DIO-hM3D(Gq)-mCherry enjekte edilmiş Vglut2-cre farelerin medial hipotalamus bölgelerinde floresan görüntüleri	31
Şekil 6.3.1. SD ve YYD ile beslenen farelerde glutamat nöron aktivasyonunun 4 saatlik besin tüketimleri ortalamalarına etkisi	32
Şekil 6.4.1. SD ve YYD ile beslenen farelerde glutamat nöron aktivasyonunun açık alan testinde merkezde geçirilen süreye etkisi	33
Şekil 6.4.2. SD ve YYD ile beslenen farelerde glutamat nöron aktivasyonunun açık alan testinde toplam alınan mesafeye etkisi	34
Şekil 6.5.1. Hm3Dq-SD grubu; obje tanıma testinde sabit ve değişen bölgelerde geçirilen sürenin yüzde dağılımının iki gün arasında kıyası	35
Şekil 6.5.2. Hm3Dq-YYD grubu; obje tanıma testinde sabit ve değişen bölgelerde geçirilen sürenin yüzde dağılımının iki gün arasında kıyası	35
Şekil 6.5.3. Hm3Dq-YYD grubunda glutamat aktivasyonunun değişen bölgede geçirilen süreye etkisi	36
Şekil 6.5.4. Hm3Dq-SD grubunda glutamat aktivasyonunun değişen bölgede geçirilen süreye etkisi	37
Şekil 6.6.1. Hm3Dq-SD grubunda glutamat aktivasyonu durumunda glikoz tolerans testine bağlı kan şekeri değerleri	38
Şekil 6.6.2. Hm3Dq-YYD grubunda glutamat aktivasyonu durumunda glikoz tolerans testine bağlı kan şekeri değerleri	38

1- ÖZET

UZUN DÖNEM YAĞLI BESLENMENİN HİPOTALAMUSTAKİ GLUTAMATERJİK NÖRONLAR ÜZERİNDEN DAVRANIŞSAL SÜREÇLERE ETKİSİ

Aşırı yeme ve obezite gün geçtikçe büyüyen bir sağlık problemidir. Beslenmeyi etkileyen nöral mekanizmalar ile ilgili çalışmalar, bu sorunu önlemede kullanılacak tedavi yöntemleri için önemli yer edinmektedir. Hipotalamusun medial bölgesi beslenme davranışını düzenleyen hücre grupları içermektedir ve bu bölgede en yoğun bulunan nörotransmitter glutamattır. Çalışmada, medial hipotalamus bölgesindeki glutamaterjik hücrelerin kemogenetik aktivasyonunun beslenme ve davranışı nasıl etkilediği ile yüksek yağlı beslenmenin bu sürece etkisi araştırılmıştır. Medial hipotalamustaki glutamat hücrelerinin kemogenetik olarak aktive edilmesinin beslenmeyi baskılayıcı bir etkisi olduğu ortaya çıkmıştır. Uzun süreli yüksek yağlı beslenmenin bellekte olumsuz etkilere sebep olduğu, medial hipotalamustaki glutamat hücrelerinin uyarılmasının bu etkiyi tersine çevirmeyi sağladığı bulunmuştur. Açık alan testi bulguları medial hipotalamus glutamaterjik hücrelerinin lokomotor aktivite için önemli olduğunu ve yüksek yağlı beslenmenin bu aktivitede bozulmaya neden olduğunu göstermiştir. Yüksek yağlı beslenen farelerde medial hipotalamus glutamaterjik hücrelerin kemogenetik aktivasyonunun anksiyeteyi baskılayıcı bir etkiye sebep olduğu bulunmuştur. Bu hücrelerin aktivasyonu glukoz tolerans testinde anlamlı bir etkiye neden olmamıştır. Yapılan bu çalışma, medial hipotalamustaki glutamat hücrelerinin beslenme, kognitif fonksiyonlar, lokomotor aktivite ve anksiyete üzerinde etkileri olduğunu gösteren önemli sonuçlar sunmaktadır.

Anahtar sözcükler; beslenme, davranış, glutamat, kemogenetik, medial hipotalamus

2- ABSTRACT

THE EFFECT OF LONG-TERM HIGH FAT DIET ON GLUTAMATERGIC NEURONS IN HYPOTHALAMUS ON BEHAVIORAL PROCESSES

Overeating and obesity is a growing health problem. Studies on neural mechanisms that affect feeding have an important place for treatment methods to be used to prevent this problem. The medial region of the hypothalamus contains groups of cells that regulate feeding behavior and the most concentrated neurotransmitter in this region is glutamate. In this study, how the chemogenetic activation of glutamatergic cells in the medial hypothalamus region affects nutrition and behavior and the effect of high-fat diet on this process were investigated. It has been revealed that chemogenetic activation of glutamate cells in the medial hypothalamus has a suppressive effect on feeding. It has been found that a long-term high-fat diet causes adverse effects on memory, and stimulation of glutamate cells in the medial hypothalamus helps reverse this effect. Open field test findings showed that the glutamatergic cells of the medial hypothalamus are important for locomotor activity and a high-fat diet causes impairment in this activity. Chemogenetic activation of glutamatergic cells in the medial hypothalamus in mice fed high fat has been found to have an anxiety suppressive effect. Activation of these cells did not cause a significant effect on the glucose tolerance test. This study provides important results showing that glutamate cells in the medial hypothalamus have effects on nutrition, cognitive functions, locomotor activity and anxiety.

Key words; eating, behavior, glutamate, chemogenetic, medial hypothalamus

3- GİRİŞ VE AMAÇ

Enerji metabolizmasının düzenlenmesi tüm canlılar için hayati önem taşımaktadır. Alınan enerji ve harcanan enerji miktarının bir denge halinde olması ve metabolik ihtiyaçlara cevap vermesi canlılığın devamını sağlayan önemli faktörlerden biridir. Vücut ağırlığı birçok fizyolojik ve metabolik aktivite ile homeostatik olarak düzenlenmektedir. Vücut ağırlığındaki değişimler uzun ve kısa vadede alınan ve harcanan enerji arasındaki ilişkiyle doğrudan alakalıdır. Alınan enerji miktarı harcanan enerji miktarından fazla olduğunda obezite gelişir. Bilindiği üzere günümüzde obezite başlıca sağlık sorunlarından birini oluşturmaktadır. Hastaların yaşam kalitesini düşürmesinin yanı sıra kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, kanser gibi başka hastalıklara da sebep olmaktadır. Daha önceden de bilindiği üzere beyindeki bazı bölgeler yeme davranışının düzenlenmesinden sorumludur. Obeziteye neden olabilecek bozulmuş mekanizmaların ve buna bağlı fizyolojik olayların nasıl kontrol edildiğinin bulunması, bu hastalıkla mücadelede önemli rol oynamaktadır.

Obezitenin tüm risklerine rağmen, mekanizması ve altında yatan sebeplerin tam olarak anlaşılamamış olması, mevcut tedavi yöntemlerinin yetersiz kalmasına sebep olmaktadır. Tedavideki imkânsızlıklar yeni yolların bulunması ve metotların geliştirilmesine olan gereksinimi artırmaktadır. Bu noktada yemeyi düzenleyen mekanizmalar önemlidir ve bu mekanizmaların direkt olarak merkezi sinir sistemindeki sinyal yolları ve buradan salgılanan hormonlarla alakalı olduğu bilinmektedir (1). Hipotalamus ve arka beyindeki nöronlar ve nöronal devreler aktif olarak enerji durumundaki değişikliklere (açlık ve tokluk) cevap vererek beslenme davranışını düzenlerler (2). Hipotalamus arka beyinde talamusun altında bulunan ve çoğunlukla gri maddeden oluşan bölümdür. En temel görevi homeostazi düzenlemek olan bu bölge uzun ve kısa süreli enerji dengesi, glikoz konsantrasyonu, su ve elektrolit dengesi, vücut sıcaklığı, uyku/uyanıklık döngüsünü ve kan basıncı, üreme hormonlarının kontrolü gibi hayatın devamlılığı için gerekli olan otonom vital fonksiyonlardan sorumludur. Hipotalamus beynin bölgeleri ile merkezi sinir sistemi, endokrin ve diğer sistemler arasında bir köprü görevi görür. Hipotalamusun farklı

bölgelerinin farklı işlevlere sahip olduğu bilinmektedir. Örneğin lateral hipotalamus iştahı arttırmakta (3), medial hipotalamus iştahı baskılamaktadır (4). Medial hipotalamus, arkuat, ventromedial (VMH), dorsomedial (DMH), anterobasal ve paraventriküler çekirdekleri içeren tuberal hipotalamusu kapsamaktadır. Hipotalamustaki GABAerjik ve glutamaterjik nöronların enerji dengesinin sürdürülmesi üzerine büyük katkısı olduğu gösterilmiştir (5). Özellikle medial hipotalamusta farklı çekirdeklerde farklı nöron gruplarının varlığı bilinmekle birlikte, en yaygın bulunan internöronlar GABA ve glutamattır (6). GABA ve glutamatin aferent girdileri entegre ederek değişen koşullara yanıtı şekillendirdiği bilinmektedir. Dominant hipotalamik transporter olan VGLUT2, VMH'ta güçlü bir şekilde eksprese edilmektedir. Bu denli fazla ifade edilen VGLUTların birden fazla mekanizmada rol oynadığı düşünülmektedir. VMH; besin alımı, kan şekerinin ayarlanması ve enerjinin düzenlenmesinden sorumlu bir bölgedir. İlk hücre-spesifik Cre faresinde silinmiş VGLUT2 fonksiyonu üzerine çalışma 2007'de Tong ve ark. tarafından yayınlanmış ve VMH teki SF1 nöronları tarafından glutamat salınımının, hipoglisemiye önlemek için işlev gören sistemin önemli bir bileşeni olduğu gösterilmiştir (7). Beslenme regülasyonunda görevli AgRP ve POMC hücrelerini içeren arkuat çekirdek de glutamaterjik hücreler içermektedir ve buradaki VGLUT2 nöronlarının anoreksijenik bir etkiye sahip olduğu daha önce gösterilmiştir (8). Birçok POMC ifade eden nöronda aynı zamanda glutamaterjik ve GABAerjik belirteçlerin de olduğu bilinmektedir. Hipotalamusta, özellikle medial çekirdeklerdeki glutamaterjik hücrelerin enerji dengesine etkisi bilinmekle birlikte, bu bölgedeki glutamaterjik hücrelerin anlık uyarımının beslenme davranışına nasıl etki edeceği bilinmemektedir.

Obezitenin başlıca sebeplerinden biri de uzun süre yüksek yağ içerikli besinlerin tüketilmesidir. Yüksek yağlı beslenmenin hipotalamustaki sinyallemelerde bozulmaya neden olduğu, metabolik, bilişsel, fizyolojik pek çok soruna yol açtığı bilinmektedir. Araştırmada yüksek yağlı beslenmenin etkileri glutamaterjik hücreler üzerinden ele alınmıştır. Glutamatin merkezi sinir sistemindeki bir diğer etkisi ise uzun süreli potansiyalizasyon (LTP) üzerinedir. LTP sinapsların son aktivitesine dayanan kalıcı bir güçlendirmedir. Bunlar, iki nöron arasında sinyal iletiminde uzun süreli bir artışa

neden olan sinaptik aktivite kalıplarıdır (9). Var olan literatürde hipotalamusun yüksek yağlı beslenmeden etkilendiği, glutamatın bellek süreçlerine katkısı, uzun süre yağlı beslenmenin belleğe negatif etkileri bilinmekle birlikte; medial hipotalamustaki glutamaterjik hücrelerin aktivasyonunun yeme davranışına etkisi ve bu hücrelerin yüksek yağlı beslenmeden nasıl etkileneceği bilinmemektedir. Bu çalışmada, medial hipotalamustaki glutamaterjik hücrelerin kemogenetik yöntem ile anlık olarak aktive edilmesinin beslenme davranışı üzerine etkisi; uzun süre yüksek yağlı beslenmenin ve glutamat aktivasyonunun farelerde belleğe, kan glikozuna ve lokomotor faaliyetlere etkisi araştırılmıştır.

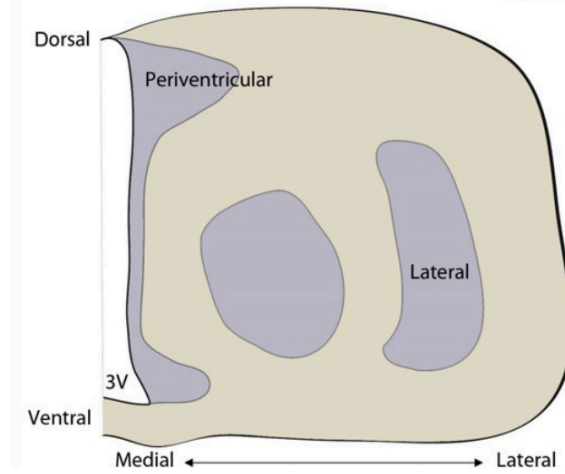


4- GENEL BİLGİLER

4.1 - Yeme Kontrolünde Merkezi Yolaklar

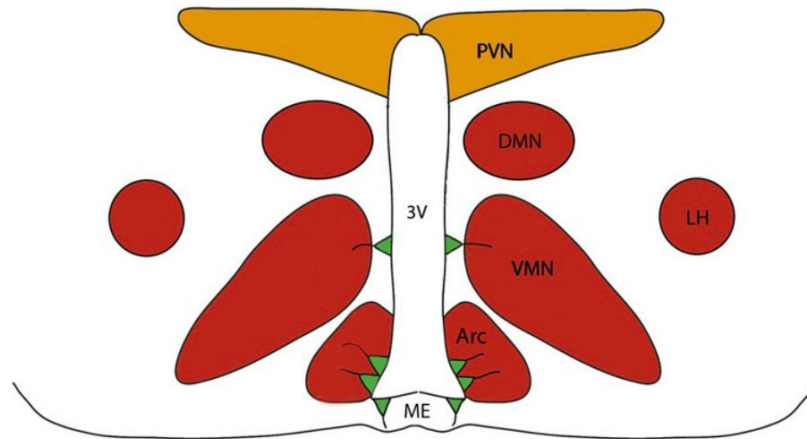
Temel tanım olarak beslenme; büyümenin sağlanması, enerji, yapıtaşları, düzenleyicilerin eldesi ve psikososyal amaçlar için besinlerin kullanılmasıdır. Canlılığın temel bileşenlerinden biri olan metabolizmanın sürdürülebilirliği için, metabolik faaliyetlerin koordine yürütülmesini sağlayan düzenleyici mekanizmalara gerekli moleküllerin temini için beslenmeye ihtiyaç vardır. Vücudun denge halinin sürdürülebilirliğinde ve metabolik faaliyetlerin sağlıklı bir şekilde işlenmesinde bu kadar hayati önem taşımasından dolayı beslenme sinirsel ve endokrinolojik birçok düzenleyici mekanizma ile kontrol altında tutulmaktadır. Bunun için enerji homeostaz sistemi, enerji harcanımını ve alımını; yani beslenmeyi modüle eder. Besin alımı merkezi sinir sistemindeki sinyal yolları ve buradan salgılanan hormonlarla düzenlenmektedir (1).

Hipotalamus ve arka beyindeki nöronlar ve nöronal devreler aktif olarak enerji durumundaki değişikliklere (açlık ve tokluk) cevap vererek beslenme davranışını düzenlerler. Buna ek olarak kognitif ve duygusal faktörler de beslenme davranışının düzenlenmesinde etkilidir. Hipokampus ve prefrontal korteks bağlantıları, öğrenilmiş ve motivasyonlu besin alımını etkilerken, amigdala projeksiyonları beslenmenin duygusal açıdan düzenlenmesinden sorumludur (10). Hipotalamus arka beyinde talamusun altında bulunan ve çoğunlukla gri maddeden oluşan bölümdür. Uzun ve kısa süreli enerji dengesi, glikoz konsantrasyonu, su ve elektrolit dengesi, vücut sıcaklığı, uyku/uyanıklık döngüsünü ve kan basıncı, üreme hormonlarının kontrol edilip ayarlanmasından sorumludur. Homeostazın sağlanması ve düzenlenmesinde hipotalamusun görevi kritik önem taşımaktadır. Hipotalamus hayatın devamlılığı için gerekli olan beynin farklı bölgeleriyle yapmış olduğu anatomik ve fonksiyonel ağ sayesinde bu vejetatif fonksiyonlar bakımından önemli bir yere sahiptir. Özellikle hipotalamusun belirli alanları, beslenme davranışını kontrol etmektedir. VMH'in hipotalamusun iştahı baskıladığı (4), LHA'nın iştahı arttırdığı bilinmektedir (11).



Şekil 4.1.1. Hipotalamusun medial ve lateral bölümleri (4)

Medial hipotalamus, arkuat, ventromedial (VMH), dorsomedial (DMH), anterobasal ve paraventriküler çekirdekleri (PVN) içeren tuberal hipotalamusu kapsamaktadır. Şekil 4.1.1 de hipotalamusun medial ve lateral bölümleri, Şekil 4.1.2 de medial hipotalamusun üçüncü ventrikül ve median eminense göre pozisyonu gösterilmektedir. Kırmızı alanlar tuberal çekirdekler, turuncu alanlar ise anterior çekirdeklerdir. Her bir medial çekirdek çeşitli fizyolojik fonksiyonları düzenlemekle birlikte, hepsinin paylaştığı bazı ortak roller ve birlikte hareket ettikleri amaçlar vardır. Bu amaçlar enerji dengesi, sıvı dengesi, stres yanıtı, yeniden yapılandırma, büyüme dengesini sağlamak, sirkadiyen ritim için diğer hipotalamik işlevlerle entegrasyon sağlamaktır (6).



Şekil 4.1.2. Medial hipotalamusun organizasyonu (4)

Hipotalamusun beslenme davranışı üzerindeki etkisiyle ilgili çalışmalar çoğunlukla arkuat çekirdek üzerine yoğunlaşmıştır. Hipotalamusun tüberal kısmında bulunan arkuat çekirdek, medyan eminensin yanında lokalize olmuş, kan beyin bariyerinin en az olduğu beslenme ve metabolizmadan sorumlu bir alandır. Periferik ve santral dolaşımdan gelen hormonal ve beslenmeye bağlı metabolik sinyaller koordine bir geri bildirim cevabı oluştururlar (12). Son yıllarda, elektrofizyoloji, optogenetik, kemogenetik tekniklerindeki gelişmeler yeme davranışında etki eden spesifik nöronların ayırt edilmesine yardımcı olmuştur. Bu çalışmalarda arkuat çekirdekte enerji dengesinden sorumlu Agouti-related peptide (AgRP) ve pro-opiomelanocortin (POMC) olmak üzere iyi tanımlanmış iki ana nöron grubu olduğu bulunmuştur (13). AgRP ve POMC nöronları çeşitli beyin bölgelerine de projeksiyonlar yaparak vücut ağırlığının düzenlenmesinden ve besin alımından sorumludur (14). Genel olarak AgRP nöronları “yemek yeme isteğini artırıcı”, POMC nöronları da “yemek yeme isteğini baskılayıcı” rol oynamaktadır (15,16). Arkuat çekirdek medial hipotalamusta yer alır ve yakınındaki median eminens kan temin etmektedir. Böylelikle POMC ve AgRP hücreleri, bulundukları anatomik lokasyon ve ilişkileri sayesinde periferik ve merkezi sinyalleri beslenme davranışını düzenlemek için gerekli merkezi sinyallere dönüştürürler (17). Ayrıca, bu hücreler çok sayıda nörotransmitter ve hormon tarafından da modüle edilmektedir. Örneğin grelin, gastrik mukozadan salgınır ve POMC hücrelerini baskılayan ve AgRP hücrelerini uyaran indirekt bir mekanizmaya sahiptir (18, 19). POMC hücreleri ise, tokluk durumunda yağ dokusundan salgılanan leptin hormonuna duyarlıdır ve melanokortin salgılanması ile ve merkezi projeksiyon nöronları üzerinden AgRP hücrelerini inhibe ederek besin alımını azalmasına neden olmaktadır (20).

VMH; PVN, LHA ve arkuat çekirdekten ve diğer nöronlardan projeksiyonlar alarak bu girdileri entegre ederek ve diğer beyin bölgelerine bilgi göndererek besin alımını artırmakta ya da azaltmaktadır. VMH'nin beslenmenin merkezi kontrolünden sorumlu olduğu bilinmektedir (12). Hipotalamik lezyonlarla ilgili yapılan ilk deneysel çalışmalar 1921 yılında Bailey ve Bremer'in laboratuvar çalışmalarına dayanmaktadır (21) . Köpeklerde basomedial hipotalamusun lezyonunun, hiperfajiye ve obeziteye neden olduğu bulunmuştur. Benzer şekilde ratlarla yapılan eski çalışmalarda da

basomedial hipotalamik lezyonunun, obeziteye neden olduğu gösterilmiştir (22). Beslenme davranışındaki modern beyin araştırmaları 1939'da, Horsley-Clarke'ın stereotaktik araçları ratlarda kullanmasıyla başlamıştır. İlerleyen yıllarda hipotalamustaki lezyonların kiloya etkisine dair pek çok çalışma yapılmıştır ve VMH'nin ventrolateral bölgelerindeki göreceli lezyonların da kilo alımında etkili olduğu bulunmuştur (23). VMH yaklaşık 60 yıl önce, lezyonları aşırı yeme ve obeziteye neden olduğu için doyumluk merkezi olarak tanımlanmıştır. Hipotalamustaki primer doyumluk merkezi VMH'dir (24). Medial hipotalamus, arkuat çekirdekten, beynin diğer bölgelerinden, kan dolaşımındaki hormonlardan bilgi almaktadır. Bu bölge, besin alımını düzenlemek için beynin diğer bölgelerinden girdiler alır ve bu bilgileri entegre etmektedir (25). VMH in beyindeki doyumluk merkezi olduğunu söyleyen ilk kişi 1950' de Kennedy olmuştur (23). Kennedy'nin lipostatik hipotezi, vücut ağırlığının uzun dönem regülasyonunda VMH in rolü olduğunu düşündürmüştür. Jean Mayer'in glukostatik teorisine göre ise, VMH doyumluğu glukoreseptörler aracılığıyla sağlamaktadır (26). Sonraki çalışmalar VMH nöronlarının %25-45'inin glukozu duyarlı olduğunu göstermiştir (27). Medial hipotalamus bölgesi, glukoz homeostazını regüle etmede önemli role sahiptir. Özelleşmiş VMH glukoz duyarlı nöronlar, periferik ipuçları ile kan glukoz düzeyindeki değişimleri entegre etmektedir (28). VMH, glukoz ile uyarılan ve inhibe edilen nöronlar içermektedir.

4.2- Yağlı Beslenme

İnsanlık tarihi boyunca yemenin temel amacı enerji dengesini sağlamak ve kıtlıktan korunmak olmuştur. Fakat modern zamanlarda, yiyecek tüketiminin enerji ihtiyacını karşılamasının yanı sıra çok daha fazla sebebi vardır (29). Vücut ağırlığı ve obezite ile ilgili çalışmalar enerji dengesinin altında yatan mekanizmalara odaklanır. Bununla birlikte vücut ağırlığı aynı zamanda genlerden, yaşam tarzından, sosyal davranışlardan ve çevreden oldukça etkilenir (30). Yakıt ihtiyacımızı karşılamak üzere besin alımı vücudun homeostatik ihtiyaçlarını karşılar ve metabolik olarak tetiklenirken diğer yeme eylemleri bilişsel, ödül ilişkili ve duygusal faktörlere bağlıdır. Bu ikinci besin alımı tipi "hedonik yeme" olarak adlandırılır. Hedonik yemede yiyeceğin kalorik değerinden çok yemekten alınan haz ön plandadır ve özellikle yağlı ve şekerli

yiyecekler beyinde ödül yanıtı oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalar yüksek yağlı ve şekerli yiyeceklerin ödüllendirici etkileriyle, kişiyi doyunluğa rağmen yemeye motive ettiğini göstermektedir. Aynı zamanda yüksek kalorili olan bu yiyeceklerin sağladığı pozitif hedonik deneyim, çeşitli gıdaların yeterince tedarik edilmesine yardımcı olan bir etki sağlamaktadır (31).

Yağlı ve şekerli bir yiyeceğin neden diğerlerine tercih edildiği ve doyunluğa rağmen bu yiyeceklerin tüketimine devam edilmesi, bu yiyeceklerin tetiklediği nöral yanıtlar hakkında merak uyandırmaktadır. Kemirgenlerin de, tıpkı insanlarda olduğu gibi tatlı ve yağlı yiyeceklerle belirgin bir eğilimi vardır. Farelerde standart yemden obezojenik beslenmeye geçildiğinde aşırı yemeye başladıkları net olarak bilinmektedir (32). Bunun nedeni obezojenik diyetin oluşturduğu ödüllendirici etkidir. Özellikle yağlı yiyeceklerin ödüllendirici etkisi olduğu bilinmektedir (33,34). Kronik olarak yüksek yağlı beslenmenin beyinde ödül eşliğinde düşmeye neden olduğu ve bunun da dopamin D2 reseptörlerinde azalmaya neden olduğu bilinmektedir (35). Yağlı ve lezzetli yiyeceklerin beyinde oluşturduğu ödül yanıtı, vücut ağırlığını kontrol eden homeostatik sinyalleri yok saymakta bu da doyunluğa rağmen yemeyi durduramamaya neden olmaktadır (36). Enerji ihtiyacı ve hedonik değer arasındaki bu uyumsuzluk yeme bozukluklarına ve obeziteye neden olmaktadır. Yüksek yağlı beslenmenin, obezite başta olmak üzere diyabet, metabolik sendrom gibi pek çok hastalık için risk faktörü olduğu bilinmektedir. Beden kitle indeksinin yiyecek tercihleriyle ilgili olduğuna dair kesin kanıt vardır ve bu indeksteki artış çoğunlukla yağlı yiyecekler ile ilişkilidir (37). Besin erişiminin zor olduğu avcılık toplayıcılık döneminde bu hedonik yeme deneyimi avantajlı bir etkiye sahipken, günümüzde besin ulaşımının kolay olduğu obezojenik çevresel koşulda, yaşamda kalmak ve sağlıklı olmak için tam tersi şekilde bu hedonik etkiyi baskılamak daha avantajlıdır.

Hipotalamus, besin alımını regule eden nörosinyaller ile enerji dengesi ve homeostazi sağlar. Fakat, yüksek yağlı diyetle beslenen hayvanlarda, hipotalamusta arkuat çekirdekte POMC hücrelerinin artan ekspresyonuna, NPY nin azalan ekspresyonuna rağmen, aşırı yeme ve obezite görülmektedir. Bu sonuçlar hipotalamusta homeostatik enerji sinyallerinin hiperfajiyi durdurmada yeterli olmadığını göstermektedir (38).

Yüksek yağlı diyet tüketiminin anoreksijenik hormonlar olan leptin ve insüline karşı hipotalamik direnci arttırdığı bilinmektedir. Bu direnç, gıda alımı ve termogenez arasındaki dengenin aşamalı olarak kaybına yol açar ve beden kitle indeksinde artış ile sonuçlanır (39–41). Adipoziteye karşı insülinin varlığına rağmen, aşırı yemeye bağlı kilo artışının, nöral yanıtlarda bir sorundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Sağlıklı bireylerde yağlanma ve aşırı kilo artışından koruyan fizyolojik mekanizmaların varlığı bilinmektedir. Obezitenin prevalansındaki artış göz önünde bulundurulduğunda, bu mekanizmalardaki disfonksiyonun doğasının anlaşılması önem arz etmektedir.

Enerji homeostazı, insülin ve leptin (42) hormonlarını içeren bir negatif geri bildirim döngüsü tarafından düzenlenir. Bu iki hormon hipotalamus arkuat çekirdekteki nöronlar aracılığıyla enerji tüketimini artırır. Bu nöronlar insülin ve leptin reseptörleri eksprese eder ve bu hormonlara doğrudan yanıt verir (43,44). Enerji dengesini sağlayan bu model, pozitif enerji dengesi durumunda insülin ve leptin düzeylerinin gıda alımını azaltmasına, enerji harcanmasını artırmaya ve yağlanmaya karşı korumaya yönelik nöral tepkilere neden olması gerektiğini düşündürmektedir. Fakat bu durumun obezitede bozulduğu gözlenmektedir. Obezite durumunda yağlanmada artışla birlikte insülin ve leptin seviyeleri artar fakat gıda alımı da yüksek kalır (45). Bu bulgular diyet kaynaklı obezitenin, merkezi sinir sisteminde leptin ve insüline karşı bir direnç oluştuğunu, bunun da kilo alımına neden olduğunu göstermektedir. İnsülin ve leptin ortak hücreler arası mekanizmaları kullandığından (46), bu hormonlara yönelik nöronal direnç mekanizmaları da aynı ya da benzerdir. Yüksek yağlı beslenmek, introserebroventriküler insülinin gıda alımını azaltma ve hipotalamik sinyal iletimini aktive etme etkisini azaltmaktadır (47). Yüksek yağlı beslenmenin etkisiyle hipotalamusta, oksidatif stres markerlarında artış, inflamasyon, endoplazmik retikulum stresi, otofaji sorunu apoptoz ve nöral rejenerasyonda değişiklikler oluşur. Ek olarak, son zamanlarda yapılan çalışmalarda, yüksek yağlı bir diyetin enerji dengesinin hipotalamik kontrolü ve hipotalamik disfonksiyon üzerindeki etkisiyle ilgili bir dizi mekanizma ortaya çıkarılmıştır (48).

Yüksek yağlı beslenmenin enerji metabolizmasına direkt etkisi bilinmektedir. Enerji homeostazının sağlanması için merkezi ve periferik sinir sistemi arasında hormonal ve nöronal bir iletişim ağı bulunmaktadır. İnsülin ve insülin reseptörleri üzerinden gerçekleşen enerji dengesinin korunumu, merkezi sinir sisteminde bellekten sorumlu beyin bölgesi olan hipokampusu de etkilemektedir. Hipokampus ve kortekste insülin reseptörlerinin ekspresyonu yükündür ve sinaptik insülin sinyallemeöi öğrenme ve bellek için kritiktir. Periferal insülin duyarsızlığı merkezi sinir sisteminde dramatik etkilere neden olabilir (49,50). Yüksek yağlı beslenmenin neden olduğu bilişsel bozulmanın, bozulmuş merkezi ve periferal insülin sinyallemeöi ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (51–53). Ayrıca yüksek yağlı beslenmenin endokanabinoid sinyallemedeki değışiklikler aracılığıyla (54) , mekânsal öğrenmeyi bozduğu bilinmektedir (55). Yüksek yağlı beslenmenin belleğe etkisi için yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu yüksek yağlı beslenmenin hipokampal aktiviteyi bozduğunu ve bellek testi performansını olumsuz etkilediğini bulmuştur (56).

4.3 Glutamat

Glutamat glutamik asit anyonunu ifade eder ve merkezi sinir sistemindeki dominant uyarıcı nörotransmitterdir. İnsan beyninin sinaptik bağlantılarının %90ından fazlasını oluşturur (57). Bir nöronun glutamat salması için, glutamat; spesifik vesiküler glutamat transporterları (VGLUT1, VGLUT2, VGLUT3) adı verilen sinaptik veziküllere yüksek yoğunlukta paketlenmelidir (5, 58). Uyarım geldiğinde, glutamat sinaptik aralığa salınır ve hücre yüzey reseptörlerine bağlanıp aktive ederek etkisini gösterir. Memelilerde, AMPA, kainat, NMDA reseptörleri ve metabotropik glutamat reseptörleri olmak üzere dört çeşit glutamat reseptörü bulunmaktadır. İlk üç aile aktive olduğunda membran kanalları açılır ve iyon geçişine izin verilir yani iyonotropiktir. Metabotropik aile ise, g protein bağlı reseptörlerdir ve sekonder mesajcı sistemi ile etki gösterirler (59).

Nöronlar veya glia tarafından alınan glutamat, nörotransmitter olarak yeniden kullanılabilir, Sinaptik plastisitedeki rolünden dolayı glutamat, öğrenme ve bellek gibi kognitif fonksiyonlarda önemli işlev görür (60). LTP olarak bilinen plastisite formu,

hipokampus, neokorteks ve diğer beyin bölgelerinde glutamaterjik sinapslar olarak yer edinir (61). Glutamat ayrıca beyin gelişimi boyunca, büyüme konileri ve sinaptogeneizde de önemli rol oynar. Aynı zamanda glutamat dekarboksilaz etkisiyle GABA öncüsü, protein sentezi, enerji metabolizması veya amonyak fiksasyonu gibi metabolik amaçlar için de kullanılabilir. Merkezi sinir sisteminde glutamat, bir presinaptik nöronda ya da komşu glial hücrelerde glutamin döngüsünün bir parçası olarak glutaminaz enzimi ile glutaminden sentezlenir (62).

Sitrik asit döngüsünün bir parçası olan alfa keto-glutarik asitten sentezlenebildiği için, esansiyel olmayan amino asit sınıfına girer. Her yerde bulunan doğasına rağmen, hücre dışı glutamat seviyeleri sıkı bir şekilde düzenlenir. Presinaptik glutamatın salınımı büyük ölçüde nörotransmisyon ihtiyacını aşar. Glutamat kan beyin bariyerini tek başına geçemez. Beyinde konsantrasyonunu sabit tutan, yüksek afiniteli taşıma sistemi ile sinir sisteminden taşınır (63). Yüksek glutamat konsantrasyonları, hızlı bir şekilde temizlenmedikçe daha fazla iletimi engelleyebileceği veya nörotoksositeye neden olabileceğinden, sinaptik olarak salınan glutamat, ağırlıklı olarak astrositler üzerinde eksprese edilen uyarıcı amino asit taşıyıcıları (GLT-1 ve GLAST) yoluyla hücre dışı boşluktan geri dönüştürülür. Astrositlerde, geri dönüştürülen glutamat, glutamin sentetaz ile glutamine metabolize olabilir ya da TCA siklusuna girebilir (58).

Vücutta homeostazı sağlayan anahtar beyin bölgesi olan hipotalamustaki nöronların peptidler ve nöromodülatörlerin yanı sıra primer uyarıcı transmitter olarak glutamat saldırdığı bilinmektedir (64). Özellikle ventromedial hipotalamus (VMH) taki nöronlar çoğunlukla glutamaterjiktir ve dominant hipotalamik transporter olan VGLUT2, ventromedial nükleusta güçlü bir şekilde eksprese edilir (65). VMH besin alımı, kan şekerinin ayarlanması ve enerjinin düzenlenmesinden sorumlu bir bölgedir. İlk hücre-spesifik Cre faresinde silinmiş VGLUT2 fonksiyonu üzerine çalışma 2007’de Tong ve ark. tarafından yayınlanmış ve VGLUT2’nin ventromedial hipotalamus (VMH) nöronları ile çalışılmıştır (7). VGLUT2 ekspresyonunun normal emosyonel aktivite ve psikostimulant-ilişkili davranışlar için gerekli olduğu gösterilmiştir (66). VTA bölgesinde VGLUT2 nöronlarının aktivasyonunun koşullanmış yer tercihi ve

beslenme davranışının koşullanmasında ödül mekanizmasını tetiklediği ve dopaminerjik nöronları aktive ettiği gösterilmiştir (67).

Son yapılan çalışmalarda tek başına AgRP ve POMC nöronlarının beslenme davranışına etki etmediği, birçok nörotransmitterin de beslenme davranışında rol aldığı gösterilmiştir. Özellikle GABAerjik ve glutamaterjik nöronların enerji dengesinin sürdürülmesi üzerine büyük katkısı olduğu gösterilmiştir (5). Hipotalamustaki sinaptik aktivitenin çoğunu oluşturan iki nörotransmitter, aminoasit glutamat ve GABA dır (68). AgRP ve POMC gibi nöron gruplarının yanı sıra beyinde çokça ifade edilen glutamaterjik ve GABAerjik nöronların da arkuat çekirdekte beslenme davranışına katıldığı düşünülmektedir (69). POMC ve AgRP nöronlarının VMH ve PVN gibi başka hipotalamik çekirdeklerden aktive edici glutamaterjik geri bildirimler aldığı da bilinmektedir. Birçok POMC ifade eden nöronda aynı zamanda glutamaterjik ve GABAerjik belirteçlerin de olduğu bilinmektedir. AgRP nöronlarındaki NMDA reseptörlerinin, AgRP salgılayan nöronların açlık kaynaklı aktivasyonunun belirgin şekilde artmış glutamaterjik girdi ile ilişkili olduğunu gösteren enerji dengesini kontrol etmede kritik bir rol oynadığı bulunmuştur (70). Arkuat çekirdekte bulunan VGLUT2 nöronlarının beslenme davranışı üzerinde etkisi olduğu daha önce gösterilmiştir (8). POMC nöronlarının aksine bu VGLUT2 nöronları çok daha hızlı yanıt oluşturmakta ve anoreksijenik etkiye sebep olmaktadır. Birçok POMC ifade eden nöronda aynı zamanda glutamaterjik ve GABAerjik belirteçler de bulunmaktadır.

Beslenmenin ince ayarlanmasında rol oynadığı düşünülen PVN bölgesine LH'den gelen inhibe edici sinyallerin de glutamaterjik karakterde olabileceği düşünülmektedir. Tong ve arkadaşları (7), insülin kaynaklı hipoglisemiye karşı düzenleyici yanıtta VMH teki glutamaterjik nöronların rolünü göstermiştir. Glutamatın sinaptik salımı için gerekli olan VGLUT tan yoksun farelerin SF1 nöronlarında, vücut ağırlığında artış ve hipoglisemiye karşı düzenleyici yanıtta bozulma olduğu bulunmuştur. Bu nedenle, medial hipotalamus nöronlarından glutamat salınımı bu sistemde önemli bir bileşendir. Dahası, son çalışmalar, akut hipogliseminin saptanmasında ve glukozaya karşı düzenleyici yanıtın başlamasında VMH içinde AMPK (Aktive Edici Protein

Kinaz)’nın bir rolü olduğunu göstermiştir (71). VMH nöronları çoğunlukla glutamaterjiktir ve VGLUT-2 kodlayan mRNA ekspresyonu yüksek seviyede bulunmaktadır (65). Medial hipotalamusun glutamaterjik nöronlardan zengin olması, fizyolojik ve davranışsal yanıtların kontrolünde önemli rol oynadığını göstermektedir.

Hipotalamustaki glutamat salınımının metabolik durumdan etkilendiği de bilinmektedir. Yiyecek yoksunluğu uyarıcı sinaptik girdiyi artırmaktadır. Bağırsaktan salınan grelin, glutamat salımını artırmakta, AgRP ifade eden nöronları aktive etmek üzere presinaptik reseptörlere etki etmektedir (72). Leptin aracılığıyla hipotalamik astrositlerdeki faktörlerin transportu sağlanır ve enerji homeostazında önemli rol oynar (73). Hipotalamustaki glutamaterjik hücreler tat tercihinde de etkilidir. AgRP eksprese eden nöronların aktivasyonundan sonra, LHA’da glutamat nöronlarının tat tercihinin iki yolla belirlediği bilinmektedir. Glutamat nöronları lateral septuma projeksiyonları tatlı tadın tercihinin neden olurken, lateral habenulaya projeksiyonu ise acı tatlara duyarlılığı azaltır (74). Obezitede yüksek kalorili (yağlı ve şekerli) yiyeceklere eğilim olduğu düşünüldüğünde aşırı yemenin altında yatan mekanizmaların glutamat projeksiyonları ile ilişkili olduğu düşünülebilir. Yüksek yağlı beslenmenin hipotalamusta sitokin konantrasyonunda artışa ve mikrogliozis, astrositozis ve nöronal hasara neden olduğu bilinmektedir. Bu inflamasyon durumu kilo alımına ve obezite gelişimine neden olmaktadır (75). Özellikle medial hipotalamus glutamaterjik hücrelerinin beslenme durumundan nasıl etkilendiği ve bu hücrelerin davranışsal süreçlere etkisi çalışmamızın araştırma konusudur.

4.4 Öğrenme ve Bellek

Bir canlı türünün hayatta kalması için temel ihtiyaçlarını karşılaması gerekir ve bu ihtiyaçları karşılamak için çevre ile etkileşim kurmalı, hangi nesnelerin güvenli olduğunu ayırt etmelidir. Öğrenme, organizmaların sürekli değişen çevreye adaptasyonu için fırsat sağlayan bir yetidir (77). Genel tanıma göre öğrenme, davranışlarda görel olarak kalıcı değişimlere yol açan deneyimlerdir. Öğrenme organizmanın bir şeyi yapmamayı öğrenmesi, davranış dağarcığından bir eksilme olması olarak da tanımlanabilmektedir (77). Öğrenmenin varlığı için davranışlarda bir

değişme olmalıdır, davranıştaki değişim kalıcı olmalıdır ve davranıştaki bu değişim çevre ile etkileşim sonucunda, yani bir yaşantının ürünü olmalıdır (78). Bellek; veri ve bilgilerin kodlandığı, depolandığı ve ihtiyaç duyulduğunda geri çağırıldığı beyin yetisidir. Gelecekteki davranışı şekillendirmek için bilginin yeniden kullanılması bellek sayesinde mümkündür (79). Bellek, duyuşsal işleme, çalışma belleği ve uzun süreli bellek gibi içsel ve dışsal fonksiyonlardan oluşan bir bilgi işleme sürecidir (80). Duyusal bilgi dış dünyadan alınır ve nöronlar aracılığıyla fiziksel veya kimyasal forma dönüştürülerek farklı yoğunluklarda etki eder. Hipokampus, amigdala, stiratum, mamillar cisimcik gibi farklı beyin bölgeleri belleğin nöroanatomisini oluşturur ve farklı beyin bölgeleri belleğin farklı bileşenleri ile ilişkilendirilir. Hipokampus mekânsal öğrenme ve açık bellek ile ilişkilendirilirken, amigdala duygusal bellek ile ilişkilendirilmektedir (81). Bununla birlikte öğrenme ve belleği yalnızca spesifik beyin bölgeleri ile anlamak mümkün değildir. Öğrenme ve bellek nöral sinapslarda değişiklikleri içeren bir süreçtir ve uzun süreli potansiyasyon (LTP) ve uzun süreli depresyon (LTD) aracılığıyla düzenlendiği bilinmektedir (82,83).

Öğrenme ve belleğin hücresel düzeyde temsilini sağlayan sinaptik plastisite mekanizmaları olan LTP ve LTD süreçlerinde; glutamat ve glutamat reseptörlerinin anahtar rol oynadığı bilinmektedir. LTP sinapsların son aktivitesine dayanan kalıcı bir güçlendirmedir. Bunlar, iki nöron arasında sinyal iletiminde uzun süreli bir artışa neden olan sinaptik aktivite kalıplarıdır (9). LTP yaygın olarak öğrenme ve hafızayı oluşturan ana hücresel mekanizmalardan biri olarak kabul edilir (84). LTP sinyal yolları, spesifik hücreleri ve reseptörleri kullanır. Hipokampal LTP; NMDA reseptörlerine, diğerlerinin bir bölümü metabotrofik glutamat reseptörlerine bağlıdır. AMPA reseptörleri, beyinde en çok bulunan glutamat reseptörüdür ve uyarıcı aktivitelerin büyük kısmını modüle eder. Sinapslarda AMPA reseptör sayısı arttıkça gelecek uyarıcıların postsinaptik yanıt dönüşme ihtimalleri artar (85). Beyinde yüksek miktarda bulunan glutamat ve reseptörleri, öğrenme ve bellek ile ilgili süreçlerde önemli rol oynamaktadır.

Beslenme regülasyonu ve homeostaz için anahtar beyin bölgesi olan hipotalamusun öğrenme ve belleğe katkısı son yıllarda yapılan çalışmalarda ele alınmaya başlamıştır.

Hipotalamus, obeziteye yatkınlık ya da direnci belirlerken bir “metabolik bellek” görevi görmektedir. Homeostazdan sorumlu ana beyin bölgesi olan hipotalamusun yiyeceklerin duysal bileşenlerini hatırlamaktan farklı bir metabolik öğrenmeden sorumlu olduğu düşünülmektedir (86). Hipotalamusun elektriksel stimölasyonunun belleği güçlendirdiğini gösteren eski çalışmalar mevcuttur (87,88). Bu bölgenin, organizmanın şimdiki fizyolojik ve davranışsal durumuna dayanarak öğrenme ve bellek gibi kognitif süreçleri yönlendirdiği bilinmektedir (89). Lateral hipotalamus lezyonlu sıçanların daha önce öğrenilmiş tat isteklerini hatırlayabildiği, ancak yenilerini öğrenemediği gösterilmiştir (90). Lateral hipotalamusun intrakranial stimölasyonunun, bellek konsolidasyonunu güçlendirdiği, bu güçlendirmenin hipokampüste çeşitli sinyal yollarıyla nöroplastisite aracılığıyla gerçekteştiği bulunmuştur (91). Alzheimer hastalarında hipotalamusun derin beyin stimölasyonunun tedavi olarak kullanıldığı bilinmektedir (92). Benzer şekilde obezlerle yapılan bir çalışmada bilateral hipotalamik derin beyin stimölasyonunun otobiyografik belleği uyardığı bulunmuştur (93). Bu çalışmalar, beslenmenin regölasyonunu sağlayan hipotalamusun bellek ile ilişkilerini farklı yönlerden ele almıştır. Bu ilişkiler göz önüne alındığında, beslenme biçiminde yapılan değişikliklerin de belleğe etkisi de araştırma konusu olmaktadır.

Öğrenme ve bellek gibi kognitif fonksiyonların beslenme biçiminden etkilendiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalar beslenmenin ve yiyeceğe ilişkin çevrenin kognisyon, motivasyon ve davranışsal kontrol üzerinde etkileri olduğunu göstermektedir (94). Doymuş yağ ve rafine karbonhidrat içeren diyetlerin aşırı tüketimi yalnızca obeziteyle değil, kognitif fonksiyonlarda azalma ile de ilişkilidir (95). Öğrenme, bellek ve davranışsal kontrol ile ilgili beyin bölgelerinin beslenmeden etkilendiği bilinmektedir (94,96). Yüksek yağlı ve şekerli beslenmenin, farelerde dopamin seviyesini artırdığı; bellekle ilişkili bölgeler olan striatum ve hipokampüste metabolitlere neden olduğu bulunmuştur (97). Yüksek yağlı beslenmenin farelerde belleğe olumsuz etkileri gösterilmiştir. 12 hafta yüksek yağlı diyetle beslenen hayvanların, 12 hafta standart pelet yeme geçirilmesiyle diyetle bağlı gelişen kognitif ve duysal süreçlerde onarımın sağladığı bilinmektedir (96). 10 günlük yüksek yağlı yüksek şekerli diyetin hipokampal Glut-1 glukoz transporterında düşüşe neden

olmaktadır. Bu düşüş öğrenme ve bellek sorunlarıyla ilişkilendirilmiştir (98,99). Pek çok çalışma obezite ve kognitif bozulma arasındaki ilişkiyi göstermiştir (100,101). Kognitif fonksiyonlardaki bu bozulma, BDNF (Beyin türevli nörotrofik faktör) seviyelerinde azalma, glutamaterjik sinyallemede değişimler ve insülin regülasyonunda bozulma gibi farklı mekanizmalarla açıklanmaktadır (102). Yüksek yağlı beslenmenin bellek üzerine olumsuz etkileri beslenme süresine göre de değişkenlik göstermektedir. 5 hafta boyunca yüksek yağlı diyetle beslenen fareler obje tanıma testinde kontrole göre aynı performans gösterirken (103), 21 hafta yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde tanıma belleğinde bariz bozulma görülmüştür (104). 8 ve 16 hafta yüksek yağlı beslenmenin etkisini belirlemek için yapılan obje tanıma testinde; 8 hafta yüksek yağlı beslenen farelerin kontrol ile benzer performans gösterdiği, 16 hafta yüksek yağlı beslenen farelerin kontrole göre daha başarısız olduğu bulunmuştur (105). Sonuç olarak, uzun dönem boyunca (20-21 hafta) yüksek yağlı diyetle beslenen fareler çeşitli çalışmalarda mekânsal bellekte ve mekânsal öğrenmede bozulma göstermiştir (106–109).

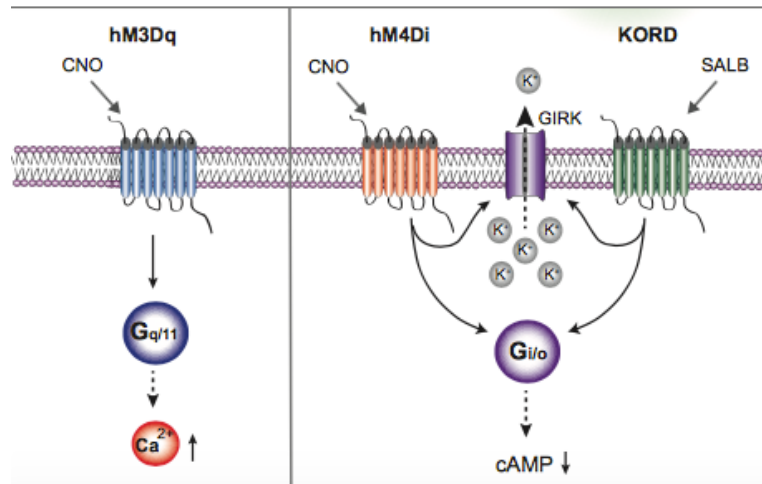
Obez bireyler hipotalamik dirence sahiptir ve leptinin anoreksijenik uyarımını alamazlar. Hipotalamustaki bu disregulasyon iştah ve besin alımında artışa ve obeziteye neden olur (110,111) Periferel ipuçları ve arkuat çekirdekdeki nöronal yanıtlar arasındaki entegrasyon oldukça hassastır ve kolaylıkla bozulabilir. Farelerde bir günlük yüksek yağlı diyetin, hipotalamik IL-6 ve TNF alfa ekspresyonunu ve mikrogial hücrelerin aktivasyonunu artırdığı bilinmektedir (112). 3 gün boyunca yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde nöroinflamasyon, gliosis ve nöral injury markerlarında artış bulunmuştur (113). Uzun süre yüksek yağlı beslenmenin ve obezitenin, hipotalamik dirence ve nörosinyalleme mekanizmasında duyarsızlaşmaya neden olduğu bilinmektedir. Yüksek yağlı beslenmenin bellek üzerine olumsuz etkileri de göz önünde bulundurularak, bu çalışmada; hipotalamusta özellikle bellek için anahtar rol oynayan glutamaterjik hücreler üzerinden bir duyarsızlaşma olmasının, belleğe olumsuz etkiye neden olabileceği hipotez edilmiştir.

4.5 Kemogenetik Stimulasyon

İnsanda farklı beyin bölgelerinin fonksiyonlarını belirlemek için yapılan çalışmalar, tarih boyunca araştırma konusu olmuştur. Yapılan ilk çalışmalar lezyon araştırmalarına dayanmaktadır. Klinik çalışmalar ve beyin hasarı gözlemleri ile farklı beyin bölgelerinin fonksiyonları haritalanmıştır. Beyin bölgelerinin işlevleri ve nöral devrelerin iletişimleri yıllar içinde açıklığa kavuşmaya başlamıştır. Davranışsal değişiklik sağlamak, tedavi edici olarak kullanmak, işlevleri daha detaylı araştırmak gibi sebeplerle spesifik nöral devrelerin aktivasyonu veya inhibisyonu için çeşitli yöntemler denenmiştir. Optogenetik ve kemogenetik yöntemlerdeki gelişmeler, hedeflenen beyin bölgesindeki spesifik nöronal popülasyonların aktivasyonu ya da inhibisyonunu sağlamaya yardımcı olmaktadır. DREADD adı verilen bu tekniklerde, spesifik nöronlar için ışık ile aktive olabilen iyon kanalları veya tasarımcı ilaç tarafından özel olarak etkinleştirilen tasarımcı reseptörler kullanılmaktadır (114). Optogenetik yöntemde; ışığa duyarlı kanallar nörona viral olarak yerleştirilmekte ve bu kanala sahip hücreler ışıkla manipüle edilebilir hale gelmektedir. Kemogenetik yöntemde ise bu hücreleri aktive etmek için kimyasal olarak tasarlanmış reseptörler ve bu reseptörlere özgü eksojen moleküller kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda kemogenetik yöntem, çoğunlukla beyin aktivitesi ve davranış arasındaki ilişkiyi anlamak için kullanılmaktadır (115).

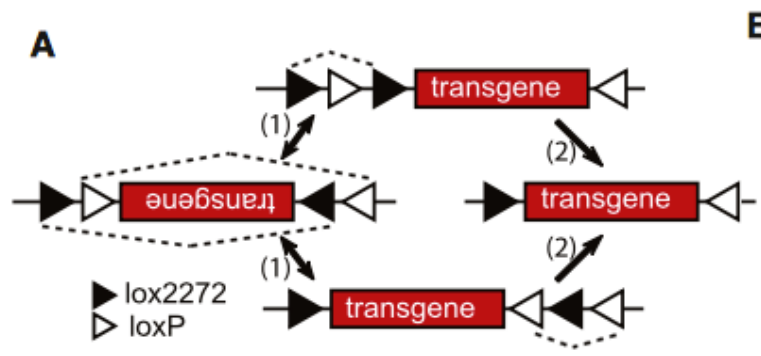
Belirli bir nöron popülasyonunun spesifik olarak uyarılması için hücre içi ve hücreler arası sinyal iletimindeki elektrokimyasal gradyan, avantaj sağlamaktadır. Elektrokimyasal gradyanlar, besin taşınması, enerji üretimi, hücre içi sinyal iletimi ve uzun menzilli elektriksel iletim gibi temel hücresel fonksiyonları kolaylaştırmaktadır. İyon kanalları hücresel elektriksel aktiviteyi kontrol ettikleri için, hücresel fonksiyonlarda başlıca hedeflerdir (116). İyon kanalları, küçük molekül veya peptit agonistleri veya antagonistleri ile veya dolaylı olarak G proteini bağlı reseptör sinyali yoluyla bozulabilmektedir (117,118). İyon kanalları ve reseptörlerin uyarımı farmakolojik olarak mümkün olmasına rağmen (119–122), bu kanal ve reseptörler çok sayıda hücre popülasyonu tarafından eksprese edildiği için manipülasyonların seçiciliği yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle hücresel elektriksel aktiviteyi kontrol

edebilmek için; kemogenetik yöntem olarak bilinen, ekzojen olarak tasarlanmış reseptör ve iyon kanalları geliştirilmiştir (123–125). Kemogenetik araçlar, spesifik bir hücre popülasyonunu hedef alır ve bir kimyasal ligand aracılığıyla hızla açılıp kapanabilen bir hücresel yolu transgenik olarak işletir (124). Kemogenetik yöntem sayesinde; hemen hemen her hücre popülasyonuna uygulanabilen ayarlanabilir, seçici reseptör / ligand sistemi tasarlanarak hücresel yolların kimyasal kontrolü sağlanmaktadır. Kemogenetik araçların iki temel özelliği vardır. Birincisi; transgenik işletici normalde hücrelere karşı etkisizdir, endojen ve ligandlara yanıtı düşüktür. İkincisi; ekzojen ligand, işletici transgeni içermeyen hücrelere zararsızdır (116). Kemogenetik yöntemde, reseptörleri dizayn etmek için kullanılan tasarlanmış makromoleküller nükleik asit hibritleri (126), kinazlar (127), metabolik enzimler (128,129), DREADD (130–132) gibi G protein bağlı reseptörleri içerir. DREADD en yaygın bilinen G protein bağlı reseptör kullanılan kemogenetik yöntemdir (115). Bu reseptörler sadece ilgili ilaç (eylemsiz molekül) tarafından aktive edilir ve merkezi sinir sistemi içinde ve dışında gerçekleşen fizyolojik ve sinirsel süreçleri etkiler. DREADD, laboratuvar hayvanlarında hücresel aktivitenin uzaktan ve geçici olarak manipülasyonu için klinik terapötik potansiyeli olan güçlü bir yaklaşımdır (133). DREADD teknolojisinde tasarımcı reseptörler; asetilkolin veya diğer endojen nörotransmitterler tarafından aktive edilmeyen, yalnızca tasarımcı ilaç klopamin n oksit (CNO) tarafından aktive edilen; mutasyona uğramış insan muskarinik reseptörleridir (hM3Dq ,hM4Dq) (Şekil 4.5.1) (132).



Şekil 4.5.1. DREADD metodu ile kemogenetik manipülasyon (16)

Kemogenetik ve optogenetikte spesifik nöral döngülerin manipülasyonunda başarılı olmak için hedefleme stratejisi önemlidir. Hedeflenen nöron popülasyonu, hücre gövdeleri veya projeksiyonlarını hedeflemek için pek çok metot vardır (134). Optogenetik ve kemogenetikte; hedeflenen nöronal popülasyon için, spesifik bir genin transkripsiyonal kontrolü altında cre rekombinaz enzimi eksprese eden, genetik olarak modifiye edilmiş fareler kullanılır. Örneğin VGlut–Cre fareler; cre yi yalnızca VGlut ifade eden glutamaterjik nöronlarında eksprese eder. Cre-Lox rekombinasyonu, hücrelerin DNA'sındaki belirli bölgelerde silmeleri, yerleştirmeleri, yer değiştirmeleri ve inversiyonları gerçekleştirmek için kullanılan bölgeye özgü bir rekombinaz teknolojisidir. DNA modifikasyonunun belirli bir hücre tipine hedeflenmesini veya spesifik bir harici uyarı tarafından tetiklenmesini sağlar. DREADD ekspresyonunun anatomik spesifikliğini sağlamak için, hedeflenen beyin bölgesindeki proteinleri ifade eden viral vektörlerin stereotaktik enjeksiyonunun yapılması gereklidir. Cre; iki Lox-p bölgesi arasında bölgeye özgü rekombinasyonu katalizleyen bir enzimdir (Şekil 4.5.2). DREADD'lerin genetik hedeflemesi için en yaygın kullanılan stratejiler, lokal olarak iletilen viral enjeksiyonlar ve genetik olarak tasarlanmış hayvan modellerinden ekspresyondur. DREADD eksprese eden viral vektörlerin stereotaktik olarak verilmesi anatomik olarak kısıtlanmış ekspresyona izin vermektedir. Cre içeren viral vektörler, DREADD kodlayan ve sadece cre içeren transfekte edilmiş hücrelerde gen ekspresyonuna neden olan “çift flokslu” genlerle oluşturulmaktadır. Viral yapıya bir floresan etiket eklenir ve hedeflenen hücre tipi ve beyin bölgesinde gen ekspresyonunun histolojik olarak doğrulanması sağlanmaktadır. Bu işlem için Cre ile indüklenebilen adeno asosiyasyon virüsleri (AAV) kullanılmaktadır. Clozapinin periton içinden uygulanmasıyla yaklaşık 45 dakika içinde, metabolize olmuş clozapin, kan beyin bariyerini aşarak DREADD ifade eden nöronları reseptör düzeyinde uyarmaktadır (114). Kemogenetik teknolojiler sayesinde, tasarlanmış bir proteinin yüksek ekspresyon seviyelerinin, kimyasal aktivasyon yokluğunda aynı etkiye sahip olma ihtimali olmaktadır (135). Bu yöntem ile, besin alımı ve iştah mekanizmalarının manipülasyonunda da etkili biçimde çalışılmaktadır.



Şekil 4.5.2. Cre-Lox Sistemi (16)

Enerji dengesi, iştah, tokluk, enerji harcanımını etkileyen hücre tipleri ve devrelerinin karmaşık etkileşimi ile düzenlenir. Bu nedenle DREADD'ler, iştahı düzenleyen nöroendokrin devrelerin hücre tipine özgü manipülasyonu için yaygın olarak kullanılmaktadır (136). Besin arama ve tüketim davranışını uyarmak için hM3Dq ile AgRP nöronlarının akut kemogenetik aktivasyonunun, uzun süreli hiperfajik etkiye neden olduğu bulunmuştur (137). AgRP nöronlarının hM4di tarafından inhibisyonunun ise aç hayvanlarda besin alımını hızla azalttığı bilinmektedir (138). Bu çalışmada, medial hipotalamusta, VGlut2–Cre hayvanlarda kemogenetik aktivasyon ile glutamaterjik hücrelerin uyarılmasının besin alımı ve davranışa etkisine bakılmıştır.

5. METOT

5.1 Deney Hayvanları

Tüm deneylerde yetişkin dişi ve erkek Slc17a6^{tm2(cre)Lowl} (kısa adıyla vGlut2-cre) (jax id:16963) faresi kullanılmıştır. vGlut2 dişi ve erkek fareleri C57BL/6 yabanıl fareleri ile çiftleştirilmiştir. Çalışmada 12 dişi, 12 erkek olmak üzere 24 fare kullanılmıştır. Deneyde kullanılacak vGlut2-cre faresi daha önce Jackson Laboratuvarlarından satın alınıp İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırma Merkezi (MEDİTAM) bünyesinde üretilip büyütülmüştür. Farelerin ad-libitum yiyecek ve suya ulaşımı sağlanıp, fare bakım odaları 22C de tutulmuştur. Fareler 12 saat karanlık 12 saat aydınlık döngüde barındırılmıştır. Hayvan deneyleri izni İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İMÜ-HADYEK) tarafından onaylanmıştır.

Tablo 5.1.1. Deney Hayvanları Dağılımı

Grup	Sayı (n)	Beslenme	Denek
SD grubu	12	Standart pelet yem	vGlut2-cre
YYD grubu	12	%60 yağlı yem	vGlut2-cre

5.2 Genotipleme ve DNA Eldesi

Annelerinin yanında yaşayan henüz süttten kesilmemiş 28-30 günlük fareler kulaklarından doku örnekleri toplanarak genotipleme yapılmıştır. Bunun için, yavrular İzofloran ile hafif anestezi altına alındıktan sonra sağ kulaklarına numaralı kulak küpesi takılıp yine aynı kulaktan delme pensi kullanılarak 1mm² çapında bir doku örneği alınmıştır. Alınan doku parçası 75ul alkali lizis tamponu (25mM NaOH/EDTA) içeren 0,2 ml lik PCR tüplerine konulmuştur. Tüpler 1 saat 98°C sıcaklıkta T100™ Thermal Cycler PCR cihazında kaynatılmıştır. Ardından üzerine 75 ul nötralizasyon tamponu (40 mM Tris/HCl) eklenmiştir. Pipetleme ve vortexleme işlemlerinin

ardından 4 dakika 4000rpm hızla santrifüj edilip, süpernatant 0,5 ml tüplere konulup - 20°C de muhafaza edilmiştir.

5.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

1X tampon çözeltisi içinde, 0,5 uM geri ve transgenik primer, 200 uM DNTP karımı, 1,25 unit Taq Polimeraz, DNA ve ddH₂O eklenerek toplamda 12 ul PZR karışımı hazırlanmıştır. Tüplerden birine DNA eklenmemiş, bu karışım negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Kullanılan primer dizileri aşağıda verilmiştir:

Tablo 5.3.1. Kullanılan Primer Dizileri

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

Hazırlanan PZR karışımı, aşağıda belirtilen protokol kullanılarak T100™ Thermal Cycler cihazında çoğaltılmıştır.

Tablo 5.3.2. PZR Protokolü

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

5.4 Agoroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme

100 ml 1X TAE tampon çözeltisine (40 mM Tris, 20 MM Glasiyal asisit asit, 1 Mm pH:7,6 EDTA) 2 gr agaroz eklenip çözülüp berraklaşınca dek mikrodalga fırında kaynatılmıştır. Kaynayan çözeltinin içine 5 ul safewiev eklenmiş ve yükleme tarakları takılmış elektroforez kasetine dökülmüştür. Jel donduktan sonra 1X TAE ile doldurulmuş elektroforez tankına yerleştirilmiş ve ardından her bir kuyucuğa 9 ul PZR ürünü 1 ul yükleme boyası ile karıştırılıp konulmuştur. Son olarakta, ilk kuyucuğa 5 ul DNA belirteci konulmuş ve 100 voltta 20 dakika yürütülmüştür. Yürütülen örnekler BioRAD ChemiDoc cihazında görüntülenmiştir. Çıkan bantlar yorumlanıp, farenin transgenik olup olmadığına karar verilmiştir.

5.5 AAV Virüs Üretimi

Plazmitler ve Stbl3 E.coli bakterileri Addgene firmasından temin edilmiştir. %4 LB agar çözeltisi hazırlanıp steril edilmiştir. Soğuyan karışıma 100 ul/ml antibiyotik eklenmiş ve LB agar, 10 cm plastik petri kaplarına dökülüp donması sağlanmıştır. Bakteriler, çoğaltılmak üzere petri kaplarına yayılıp 37C de inkübe edilmiştir. Ertesi sabah, oluşan tekli koloniler toplanarak, önceden hazır edilmiş %2 LB içeren sıvı besi yerine aktarılmıştır. 37C de 250 rpmde 18 saat boyunca bakteriler çoğaltılmıştır. 6000 rpm de 4C de 15 dakika santrifüj edilip süpernatant toplanmıştır. Bu işlemler ana vektör ve yardımcı vektörler için tekrar edilmiştir. Süpernatanttan elde edilecek DNA'lar Qiagen Endofree Plasmid Kit (Qiagen, 12362) ile izole edilmiş ve konsantrasyonları SpektraMAX cihazı kullanılarak belirlenmiştir.

Rekombinant AAV üretimi için özelleşmiş olan 293 AAV hücre hattı (Cell BioLabs, AAV-100), 10 cm petri kaplarına ekilmiş ve 37°C ve %5 CO₂ koşullarında inkübatörde büyütülmüştür. Hücreler %70-80 doluluk oranına ulaştığında transfeksiyon işlemi yapılmıştır. Ana vektör ve yardımcı vektörler Opti-MEM transfeksiyon medyum ve polietilenimin transfeksiyon ajanı steril tüpte karıştırılmıştır. Bu karışım hücrelerin üzerine eklenerek 72 saat boyunca 37°C de %5 CO₂ koşullarında inkübe edilmiştir. Ardından, hücreler toplanılarak 5 dakika 4°C 1100 rpm'de santrifüj edilmiş ve

süpernatant toplanmıştır. Elde edilen hücre çökeltisi NaCl, Tris (pH=8,0) içeren L steil liziz çözeltisi ile karıştırılmıştır. Hücreler sırasıyla kuru buz-%70 EtOH karışımında ve 37°C su banyosunda 3 kez 2şer dakika inkübe edilmiştir. Ardından hücreler 3 dakika sonikasyon işlemi yapılmıştır. Pürifikasyon için 1 mM MgCl₂ ve 250 U/mL Benzonase (Sigma E8263-25K) eklenen karışım 20 dakika 4°C 4000 rpm'de santrifüj edilmiştir. İçerisinde 10x PBS, 1M MgCl₂, 1M KCl, 5M NaCl, Iodixanol olan karışımdan %17lik, %25'lik, %40'lık ve %60'lık çözeltiler hazırlanmıştır. Sırasıyla %60lık, %40lık, %25lik ve %17,5luk çözeltiler hücre lizatının üzerine (Beckman 36625) şırınga ile yavaş yavaş damlatılmıştır. Optiseal ultrasantrifüj tüplerine konulan karışım (Beckman Coulter 36625) 6000rpm de 18°Cde 90 dakika santrifüj edilmiştir. Bu gradient sonunda istenilen virüs katmanı %40'lık çözelti içeren kısımda toplanmıştır. Önceden ısıtılmış 1 L'sinde 100 mL 10x PBS, 50 gr D-Sorbitol, 42,4 mL %5 NaCl içeren 1X saklama tampon çözeltisi, Amicon 100K filtreli kolonlardan (Milipore, UFC910024) geçirilmiş ve 3500 rpm de 4C de 30 dakika santrifüj edilmiştir ve bu işlem 2 kez tekrarlanmıştır. Bu işlem 1x saklama tampon çözeltisi eklenerek 2 defa daha tekrarlanmıştır. Toplanan virüsler -80C de saklanmıştır.

5.6 İntrakranial Virüs Enjeksiyonu

vGlut2-cre fareleri (6 haftalık) izofloran kullanılarak bayıltılıp stereotaksik enjeksiyon masasına alınmıştır (Acu-Rite Inc.). Fareler dişleri ve kulaklarından masaya sabitlendikten sonra kafa yüzeyindeki kıllar tıraş edilip, çalışılacak bölge bisturi ile açılmıştır. Kafatasına az miktarda hidrojen peroksit uygulanmış ve kemikler belirgin hale getirilmiştir. Ardından kafatası yüzeyi hidrojen peroksitin fazlalığından arındırılıp, SteREO Discovery V8 mikroskop altında makro ve mikro düzeydeki orantısızlıklar giderilip farenin kafasının mümkün olduğunca düz olması sağlanmıştır. Kafa yüzeyindeki lamda ve bregma noktalarından referans alınarak yer-yön ve yükseklik/yamukluk tayini yapılmıştır. Ardından hipotalamusun üst kısmına denk gelen kısımda, kafatasına bir diril yardımı ile (Strong 210) küçük delik açılmıştır. Mikromanipülatör (Narishige) kullanılarak virüsün medial hipotalamusa (bregma - 1.35 mm, orta hat 0.35 mm ve dorsal yüzey 5.70 mm) gitmesi sağlanmıştır. Sutter P-

1000 Mikropipet çekici ile cam mikropipetler ısı yardımıyla inceltilmiştir. İçine mikrofil ile (World Precision Instrument) ile mineral yağ doldurulan cam mikropipetler Narishge enjektöre takılmıştır. Beyne kademeli olarak 700ul virüs enjekte edilmiş ve geri sızmayı önlemek için 10 dakika beklenip yavaş yavaş geri çekilmiş ve bu işlem beynin sağ ve sol yarım küresi için de aynı şekilde yapılmıştır. Farelerin kafatası ve derisi temizlenip dikildikten sonra 0.3ml serum fizyolojik, karın içine enjekte edilip fare anesteziden çıkarılmıştır. Fareler iyileşme sürecine alınmıştır.

5.7 Yüksek Yağlı Beslenme

Yüksek yağlı diyetin medial hipotalamustaki glutamaterjik hücrelere ve davranışa etkisini araştırmak üzere deneklerin yarısı yüksek yağlı, yarısı standart yem ile beslenmiştir. 24 hafta boyunca uygulanan bu farklılık, 6 dişi 6 erkek fareye standart pelet yem, kalanına ise %60 yağlı yem verilerek sağlanmıştır. Davranış deneyleri sürecinde yüksek yağlı diyetle beslenen grup da standart pelet yeme geçirilmiştir. Çalışma boyunca bu iki grup beslenme geçmişlerine dayanarak, gruplar Standart Diyet (SD) ve Yüksek Yağlı Diyet (YYD) olarak adlandırılmıştır.

5.8 Glutamat Nöron Aktivasyonu

6 haftalık vGlut2-cre farelere intrakranial olarak enjekte edilen pAAV-EF1a-DIO-hM3D(Gq)-mCherry virüsü ile 14 gün süreyle medial hipotalamus bölgesindeki glutamat nöronları enfekte edilmiştir. DREADD-hM3Dq tasarlanmış G-protein reseptörüdür ve clozapine enjeksiyonu ile birlikte Gq uyarıcı sinyal yolağını aktive etmektedir. Operasyon sonrası iyileşme sürecinin sonunda fareler davranış deneyleri için tekli kafeslere alınmıştır. Farelerin bu kafeslere adaptasyonu için süre tanınmış, besin tüketimi takip edilerek stabil hale gelmesi beklenmiştir. Davranış deneyleri gündüz saatlerinde yapılacağı için gece/gündüz döngüleri ters çevrilmiş ve farelerin buna adaptasyonu için zaman tanınmıştır. Beslenme takibi, obje tanıma testi, açık alan testi ve glukoz tolerans testi deneyleri, kemogenetik araçlar ile glutamat nöron aktivasyonu sağlanarak uygulanmıştır.

5.9 Beslenme Takibi

Gündüz döngüsünde tüketilen besin miktarını ölçmek için farelerin saat 05.00 de besinleri alınmış, 16 saatlik açlığa maruz kalmıştır ve deney süresince besin erişimi bulunmamıştır. Plasebo gününde %0,9 NaCl + 5 mg/kg EtOH, deney günü ise clozapine enjekte edilmiş ve 30 dakika sonra standart pelet yem sunulmuştur. 2 saat boyunca besin tüketimi kaydedilmiştir.

Tablo 5.9.1. Besin Tüketim Kaydı İçin Uygulanan İntraperitoneal Enjeksiyonlar

Gün	Saat	i.p enjeksiyon
1	21.00	%0,9 NaCl + 5 mg/kg EtOH
3	21.00	Clozapine
5	21.00	Clozapine

Clozapine enjeksiyonu iki ayrı gün tekrarlanmış ve tüketilen yem miktarı kaydedilerek iki günün ortalaması alınmıştır.

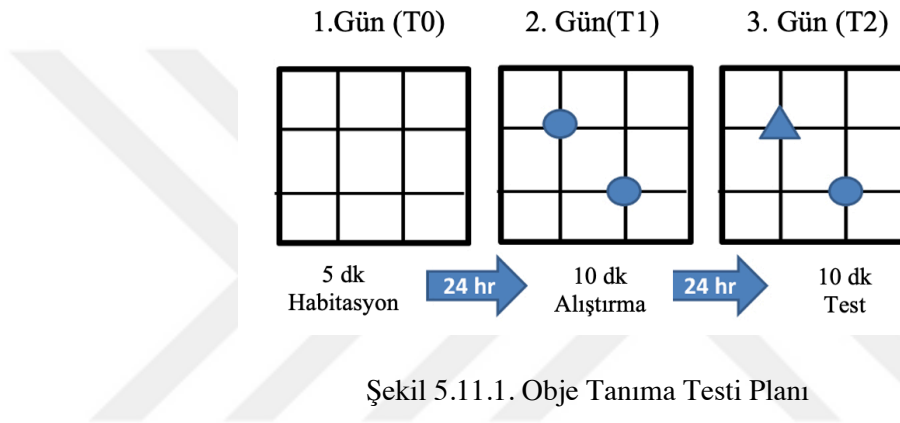
5.10 Açık Alan Testi

Açık alan testi, lokomotor aktivite, anksiyete, keşif davranışını ölçen bir davranış testidir. Çalışmada plasebo ve iki deney günü olmak üzere 3 gün boyunca 40x40 cm lik açık alanda her bir fare 10 dk tutulmuştur. Plasebo günü, deneyden 20 dk önce %0,9 NaCl + 5 mg/kg EtOH enjeksiyonu yapılmış, deney günlerinde ise deneyden 20 dk önce intraperitoneal clozapine enjeksiyonu yapılmıştır. Merkezde ve çevrede geçirilen zaman ve toplam alınan mesafe ANY-maze programı ile kaydedilmiştir.

5.11 Obje Tanıma Testi

Obje tanıma testi, farelerde öğrenme ve belleğin farklı fazlarını görece hızlı ve etkili ölçmeyi sağlayan bir davranış testidir. Test habitasyon, alıştırma ve test olmak üzere 3 aşamadan oluşmaktadır (Şekil 5.8.1). Alıştırma aşaması aynı iki objenin keşfini, test

aşaması ise önceki objelerden birinin kaldırılıp yerine yeni bir obje yerleştirilmesini içermektedir. Farelerin yeni olanı tercih etmeye eğilimlerinden dolayı, bir fare tanıdık olanı hatırlamakta ve yeni nesne ile daha fazla zaman geçirmektedir (139,140). Çalışmada obje tanıma testi için 40x40 cm ebatlarında kare, beyaz zeminli, pleksi deney düzeneği kullanılmıştır. İlk gün fareler habitasyon için 5 dk, deney düzeneği boş olarak bekletilmiştir. Ağıştırma aşamasında (T1) fareler bu düzenekte birinci gün aynı iki nesne ile, test günü (T2) nesnelerden birinin yerine yeni bir nesne ile 10 dk boyunca keşif için bekletilmiş ve nesnelerle geçirilen zamanlar analiz edilmiştir.



Her bir deney arasında deney düzeneği ve nesneler kokuyu yok etmek için %70 etanol ile dezenfekte edilmiştir. Deney 2 günden oluştuğu için, her iki gün de farelerin yarısına deneyden 20 dk önce %0,9 NaCl + 5 mg/kg EtOH enjeksiyonu, diğer yarısına ise deneyden 20 dk önce intraperitoneal clozapine enjeksiyonu yapılmıştır. Deney 2 tur şeklinde tekrarlanmış ve diğer turda enjeksiyonlar ters çevrilmiştir (Tablo 5.8.1).

Tablo 5.11.1. Obje Tanıma Testi İçin Uygulanan İntraperitoneal Enjeksiyonlar

Tur	Gün	i.p enjeksiyon
-	Habitasyon (T0)	-
1. tur	Ağıştırma (T1)	%0,9 NaCl + 5 mg/kg EtOH / CNO
	Test (T2)	CNO / %0,9 NaCl + 5 mg/kg EtOH
2. tur	Ağıştırma (T1)	%0,9 NaCl + 5 mg/kg EtOH / CNO
	Test (T2)	CNO / %0,9 NaCl + 5 mg/kg EtOH

5.12 Glikoz Tolerans Testi

Glikoz tolerans testinden 16 saat önce farelere besin kısıtlaması uygulanmıştır. 16 saatlik açlığın sonunda farelerin kuyruğuna bisturi ile kesik atılmıştır. Venöz kan, şeker ölçüm çubuğuna konulmuş ve şeker ölçüm cihazı ile ölçülmüştür. 30 dakika sonra farelere intraperitoneal olarak %0,9 NaCl + 5 mg/kg EtOH (plasebo günü) veya %0,9 NaCl + 5 mg/kg clozapine (deney günü) enjekte edilmiş ve kan şekerleri ölçülmüştür. Bu enjeksiyondan 30 dakika sonra intraperitoneal olarak 2 g/kg D-Glikoz (dekstroz) enjekte edilmiş ve kan şekeri ölçülmüştür. Kan şekeri ölçümü, 90, 120 ve 150. dakikalarda tekrarlanmıştır.

5.13 Doku Fiksasyonu ve Kesit Alma

Davranış deneylerinden sonra farelere, sırasıyla fosfat tamponlu tuz çözeltisi ve %4 paraformaldehit fiksatif (PFA) ile kardiyak perfüzyon yapılmıştır. Sakrifiye edilen farelerin beyinleri çıkartılmıştır. Beyinler önce 4°C'de 4 saat %4'lük PFA içinde, sonra 4°C'de 24 saat %30'luk sükröz çözeltisi içinde bekletilmiştir. 10 mL H₂O içine 0,4 g düşük donma sıcaklığına sahip agaroz katılmış ve çözelti berraklaşana kadar kaynatılmıştır. Beyinler fosfat tamponlu tuz çözeltisi ile yıkandıktan sonra bu çözelti içine gömülmüş ve jel kıvamına gelene kadar beklenmiştir. VT1000S vibratom ile 50 µm kalınlığında kesitler alınmıştır.

5.14 Mikroskopik Görüntüleme ve Analiz

Kesitler Zeiss LSM 780 Konfokal Mikroskopta, kırmızı ChR2 floresan proteinleri görüntülemek için 610 nm dalga boyunda görüntülenmiştir. Medial hipotalamusta glutamaterjik hücreleri transfekte olan deneklerin deneyleri değerlendirilmeye alınmıştır. Davranış deneyleri ANY-maze programı aracılığı ile kayıt altına alınmış ve analiz edilmiştir. İstatistiksel analizler Prism 6.0 (GraphPad) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, Student's t-test ile değerlendirilmiştir. Tüm değerler $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. $p > 0,05$; istatistiksel olarak anlamsız kabul edilmiştir. $p < 0,05$; *, $p < 0,01$; **, $p < 0,001$; *** olarak gösterilmiştir.

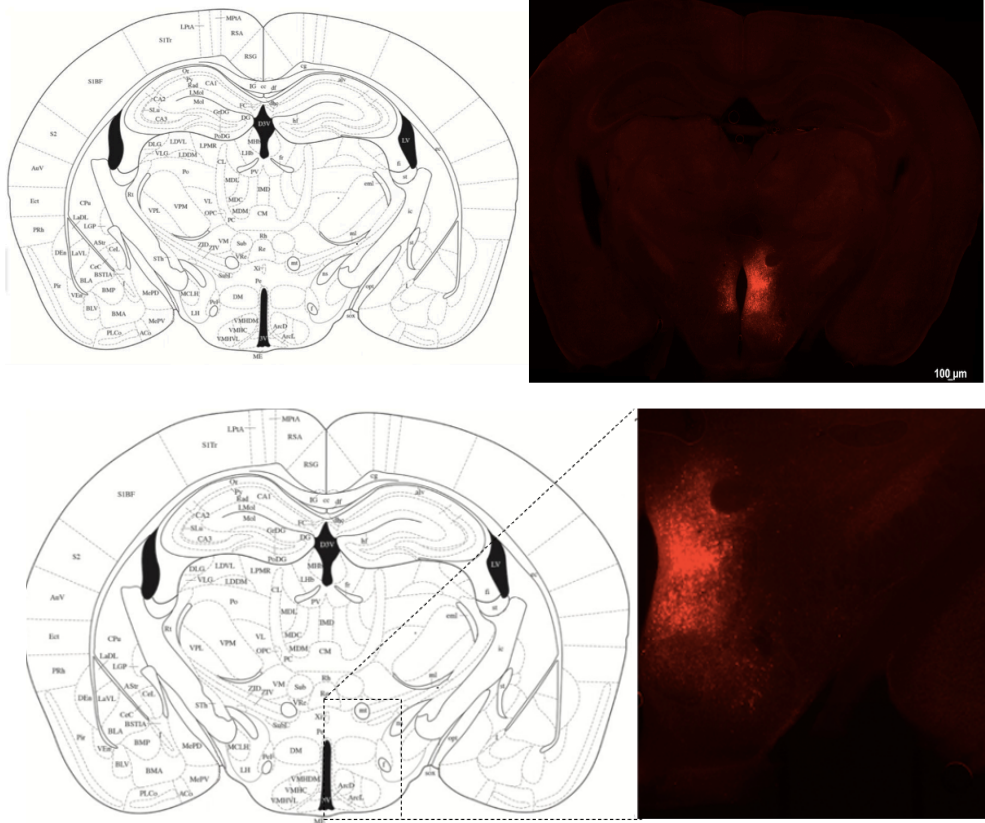
6- BULGULAR

6.1 Genotipleme

Yapılan deneylerde yalnızca 30 günlük VGlut2-cre transgenik fareler kullanılmıştır. Genotipleme sonucuna göre aynı batından doğan transgenik fareler aynı deneyler için kullanılmıştır. Farelerin hepsine 6 haftalıkken pAAV-EF1a-DIO-hM3D(Gq)-mCherry enjeksiyonu yapılmıştır. Transgenik olmayan fareler deneylere dahil edilmemiştir.

6.2 Mikroskopik Analiz

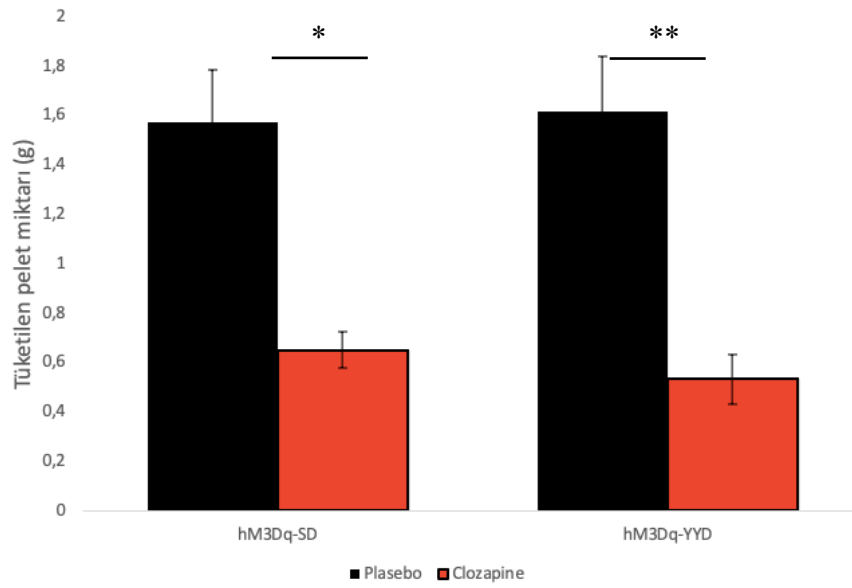
Deneylerin tamamlanmasının ardından deneklerin beyni çıkarılıp fikse edilerek enjeksiyonların tutarlılığı teyit edilmiştir. Tutarsız enjeksiyonlar tespit edilerek deney gruplarından çıkarılmıştır.



Şekil 6.2.1 pAAV-EF1a-DIOhM3D(Gq)-mCherry enjekte edilmiş Vglut2-cre farelerin medial hipotalamus bölgelerinde floresan görüntüleri

6.3 Besin Tüketimi

Glutamat nöronlarının kemogenetik aktivasyonunda besin tüketimindeki değişimi gözlemleyebilmek için intrakraniyal olarak pAAV-EF1a-DIO-hM3D(Gq)-mCherry enjekte edilmiş VGlut2-cre transgenik fareler davranış deneylerine alınmıştır. 16 saatlik açlığa maruz bırakılan fareler, gündüz döngüsünde deneye alınmış ve deney süresince besin erişimleri engellenmiştir. İntraperitoneal enjeksiyondan 30 dk sonra besin sunulmasıyla, besin tüketim ölçümü başlatılmıştır. Bu ölçümlere göre, Hm3dq-SD grubuna plasebo verilen günde besin tüketimi 1,57 g ($\pm 0,75$ g) olarak ölçülürken, glutamat aktivasyonunda besin tüketimi belirgin azalma göstererek 0,64g ($\pm 0,32$ g) olarak belirlenmiştir (Şekil 6.3.1).

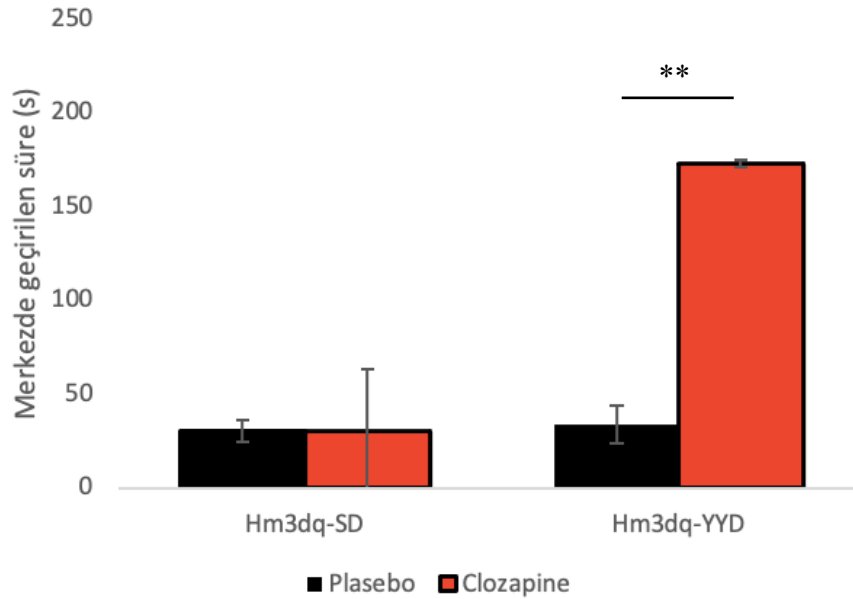


Şekil 6.3.1. SD ve YYD ile beslenen farelerde glutamat nöron aktivasyonunun 4 saatlik besin tüketimleri ortalamalarına etkisi

Clozapine verilen günlerdeki bu azalmanın, plasebo grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu hesaplanmıştır ($p < 0,05$). Hm3dq-YYD grubu fareleri de benzer şekilde, plasebo gününde 1,61 g ($\pm 0,66$ g), glutamat aktivasyonunda ise ortalama 0,53g ($\pm 0,23$ g) besin tüketmiştir ve bu azalmanın da istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p < 0,01$).

6.4 Açık Alan Testi

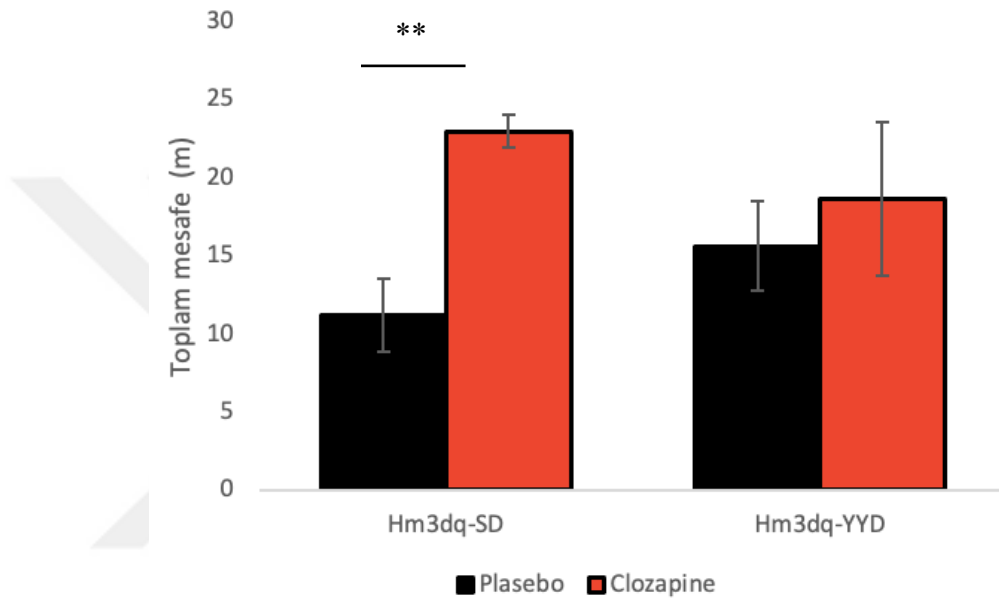
Fareler açık alan testi için deney düzeneğine alınmadan 20 dk önce, gündüz döngüsünde, bir gün intraperitoneal plasebo enjeksiyonu yapılmış, iki ayrı deney gününde ise clozapine enjeksiyonu yapılarak, bu iki günü ortalaması alınmıştır. Fareler merkezde geçirilen süre (s) açısından değerlendirildiğinde, Hm3dq-SD grubundaki farelerin plasebo gününde ortalama 30,5 s (± 32 s), glutamat aktivasyonunda ise benzer biçimde, ortalama 30,13 s ($\pm 5,2$ s) zaman geçirdiği bulunmuştur. Hm3dq-YYD grubundaki farelerde ise; plasebo gününde ortalama 33,9 s ($\pm 17,5$) zaman geçirirken, glutamat aktivasyonunda bu süre ortalama 172,7 s ($\pm 99,5$ s) e çıkmıştır (Şekil 6.4.1). Hm3dq-YYD grubunda glutamat aktivasyonu ile görülen bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,01$).



Şekil 6.4.1. SD ve YYD ile beslenen farelerde glutamat nöron aktivasyonunun açık alan testinde merkezde geçirilen süreye etkisi

Açık alan testinde toplam alınan mesafe (m) analizlerine göre, Hm3dq-SD grubunda plasebo gününde toplam alınan mesafe ortalama 11,2 m (± 9 m) iken, glutamat aktivasyonunda bu mesafe 23 m ($\pm 15,4$ m) ye yükselmiştir (Şekil 6.3.2). Glutamat aktivasyonu ile oluşan bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,01$). Bu artış, yüksek

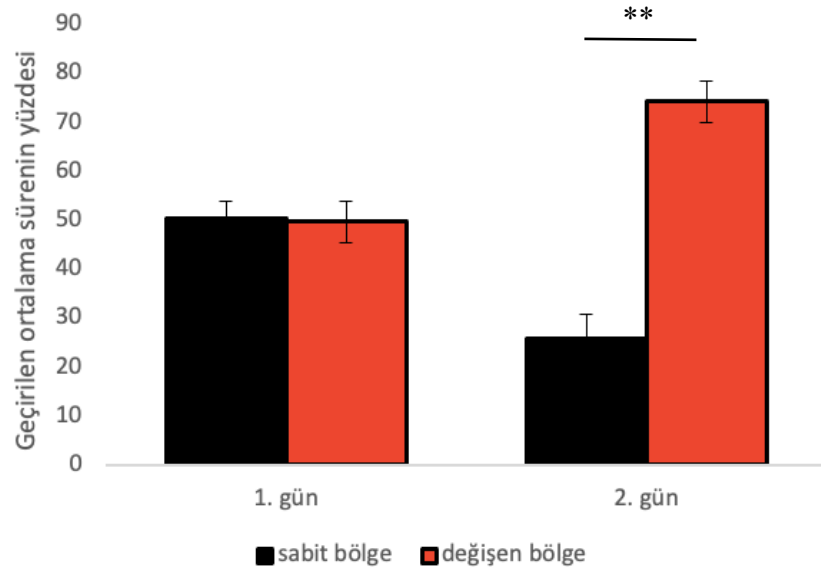
yağlı beslenme durumunda ortadan kaybolmuş ve; Hm3dq-YYD grubunda plasebo gününde toplam mesafe ortalama 15,6 m (± 7 m), glutamat aktivasyonunda ise ortalama 18,63 m (± 3 m) olarak bulunmuştur. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Her iki enjeksiyonda YYD ve SD grupları kendi içinde kıyaslandığında gruplar arası farkın da istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p>0,05$).



Şekil 6.4.2. SD ve YYD ile beslenen farelerde glutamat nöron aktivasyonunun açık alan testinde toplam alınan mesafeye etkisi

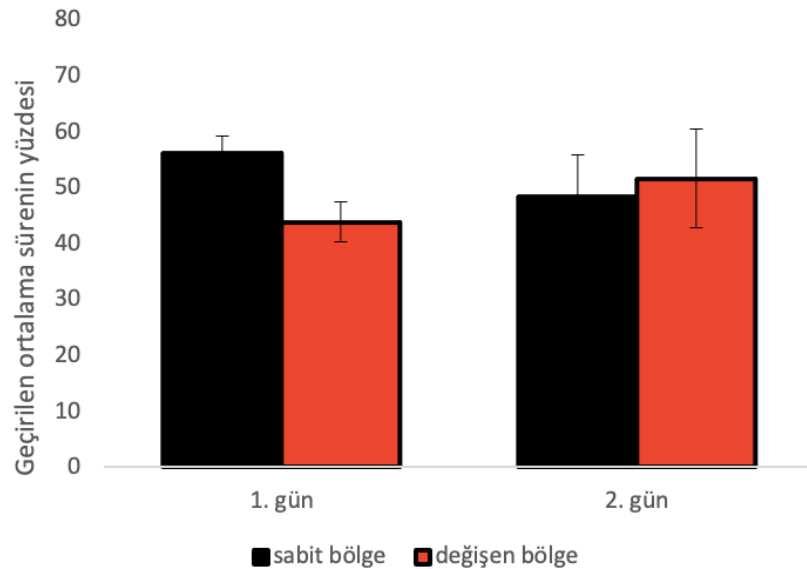
6.5 Obje Tanıma Testi

Obje tanıma testi farklı zamanlarda gerçekleştirilen 2 turdan oluşmuştur. Testte kullanılan iki objeyi ayırt etmek için; objelerin bulundukları bölgelere “sabit” ve “değişen” olarak isim verilmiştir. Değişen bölgede ilk gün sabit bölgedeki ile aynı nesne bulunmakta, ikinci gün ise yeni nesne yer almaktadır. 1. turda clozapine enjeksiyonu yapılmamıştır. Hm3dq-SD grubu, birinci gün toplam vaktinin %50,3ünü değişen bölgede geçirirken, ikinci gün değişen bölgede geçirdiği süre toplam sürenin %74,1i olarak analiz edilmiştir (Şekil 6.5.1). Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,01$).



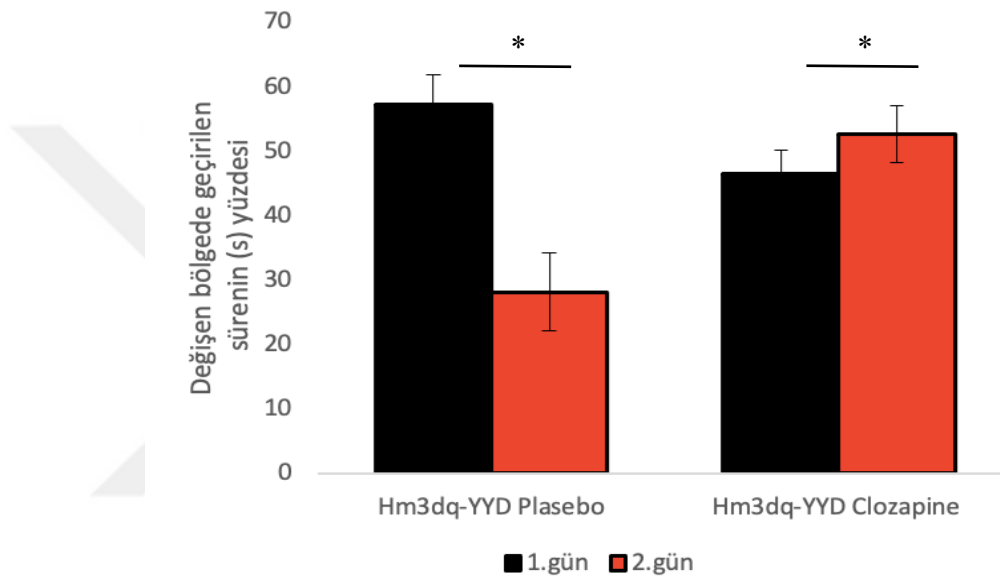
Şekil 6.5.1. Hm3Dq-SD grubu; obje tanıma testinde sabit ve değişen bölgelerde geçirilen sürenin yüzde dağılımının iki gün arasında kıyası

Hm3dq-YYD grubunda ise bu artış ortadan kalkmış ve birinci gün değişen bölgede toplam vaktinin %48,8 ini geçirirken, ikinci gün bu oran %51 olarak bulunmuştur (Şekil 6.5.2). İkinci gün SD ve YYD gruplarının değişen bölgede geçirdikleri ortalama sürelerin yüzdeleri kıyaslandığında iki grup arasındaki farkın anlamlı olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$).



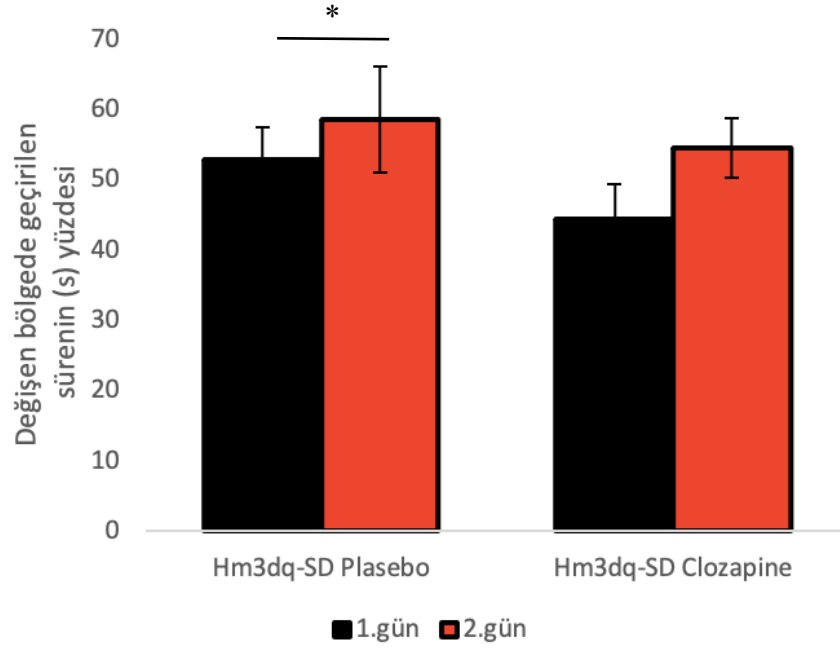
Şekil 6.5.2. Hm3Dq-YYD grubu; obje tanıma testinde sabit ve değişen bölgelerde geçirilen sürenin yüzde dağılımının iki gün arasında kıyası

İkinci turda, YYD grubundaki fareler plasebo enjeksiyonunda, 1. gün değişen bölgede toplam sürelerinin %57($\pm 12,8$) sini geçirirken, ikinci gün bu süre toplam sürenin %28 ($\pm 17,2$)ine düşmüştür. İki gün arasındaki bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). YYD grubunda glutamaterjik hücrelerin aktive edilmesiyle 2. gün değişen bölgede geçirilen ortalama süre %52,5 ($\pm 12,4$) e yükselmiştir. Clozapine enjeksiyonu ile ortaya çıkan bu yükselme istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$).



Şekil 6.5.3. Hm3Dq-YYD grubunda glutamat aktivasyonunun değişen bölgede geçirilen süreye etkisi

SD grubunda plasebo enjeksiyonunda değişen bölgede geçirilen süre birinci gün %58 ($\pm 16,7$) iken ikinci gün %63 ($\pm 30,4$) e çıkmıştır. Kontrol enjeksiyonundaki bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Clozapine enjeksiyonu gününde ise, değişen bölgede birinci gün toplam sürenin %46,5 ($\pm 18,1$) ini geçirmiş, ikinci gün bu süre %56,8 ($\pm 10,6$) e çıkmıştır (Şekil 6.5.4). Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).



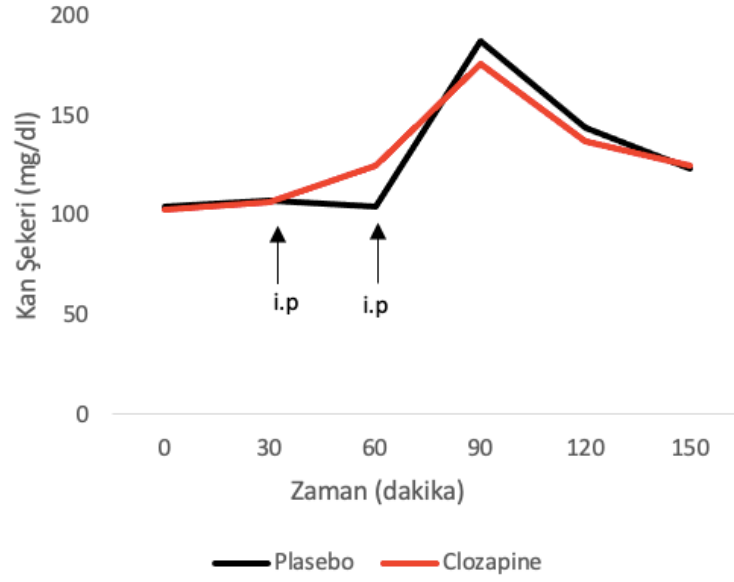
Şekil 6.5.4. Hm3Dq-SD grubunda glutamat aktivasyonunun değişen bölgede geçirilen süreye etkisi

6.6 Glikoz Tolerans Testi

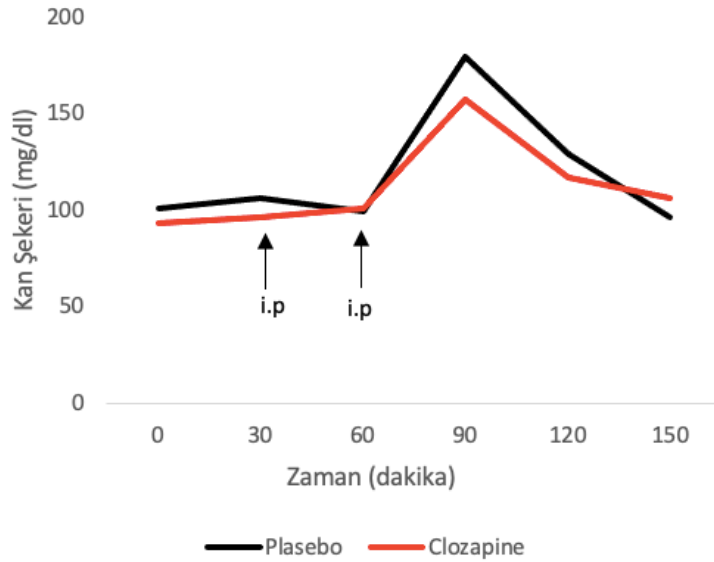
pAAV-EF1a-DIO-hM3D(Gq)-mCherry enjekte edilmiş fareler glikoz tolerans testi için 16 saat açlığa maruz bırakılmıştır. Farelerin deney süresince besine erişimleri engellenmiştir. Farelerin kuyruklarından bisturi yardımıyla oluşturulan kesikten 30 dakika arayla venöz kan alınmaya başlanmıştır. İlk 30 dakikanın başında kan şekeri ölçümü yapılmadan hemen önce, farelere intraperitoneal olarak plasebo veya Clozapine enjekte edilmiştir. İkinci 30 dakikanın başında ise yine kan şekeri ölçümü yapılmadan hemen önce 2 g/kg konsantrasyonunda dekstroz enjekte edilmiştir. Kan şekeri ölçümüne 150. dakikaya kadar devam edilmiştir.

Buna göre, SD grubunda; dekstroz enjeksiyonundan sonra kan şekeri plasebo verilen günde ortalama 187,7 mg/dl ($\pm 14,91$ mg/dl), clozapine verilen günde 176 mg/dL (12,4 mg/dL) seviyesine ulaşmıştır. Hm3Dq-YYD grubunda ise, plasebo gününde kan şekeri ortalama 179,9 mg/dl (± 30 mg/dl), clozapine gününde ise ortalama 157,5 mg/dl

($\pm 20,7$ mg/dl) olarak bulunmuştur. 120. dakikada her iki grubun kan şekeri orantılı olarak azalmaya başlamıştır (Şekil 6.6.1, Şekil 6.6.2). Her iki grupta da glutamat aktivasyonu kan şekerini düşürmüş görünse de, glutamat aktivasyonu ile gerçekleşen bu düşüşte istatistiksel olarak anlamlılığa rastlanmamıştır ($p > 0,05$).



Şekil 6.6.1. Hm3Dq-SD grubunda glutamat aktivasyonu durumunda glikoz tolerans testine bağlı kan şekeri değerleri



Şekil 6.6.2. Hm3Dq-YYD grubunda glutamat aktivasyonu durumunda glikoz tolerans testine bağlı kan şekeri değerleri

7. TARTIŞMA

Aşırı kilo ve obezite son 30 yılda dünya çapında dramatik biçimde artış gösteren bir salgın haline gelmiş durumdadır (141). Her yıl en az 2.8 milyon insan obeziteye bağlı sebeplerden ölmekte, obezite dünyada ölüm sebepleri arasında beşinci sırada gelmektedir. Obezite, vücut fonksiyonlarının neredeyse hepsini etkileyen ve toplum sağlığını tehdit eden ciddi bir sağlık sorunudur. Diyabet, kalp hastalıkları, kanser çeşitleri, iskelet kas hastalıkları, zihinsel sağlık gibi pek çok hastalık için risk faktörüdür ve yaşam kalitesinde azalmaya neden olmaktadır (142,143). Obezite alınan enerji ve harcanan enerji arasındaki dengesizlikten kaynaklanır ve vücutta enerji dengesini sağlayan anahtar beyin bölgesi hipotalamustur. Hipotalamus, vücut sıcaklığı, büyüme, onarım, su dengesi, duygusal davranışlar, besin alımının düzenlenmesi gibi çok sayıda hayati fonksiyon için önemli bir beyin bölgesidir (144). Sağlık için bu denli önemli bir risk faktörü olan obezitenin önlenmesi ve tedavi yöntemleri geliştirilmesi için uzun yıllardır çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmalarda enerji dengesini düzenleyen, besin alımını artıran ve azaltan nöral ağların daha detaylı anlaşılması oldukça önemli bir yere sahiptir.

Hipotalamusun en temel fonksiyonu enerji homeostazıdır ve bu fonksiyon hipotalamusun özel çekirdekleri, nöral sinyalleme yolları, çekirdeklerden eksprese edilen reseptörler ve nörotransmitterler aracılığıyla sağlanmaktadır (145). Özellikle hipotalamusun belirli alanları, beslenme davranışını kontrol etmektedir. Eski çalışmalar VMH in iştahı baskıladığını (4), LHA nın iştahı arttırdığını göstermektedir (3). Özellikle medial hipotalamusun enerji dengesi ve besin alımı mekanizmalarında önemli rolü bulunmaktadır. Medial hipotalamus; arkuat, VMH, DMH, anterobasal ve PVN i içeren tuberal hipotalamusu kapsamaktadır. Hipotalamusun beslenme regülasyonundaki rolü ile ilgili çalışmalar çoğunlukla arkuat çekirdekteki AgRP ve POMC hücreleri üzerine odaklanmaktadır. Fakat son yıllardaki çalışmalar özellikle glutamaterjik nöronların enerji dengesinde önemli rol oynadığını göstermektedir (5). Hipotalamustaki sinaptik aktivitenin çoğu glutamat ve GABA dan oluşmaktadır (68). İmmunohistokimyasal çalışmalarla çok sayıda hipotalamik glutamaterjik nöronun sinaptik veziküllerdeki varlığı bilinmektedir. Ayrıca elektrofizyoloji çalışmaları,

glutamat reseptör antagonisti uygulanarak hipotalamik nöronların aniden baskılanması ve uyarılmasını sağlayarak glutamatın hipotalamustaki majör fonksiyonunu kanıtlamıştır (64). VMH nöronları çoğunlukla glutamaterjiktir ve VGlut-2 kodlayan mRNA ekspresyonu yüksek seviyede bulunmaktadır (65). Medial hipotalamusun glutamaterjik nöronlardan zengin olması, fizyolojik ve davranışsal yanıtların kontrolünde önemli rol oynadığını göstermektedir. Yapılan lezyon çalışmaları özellikle VMH'nin doygunluk merkezi olduğunu, elektriksel uyarım ile aktivasyonların yemeyi baskıladığını göstermiştir (24). Bu teknikler, şu anki bilgilerin temelini oluşturmada önemli yer edinmekle birlikte, kalıcı hasar vermeleri ve spesifik olmamaları nedenleriyle yetersiz kalmaktadır. Kemogenetik aktivasyon yöntemi, geri dönüşlü, akut, invaziv olmayan ve spesifik stimülasyon sağlayan bir yöntem olarak bu eksikliği kapatmaktadır (16). Bu nedenle çalışmada medial hipotalamustaki glutamaterjik nöronların davranışa etkisini araştırmak için kemogenetik aktivasyon yöntemi kullanılmıştır.

Medial hipotalamustaki glutamaterjik hücrelerin besin alımı üzerine etkilerini test etmek üzere; bu hücrelerin kemogenetik aktivasyonu ile besin alımı arasındaki ilişkiyi ölçen besin tüketimi deneyi yapılmıştır. Besin tüketimi deneyinde, intrakraniyal olarak pAAV-EF1a-DIO-hM3D(Gq)-mCherry enjekte edilmiş VGlut2-Cre transgenik farelerde, 16 saatlik açlıktan sonra intraperitoneal clozapine enjeksiyonu ile medial hipotalamus bölgesinde glutamaterjik hücrelerin aktivasyonu sağlanmıştır. Deney bulgularına göre, hem SD hem YYD ile beslenen farelerde glutamat aktivasyonunun beslenmeyi belirgin biçimde baskıladığı bulunmuştur. Literatürde medial hipotalamustaki glutamaterjik hücrelerin yemeye etkisini belirleyen spesifik nörostimülasyon çalışması bulunmamakla birlikte, yakın zamanda arkuat çekirdekte VGlut2 nöronları ile yapılan bir çalışmada; bu nöronların kemogenetik aktivasyonunun, POMC nöronlarına göre daha hızlı bir anoreksijenik etkiye neden olduğu gösterilmiştir (8). Ayrıca ratlarla yapılan eski çalışmalarda basomedial hipotalamik lezyonunun, obeziteye neden olduğu gösterilmiştir (22). VMH'nin ventrolateral bölgelerindeki göreceli lezyonların da kilo alımında etkili olduğu bulunmuştur (23). Eski lezyon çalışmalarının da desteklediği bu bulgular medial

hipotalamustaki glutamaterjik aktivasyonun anoreksijenik bir etkiye neden olduğunu göstererek, sonuçlarımızla tutarlıdır.

Beslenme enerji ihtiyacının karşılanması için gerçekleştirilen fizyolojik bir eylemdir. Fakat fizyolojik etkilerin yanı sıra bilişsel, somatik ve otonom faktörler de beslenmenin düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır. Örneğin beslenmenin içeriği öğrenme ve bellek gibi bilişsel süreçlere etki etmekte, enerji harcanması ve korunumu arasındaki denge için fiziksel aktivite ve somatik faaliyetleri etkilemekte, kan şekerindeki değişimler aracılığıyla metabolik ve otonom sonuçları olmaktadır. Çalışmamızda medial hipotalamus glutamat hücrelerinin aktivasyonunun beslenme üzerindeki baskılayıcı etkisinin sebebi bilişsel, somatik ve otonom faktörleri ele alarak araştırılmıştır. Bilindiği üzere sinaptik plastisitedeki rolünden dolayı glutamat, öğrenme ve bellek gibi kognitif fonksiyonlarda önemli işlev görmektedir (60). Çalışmada glutamatın bilişsel etkilerinden yola çıkılarak, medial hipotalamus bölgesindeki kemogenetik glutamat aktivasyonunun bellek üzerine etkisini araştırmak üzere obje tanıma testi kullanılmıştır.

Obje tanıma testi bulgularına göre, SD ile beslenen farelerde herhangi bir enjeksiyon yapılmadığında, beklendiği gibi farelerin yeni nesneye ilgilerinden dolayı ikinci gün değişen bölgede geçirdikleri süre artmıştır. Bu farelerde glutamat aktivasyonu ise, ikinci gün değişen bölgede geçirilen sürede herhangi bir değişime neden olmamıştır. Literatürde obje tanıma testiyle ilgili var olan bilgiler, farelerin yeni olanı tercih etmeye eğilimlerinden dolayı yeni nesne ile daha fazla zaman geçirdiğini göstererek bulgumuzu desteklemektedir (139,140).

Medial hipotalamus glutamaterjik sisteminin uyarılmasının kognitif fonksiyonlarda nasıl bir değişikliğe yol açtığının daha iyi irdelenebilmesi bakımından yüksek yağlı diyetle beslenen hayvanlarda çalışma tekrarlanmıştır. Günümüzde obezitenin yaygınlığının sebeplerinin başında yüksek yağlı yiyeceklerin günlük diyet gereğinden fazla bulundurulması gelmektedir. Doymuş yağdan zengin işlenmiş yiyecekler gelişmiş ülkelerin besin alımlarının büyük kısmını oluşturmakta, obezitenin yaygınlaşmasında ve obezite kaynaklı sağlık sorunlarında önemli rol oynamaktadır.

Yüksek yağlı diyet ile beslenen insanlarda obezite, kardiyovasküler hastalıklar, tip2 diyabet, hipertansiyon gibi kronik sistemik hastalıklar daha sık görülmektedir (149). Uzun dönemde, yüksek yağlı beslenmek beyin sağlığı dahil tüm vücudun homeostazını bozmaktadır. Yapılan çalışmalar, yağlı yiyeceklerden zengin bir diyet tüketmenin hipokampus hacminde azalmaya, bellek, psikomotor yeterlilik, dikkat gibi kognitif fonksiyonlarda bozulmaya, depresyon ve anksiyeteye yatkınlığın artmasına neden olduğunu göstermektedir (150). Yağlı ve lezzetli yiyeceklerin beyinde oluşturduğu ödül yanıtı, vücut ağırlığını kontrol eden homeostatik sinyalleri yok saymakta bu da doyumluğa rağmen yemeyi durduramamaya neden olmaktadır (36). YYD ile beslenen hayvanlarda, hipotalamusta homeostatik enerji sinyallerinin hiperfajiyi durdurmada yeterli olmadığı gösterilmiştir (38). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, yüksek yağlı bir diyetin enerji dengesinin hipotalamik kontrolü ve hipotalamik disfonksiyon üzerindeki etkisiyle ilgili bir dizi mekanizma ortaya çıkarılmıştır (48). Farelerde YYD, insanlarda diyete bağlı obeziteyi modellemek için yaygın olarak kullanılmaktadır (151). Uzun süreli yüksek yağlı beslenmenin farelerde kognitif fonksiyonları etkilediği, obezite ve diyabetle ilgili patolojilere neden olduğu bilinmektedir (152).

Çalışmada YYD'in bilişsel işlevlere negatif etkisi olacağı ve glutamat aktivasyonunun bu etkiyi tersine çevirebileceği hipotez edilmiştir. Farelerin yarısı, deneylere başlamadan, 24 hafta boyunca %60 yağlı yem ile beslenmiştir. Deneyler başladığında fareler standart pelet yeme geçirilmiştir. Kronik YYD geçmişli olan fareler ile SD geçmişli olan fareler deneylere alınmıştır. Obje tanıma testinde, YYD grubu farelerde herhangi bir enjeksiyon yapılmadığında, değişen bölge ve sabit bölgede geçirilen süre arasında fark bulunmamıştır. Farelerin eski nesneyi hatırlayıp, yeni nesneye ilgileri beklenirken bu farkın gözlenmemiş olması, YYD'in belleği bozduğunu göstermiş ve hipotezimizle uyumlu bulunmuştur. Daha önce yapılan çalışmalarda farelerde YYD ile beslenmenin obje tanıma testine etkileri ele alınmıştır. Kısa ve uzun dönem YYD ile beslenmenin etkilerine bakılan bir çalışmada, 2,3 ve 4 ay boyunca %60 yağlı diyetle beslenmenin obje tanıma testinde bozulmalara neden olduğu bulunmuştur (153) . Çalışmamıza benzer biçimde 21 hafta boyunca YYD ile (%40 yağlı) beslenen farelerde obje tanıma testi sonuçlarına göre bellekte bozulma bulunmuştur (104).

Başka bir çalışmada 23 hafta boyunca %60 yağlı diyet ile beslenmenin, obje tanıma testinde bir fark oluşturmadığı, fakat hipokampüse bağlı objenin lokasyonu belleğinde bozulma olduğu bulunmuştur (154). Literatürdeki çalışmaların haftalarca ya da aylarca yüksek yağlı beslenmenin bellekte bozulmalara neden olduğunu gösterdiği bilinmektedir (155). Bu çalışmalar yüksek yağlı beslenmenin belleğe olumsuz etkisini gösteren obje tanıma testi bulgularımızı desteklemektedir.

Obje tanıma testinde, glutamat aktivasyonun etkisini belirlemek için, farelere deney düzeneğine alınmadan 20 dk önce plasebo ya da clozapine enjeksiyonu yapılmıştır. Hm3Dq-YYD grubunda plasebo enjeksiyonunda, ikinci gün değişen bölgede geçirilen süre birinci güne göre anlamlı biçimde azalmıştır. Bu azalma, yukarıda bahsedildiği gibi yüksek yağlı beslenmenin bilişsel fonksiyonlara verdiği zararlarla ilişkilendirilebilmektedir. Bu farelere clozapine enjekte edildiğinde, ikinci gün değişen bölgede geçirilen sürede artış meydana gelmiştir. Bu artış, farelerin birinci günkü nesneyi hatırladıklarını, yeni nesneyi eski nesneden ayırt etme yetilerinin arttığını düşündürmektedir. Plasebo enjeksiyonu YYD ile bellekte bozulma olduğunu doğrulamış, clozapine enjeksiyonunda değişen bölgede geçirilen süredeki artış ise, glutamat aktivasyonunun bu bozulmaya tersine bir etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Yüksek yağlı beslenmek, obje tanıma testinde bozulmaya, medial hipotalamus glutamaterjik hücrelerin kemogenetik aktivasyonu ise bu bozulmayı iyileştirmeyi sağlamaktadır.

Literatürde var olan çok sayıda çalışma, hipotalamusun öğrenme ve bellek gibi kognitif fonksiyonlarda önemli işlevi olduğunu göstermektedir (156–160). Örneğin hipotalamik oreksin nöronlarının asosiyatif öğrenme ve mekânsal bellekte rol oynadığı bilinmektedir. Yeni veya tanıdık objelere yanıt davranışında hipotalamik aktivitenin önemli olduğu son yıllarda yapılan yeni bir çalışma ile bilinmektedir. Bu çalışmada hipotalamustaki MCH nöronlarının optogenetik inhibisyonunun, obje hatırlama ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızın bulguları, hipotalamik nöronlar ve belleğin nesne ilişkili dinamikleri hakkındaki görüşü desteklemektedir. Hipotalamusta diğer nöron gruplarıyla yapılan çalışmalar (159,161–163), hipotalamik sinyallerin bellek üzerindeki önemli etkisini göstermekle birlikte, literatürde hipotalamustaki

glutamaterjik hücrelerin bellek üzerindeki etkisini gösteren spesifik aktivasyon çalışması bulunmamaktadır.

Medial hipotalamus glutamat hücrelerinin kognitif, somatik, otonom etkilerini araştıran çalışmamızda, somatik etkileri araştırmak üzere farelere açık alan testi uygulanmıştır. Açık alan testi, farelerde keşif davranışını, lokomotor faaliyet ve anksiyeteyi ölçen ve en sık kullanılan davranış testidir. Testte, toplam alınan mesafe ve merkezde geçirilen süre olarak iki temel ölçüm elde edilmektedir. Açık alan testinde, obje tanıma testinde fark oluşturan yüksek yağlı beslenmenin ve glutamat aktivasyonunun anksiyete ve lokomotor davranışa etkisi araştırılmıştır. Fareler açık alan testine alınmadan 20 dk önce plasebo veya clozapine enjeksiyonu yapılmıştır.

Denekler toplam alınan mesafe açısından değerlendirildiğinde, glutamat aktivasyonunun SD grubunda lokomotor aktiviteyi artırdığı bulunmuştur. Öte yandan glutamat aktivasyonunun lokomotor aktiviteye olan bu artırıcı etkisi, YYD ile beslenme sonucunda ortadan kalkmıştır. Literatürde var olan çalışmalar, YYD ile beslenmenin lokomotor aktivitede azalmaya neden olduğunu göstermektedir (164). Mediobasal hipotalamusun lokomotor aktivitede rol oynadığı, bu bölgenin lezyonunun lokomotor aktiviteyi azalttığı bilinmektedir (165). DMH'a glutamat enjeksiyonunun, ratlarda lokomotor faaliyeti başlattığı bulunmuştur (166) . Çalışmamızın bulguları, medial hipotalamus glutamaterjik hücrelerinin lokomotor aktivite için önemli olduğunu ve yüksek yağlı beslenmenin bu aktivitede bozulmaya neden olduğunu göstermiştir.

Açık alan testinin bir diğer bulgusuna göre; SD grubunda merkezde geçirilen süre glutamat aktivasyonu ile herhangi bir değişikliğe uğramamış fakat YYD grubunda glutamat aktivasyonu merkezde geçirilen süreyi belirgin olarak artırmıştır. Açık alan testinde merkezde geçirilen süre, merkezin kenarlara göre daha tehdit edici algılanmasından dolayı anksiyete ile ilişkilendirilmektedir (167). Normal beslenen farelerde glutamat aktivasyonu risk almayı sağlayan bir etkiye sahip değilken, yüksek yağlı beslenen farelerde glutamatın aktive olmasıyla fareler için riskli bir davranış olarak yorumlanabilen merkezde zaman geçirme süreleri artmıştır. Bu sonuç, yüksek

yağlı beslenmenin glutamaterjik nöronlar üzerinde bir etki doğurduğunu göstermektedir. Yüksek yağlı beslenme durumunda glutamatın aktive olması farelerde risk almaya neden olmuştur. Kronik olarak yüksek yağlı beslenme geçmişine sahip olan farelerde medial hipotalamus glutamaterjik hücrelerin kemogenetik aktivasyonu anksiyeteyi baskılayıcı bir etki göstermiştir.

Literatürde yüksek yağlı beslenmek, açık alan testinde anksiyete davranışları ile ilişkilendirilmektedir. Yüksek yağlı beslenmenin anksiyeteye etkisini araştıran bir çalışmada, YYD ile beslenen farelerin düşük yağlı beslenen gruba göre, açık alan testindeki lokomotor aktivitesinin daha düşük olduğu bulunmuştur (168). Başka bir çalışmada 10 hafta yüksek yağlı beslenen sıçanlarda, açık alan testinde anksiyete ilişkin davranışlarda artış bulunmuştur (169). Çalışmamızın bulguları yüksek yağlı beslenme ile anksiyete davranışı arasında bir ilişki göstermemiştir. Fakat yüksek yağlı beslenme durumunda glutamaterjik aktivasyonun, anksiyeteyi baskılayıcı bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Bu durum YYD ye bağlı anksiyetenin glutamaterjik yolağın baskılanması ile ilgili olabileceğini düşündürmektedir. Bu etkinin hangi bağlantılarla gerçekleştiği araştırma konusudur.

Medial hipotalamustaki glutamaterjik nöronların aktivasyonunun kan şekeri üzerine etkisini değerlendirmek için yapılan glikoz tolerans testinde SD ve YYD gruplarının her ikisinde de clozapine enjeksiyonunun kan şekerinde anlamlı bir farka neden olmadığı bulunmuştur. Literatürde medial hipotalamusun glikoz homeostazı için önemini gösteren çalışmalar mevcuttur. Özellikle VMH glukoz ile uyarılan ve inhibe edilen nöronlar içermektedir. Tong ve arkadaşları, insülin kaynaklı hipoglisemiye karşı düzenleyici yanıtta VMH teki glutamaterjik nöronların rolünü göstermiştir. Glutamatın sinaptik salımı için gerekli olan VGLUT tan yoksun fareler, özellikle SF1 nöronlarında, vücut ağırlığında artış ve hipoglisemiye karşı düzenleyici yanıtta bozulma olduğu bulunmuştur (7).

8- SONUÇ

Medial hipotalamus bölgesi, içerdği çekirdekler ve nöron grupları ile besin alımının düzenlenmesinde önemli role sahiptir. Bu bölgede en yaygın nörotransmitter olan glutamat ile yapılan spesifik nörostimulasyon çalışması bulunmamakta, bu hücrelerin beslenme ve davranış üzerine işlevi spesifik olarak bilinmemektedir. Bu çalışmada medial hipotalamus bölgesinde en yaygın bulunan nörotransmitter olan glutamatın beslenmeye ve davranışa etkisi araştırılmıştır. Araştırma bulguları, bu bölgedeki glutamat hücrelerinin kemogenetik aktivasyonun beslenmeyi baskıladığını göstermiştir. Medial hipotalamustaki glutamaterjik hücrelerin beslenmeyi baskılayıcı etkisinin hangi projeksiyonlar üzerinden gerçekleştiği ise araştırma konusudur. Medial hipotalamusun farklı alt çekirdeklerindeki glutamat hücrelerinin işlevini tespit etmek için spesifik çalışmalar yapılmalıdır. Öte yandan glutamatın yaygın bulunan bir nörotransmitter olması bölge spesifik çalışmalar için dezavantaj olabilmektedir.

Obje tanıma testi bulguları uzun süre yüksek yağlı beslenmenin belleğe olumsuz etkilerini göstermiştir. Medial hipotalamus bölgesindeki glutamat hücrelerinin kemogenetik olarak aktive edilmesinin bu bozulmayı tersine çevirebilecek bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Çalışmamız, bu bölgedeki glutamaterjik hücrelerin bellek üzerine etkisini göstermesiyle yeni ve özgün bir bakış açısı getirmiştir. Medial hipotalamustaki glutamat hücrelerinin hangi tür bellek üzerine nasıl etki ettiği araştırma konusudur. Bu bulgular, bahsedilen bölgenin beslenmeyle ilişkisinden yola çıkılarak beslenme belleği ile ilgili yapılacak araştırmalar için ışık olacak niteliktedir. Açık alan testi bulguları, medial hipotalamus glutamaterjik hücrelerinin lokomotor aktivite için önemli olduğunu ve yüksek yağlı beslenmenin bu aktivitede bozulmaya neden olduğunu göstermiştir. Yüksek yağlı beslenmek glutamaterjik hücreler üzerinde bir etki göstermektedir fakat çalışmamızın bulguları bu etkinin nasıl gerçekleştiğini tespit etmekte yetersiz kalmaktadır. Bu bulgular ileriki çalışmalar için yol gösterici olacaktır. Öte yandan yüksek yağlı beslenen farelerde glutamatın kemogenetik aktivasyonu anksiyeteyi baskılayıcı bulunmuştur. Bu durum yüksek yağlı beslenmeye bağlı anksiyetenin glutamaterjik yolağın baskılanması ile ilgili olabileceğini düşündürmektedir. Bu etkinin hangi bağlantılarla gerçekleştiği araştırma konusudur.

9- KAYNAKLAR

- 1 Kim KS, Seeley RJ, Sandoval DA. Signalling from the periphery to the brain that regulates energy homeostasis. *Nat Rev Neurosci* 2018;19:185–96.
- 2 Piguet O, Petersén Å, Yin Ka Lam B, et al. Eating and hypothalamus changes in behavioral-variant frontotemporal dementia. *Ann Neurol* 2011;69:312–9.
- 3 Anand BK, Brobeck JR. Localization of a “Feeding Center” in the Hypothalamus of the Rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 1951;77:323–5.
- 4 Hetherington AW, Ranson SW. Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *Anat Rec* 1940;78:149–72.
- 5 Meister B. Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight. *Physiol Behav* 2007;92:263–71.
- 6 Pearson CA, Placzek M. Development of the Medial Hypothalamus: Forming a Functional Hypothalamic-Neurohypophyseal Interface. *Curr. Top. Dev. Biol.*, vol. 106, 2013:49–88.
- 7 Tong Q, Ye CP, McCrimmon RJ, et al. Synaptic Glutamate Release by Ventromedial Hypothalamic Neurons Is Part of the Neurocircuitry that Prevents Hypoglycemia. *Cell Metab* 2007;5:383–93.
- 8 Fenselau H, Campbell JN, Verstegen AMJ, et al. A rapidly acting glutamatergic ARC→PVH satiety circuit postsynaptically regulated by α -MSH. *Nat Neurosci* 2017;20:42–51.
- 9 Cooke SF, Bliss TVP. Plasticity in the human central nervous system. *Brain* 2006;129:1659–73.
- 10 Sweeney P, Li C, Yang Y. Appetite suppressive role of medial septal glutamatergic neurons. *Proc Natl Acad Sci* 2017;114:13816–21.
- 11 Boeree CG. The Emotional Nervous System. *Gen Psychol* 2009.
- 12 Timper K, Brüning JC. Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity. *Dis Model Mech* 2017;10:679–89.
- 13 Sampaio-Baptista C, Johansen-Berg H, Mani BK, et al. A rapidly acting

- glutamatergic ARC→PVH satiety circuit postsynaptically regulated by α -MSH. *J Neurosci* 2017;6:1–18.
- 14 Vong L, Ye C, Yang Z, Choi B, Chua S, Lowell BB. Leptin Action on GABAergic Neurons Prevents Obesity and Reduces Inhibitory Tone to POMC Neurons. *Neuron* 2011;71:142–54.
 - 15 Atasoy D, Betley JN, Li WP, et al. A genetically specified connectomics approach applied to long-range feeding regulatory circuits. *Nat Neurosci* 2014;17:1830–9.
 - 16 Sternson SM, Atasoy D, Betley JN, Henry FE, Xu S. An emerging technology framework for the neurobiology of appetite. *Cell Metab* 2016;23:234–53.
 - 17 Sohn JW. Network of hypothalamic neurons that control appetite. *BMB Rep* 2015;48:229–33.
 - 18 Cowley MA, Smith RG, Diano S, et al. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 2003;37:649–61.
 - 19 Yang Y, Atasoy D, Su HH, Sternson SM. Hunger states switch a flip-flop memory circuit via a synaptic AMPK-dependent positive feedback loop. *Cell* 2011;146:992–1003.
 - 20 Shanabrough M, Janoschek R, Buch T. Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding Mapping of metabolic asymmetry in the hypothalamus View project Design of Animal Experiments View project. *NatureCom* 2014;doi: 10.1038/nn1548.
 - 21 Richter CP. Experimental diabetes insipidus. *Brain* 1930;53:76–85.
 - 22 Hetherington AW. Obesity in the rat following the injection of chromic acid into the hypophysis. *Endocrinology* 1940;26:264–8.
 - 23 Kennedy GC. The hypothalamic control of food intake in rats. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1950;137:535–49.
 - 24 Faber CL, Matsen ME, Velasco KR, et al. Distinct Neuronal Projections From the Hypothalamic Ventromedial Nucleus Mediate Glycemic and Behavioral Effects. *Am Diabetes Assoc* 2018;doi: 10.2337/db18-0380.

- 25 Parker JA, Bloom SR. Hypothalamic neuropeptides and the regulation of appetite. *Neuropharmacology* 2012;63:18–30.
- 26 Mayer J. Regulation of energy intake and the body weight: the glucostatic theory and the lipostatic hypothesis. *Ann N Y Acad Sci* 1955;63:15–43.
- 27 Song Z, Levin BE, McArdle JJ, Bakhos N, Routh VH. Convergence of pre- and postsynaptic influences on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Diabetes* 2001;50:2673–81.
- 28 Shimazu T, Minokoshi Y. Systemic glucoregulation by glucose-sensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus (VMH). *J Endocr Soc* 2017;1:449–59.
- 29 Stevens J. Food Fight: the Inside Story of the Food Industry, America’s Obesity Crisis, and What We Can Do About It. *Am J Clin Nutr* 2004;80:239–40.
- 30 Berthoud H-R, Morrison C. The Brain, Appetite, and Obesity. *Annu Rev Psychol* 2008;59:55–92.
- 31 Egecioglu E, Skibicka KP, Hansson C, et al. Hedonic and incentive signals for body weight control. *Rev Endocr Metab Disord* 2011;12:141–51.
- 32 Ramirez I, Friedman MI. Dietary hyperphagia in rats: Role of fat, carbohydrate, and energy content. *Physiol Behav* 1990;47:1157–63.
- 33 Wojnicki FHE, Babbs RK, Corwin RLW. Reinforcing efficacy of fat, as assessed by progressive ratio responding, depends upon availability not amount consumed. *Physiol Behav* 2010;100:316–21.
- 34 Yoneda T, Taka Y, Okamura M, et al. Reinforcing effect for corn oil stimulus was concentration dependent in an operant task in mice. *Life Sci* 2007;81:1585–92.
- 35 Johnson PM, Kenny PJ. Dopamine D2 receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats. *Nat Neurosci* 2010;13:635–41.
- 36 Kanoski SE, Zhang Y, Zheng W, Davidson TL. The effects of a high-energy diet on hippocampal function and blood-brain barrier integrity in the rat. *J Alzheimer’s Dis* 2010;21:207–19.

- 37 Blundell JE, Finlayson G. Is susceptibility to weight gain characterized by homeostatic or hedonic risk factors for overconsumption? *Physiol Behav* 2004;82:21–5.
- 38 La Fleur SE, Van Rozen AJ, Luijendijk MCM, Groeneweg F, Adan RAH. A free-choice high-fat high-sugar diet induces changes in arcuate neuropeptide expression that support hyperphagia. *Int J Obes* 2010;34:537–46.
- 39 Milanski M, Degasperi G, Coope A, et al. Cellular/Molecular Saturated Fatty Acids Produce an Inflammatory Response Predominantly through the Activation of TLR4 Signaling in Hypothalamus: Implications for the Pathogenesis of Obesity. *Soc Neurosci* 2009.
- 40 Münzberg H, Flier JS, Bjørbæk C. Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology* 2004;145:4880–9.
- 41 De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* 2005;146:4192–9.
- 42 Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000;404:661–71.
- 43 Spanswick D, Smith MA, Mirshamsi S, Routh VH, Ashford MLJ. Insulin activates ATP-sensitive K⁺ channels in hypothalamic neurons of lean, but not obese rats. *Nat Neurosci* 2000;3:757–8.
- 44 Grill HJ, Kaplan JM. The Neuroanatomical Axis for Control of Energy Balance. Elsevier 2002;doi: 10.1006/frne.2001.0224.
- 45 Levin BE, Dunn-Meynell AA. Reduced central leptin sensitivity in rats with diet-induced obesity. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* 2002.
- 46 Niswender KD, Baskin DG, Schwartz MW. Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 2004;15:362–9.
- 47 Posey KA, Clegg DJ, Printz RL, et al. Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* 2009.

- 48 Williams LM. Hypothalamic dysfunction in obesity. *Proc Nutr Soc* 2019;71:521–33.
- 49 Abbott M-A, Wells DG, Fallon JR. The Insulin Receptor Tyrosine Kinase Substrate p58/53 and the Insulin Receptor Are Components of CNS Synapses. 1999.
- 50 Zhao WQ, Alkon DL. Role of insulin and insulin receptor in learning and memory. *Mol Cell Endocrinol* 2001;177:125–34.
- 51 Kishi T, Hirooka Y, Nagayama T, et al. Calorie restriction improves cognitive decline via up-regulation of brain-derived neurotrophic factor: Tropomyosin-related kinase B in hippocampus of obesity-induced hypertensive rats. *Int Heart J* 2015;56:110–5.
- 52 Pintana H, Apaijai N, Pratchayasakul W, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. Effects of metformin on learning and memory behaviors and brain mitochondrial functions in high fat diet induced insulin resistant rats. *Life Sci* 2012;91:409–14.
- 53 Jeon BT, Jeong EA, Shin HJ, et al. Resveratrol attenuates obesity-associated peripheral and central inflammation and improves memory deficit in mice fed a high-fat diet. *Diabetes* 2012;61:1444–54.
- 54 Massa F, Mancini G, Schmidt H, et al. Neurobiology of Disease Alterations in the Hippocampal Endocannabinoid System in Diet-Induced Obese Mice. *Soc Neurosci* 2010.
- 55 Kanoski SE, Davidson TL. Different Patterns of Memory Impairments Accompany Short-and Longer-Term Maintenance on a High-Energy Diet. *PsychNetApOrg* 2010.
- 56 Kanoski SE, Davidson TL. Western diet consumption and cognitive impairment: Links to hippocampal dysfunction and obesity. *Physiol Behav* 2011;103:59–68.
- 57 Meldrum BS. Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: Review of Physiology and Pathology. *J Nutr* 2000;130:1007S-1015S.
- 58 Fremeau RT, Kam K, Qureshi Y, et al. Vesicular glutamate transporters 1 and 2 target to functionally distinct synaptic release sites. *Science* (80-) 2004;304:1815–9.

- 59 Gasic GP, Hollmann M. Molecular Neurobiology of Glutamate Receptors. *Annu Rev Physiol* 1992;54:507–36.
- 60 McEntee WJ, Crook TH. Glutamate: its role in learning, memory, and the aging brain. *Psychopharmacology (Berl)* 1993;111:391–401.
- 61 Sheng P. Glutamate receptors and signal transduction in learning and memory. Springer 2011;38:453–60.
- 62 McKenna MC, Dienel GA, Sonnewald U, Waagepetersen HS, Schousboe A. Energy Metabolism of the Brain. *Basic Neurochem.*, Elsevier, 2012:200–31.
- 63 Smith QR. Transport of Glutamate and Other Amino Acids at the Blood-Brain Barrier. *J Nutr* 2000;130:1016S-1022S.
- 64 Van Den Pol' AN, Trombley PQ. Glutamate Neurons in Hypothalamus Regulate Excitatory Transmission. vol. 13. 1993.
- 65 Ziegler DR, Cullinan WE, Herman JP. Distribution of vesicular glutamate transporter mRNA in rat hypothalamus. *J Comp Neurol* 2002;448:217–29.
- 66 Birgner C, Nordenankar K, Lundblad M, et al. VGLUT2 in dopamine neurons is required for psychostimulant-induced behavioral activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:389–94.
- 67 Wang H-L, Qi J, Zhang S, Wang H, Morales M. Rewarding Effects of Optical Stimulation of Ventral Tegmental Area Glutamatergic Neurons. *J Neurosci* 2015;35:15948–54.
- 68 Delgado TC. Glutamate and GABA in appetite regulation. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013;4:1–8.
- 69 Shah BP, Vong L, Olson DP, et al. MC4R-expressing glutamatergic neurons in the paraventricular hypothalamus regulate feeding and are synaptically connected to the parabrachial nucleus. *Proc Natl Acad Sci* 2014;111:13193–8.
- 70 Liu T, Kong D, Shah BP, et al. Fasting activation of AgRP neurons requires NMDA receptors and involves spinogenesis and increased excitatory tone. *Neuron* 2012;73:511–22.
- 71 Mccrimmon RJ, Shaw M, Fan X, et al. Key Role for AMP-Activated Protein

Kinase in the Ventromedial Hypothalamus in Regulating Counterregulatory Hormone Responses to Acute Hypoglycemia. *Am Diabetes Assoc* 2008.

- 72 Yang Y, Atasoy D, Su HH, Sternson SM. Hunger states switch a flip-flop memory circuit via a synaptic AMPK-dependent positive feedback loop. *Cell* 2011;146:992–1003.
- 73 Fuente-Martín E, García-Cáceres C, Granado M, et al. Leptin regulates glutamate and glucose transporters in hypothalamic astrocytes. *J Clin Invest* 2012;122:3900–13.
- 74 Fu O, Iwai Y, Narukawa M, et al. Hypothalamic neuronal circuits regulating hunger-induced taste modification. *Nat Commun* 2019.
- 75 Dalvi PS, Chalmers JA, Luo V, et al. High fat induces acute and chronic inflammation in the hypothalamus: Effect of high-fat diet, palmitate and TNF- α on appetite-regulating NPY neurons. *Int J Obes* 2017;41:149–58.
- 76 Rossi MA, Basiri ML, McHenry JA, et al. Obesity remodels activity and transcriptional state of a lateral hypothalamic brake on feeding. *Science* (80-) 2019;364:1271–4.
- 77 Fine R. Learning Theory and Behavior. *Am J Psychother* 1961;15:298–300.
- 78 Olson MH, Hergenhahn BR. Introduction to theories of learning: Ninth edition. 2015.
- 79 Sherwood L. Human Physiology. *J Physiol* 1995;489:25–46.
- 80 Baddeley A. Working memory, thought, and action. Vol 45 OuP Oxford 2007.
- 81 LaBar K, Neuroscience RC-NR, 2006 U. Cognitive neuroscience of emotional memory. *Nat Rev Neurosci* 2006;7:54–64.
- 82 Gallistel CR, Matzel LD. The Neuroscience of Learning: Beyond the Hebbian Synapse. *Annu Rev Psychol* 2013;64:169–200.
- 83 Trettenbrein PC. The Demise of the Synapse As the Locus of Memory: A Looming Paradigm Shift? *Front Syst Neurosci* 2016.
- 84 Bliss TVP, Collingridge GL. A synaptic model of memory: Long-term

- potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993;361:31–9.
- 85 Malenka RC, Bear MF. LTP and LTD: An embarrassment of riches. *Neuron* 2004;44:5–21.
 - 86 Zhang Y, Liu G, Yan J, Zhang Y, Li B, Cai D. Metabolic learning and memory formation by the brain influence systemic metabolic homeostasis. *Nat Commun* 2015.
 - 87 Coons EE, Levak M, Miller NE. Lateral hypothalamus: Learning of food-seeking response motivated by electrical stimulation. *Science* (80-) 1965;150:1320–1.
 - 88 Mendelson J, Chorover SL. Lateral hypothalamic stimulation in satiated rats: T-maze learning for food. *Science* (80-) 1965;149:559–61.
 - 89 Petrovich GD. Lateral hypothalamus as a motivation-cognition interface in the control of feeding behavior. *Front Syst Neurosci* 2018;12:14.
 - 90 Schwartz M, Teitelbaum P. Dissociation between learning and remembering in rats with lesions in the lateral hypothalamus. *J Comp Physiol Psychol* 1974;87:384–98.
 - 91 Huguet G, Aldavert-Vera L, Kádár E, Peña de Ortiz S, Morgado-Bernal I, Segura-Torres P. Intracranial self-stimulation to the lateral hypothalamus, a memory improving treatment, results in hippocampal changes in gene expression. *Neuroscience* 2009;162:359–74.
 - 92 Mao Z, Yu X, Ling Z, et al. Deep brain stimulation for treatment of severe Alzheimer’s disease: Study protocol for a prospective, self-controlled, phase I trial (case observation). *Asia Pacific J Clin Trials Nerv Syst Dis* 2017;2:66.
 - 93 Hamani C, McAndrews MP, Cohn M, et al. Memory Enhancement Induced by Hypothalamic/ Fornix Deep Brain Stimulation. *Wiley Online Libr* 2008;63:119–23.
 - 94 Reichelt AC, Westbrook RF, Morris MJ. Editorial: Impact of diet on learning, memory and cognition. *Front Behav Neurosci* 2017.
 - 95 Morris MJ, Beilharz JE, Maniam J, Reichelt AC, Westbrook RF. Why is obesity such a problem in the 21st century? The intersection of palatable food, cues and reward pathways, stress, and cognition. *Neurosci Biobehav Rev* 2015;58:36–

45.

- 96 Boitard C, Parkes SL, Cavaroc A, et al. Switching Adolescent High-Fat Diet to Adult Control Diet Restores Neurocognitive Alterations. *Front Behav Neurosci* 2016;10:225.
- 97 Nguyen JCD, Ali SF, Kosari S, et al. Western Diet Chow Consumption in Rats Induces Striatal Neuronal Activation While Reducing Dopamine Levels without Affecting Spatial Memory in the Radial Arm Maze. *Front Behav Neurosci* 2017;11:22.
- 98 Jais A, Solas M, Backes H, et al. Myeloid-Cell-Derived VEGF Maintains Brain Glucose Uptake and Limits Cognitive Impairment in Obesity. *Cell* 2016;165:882–95.
- 99 Hargrave SL, Davidson TL, Lee TJ, Kinzig KP. Brain and behavioral perturbations in rats following Western diet access. *Appetite* 2015;93:35–43.
- 100 Miller AA, Spencer SJ. Obesity and neuroinflammation: A pathway to cognitive impairment. *Brain Behav Immun* 2014;42:10–21.
- 101 Kanoski SE, Davidson TL. Western diet consumption and cognitive impairment: Links to hippocampal dysfunction and obesity. *Physiol Behav* 2011;103:59–68.
- 102 Hsu TM, Kanoski SE. Blood-brain barrier disruption: Mechanistic links between western diet consumption and dementia. *Front Aging Neurosci* 2014.
- 103 Krishna S, Keralapurath MM, Lin Z, et al. Neurochemical and electrophysiological deficits in the ventral hippocampus and selective behavioral alterations caused by high-fat diet in female C57BL/6 mice. *Neuroscience* 2015;297:170–81.
- 104 Camer D, Yu Y, Szabo A, Fernandez F, Dinh CHL, Huang XF. Bardoxolone methyl prevents high-fat diet-induced alterations in prefrontal cortex signalling molecules involved in recognition memory. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 2015;59:68–75.
- 105 Duthiel S, Ota KT, Wohleb ES, Rasmussen K, Duman RS. High-Fat Diet Induced Anxiety and Anhedonia: Impact on Brain Homeostasis and Inflammation. *Neuropsychopharmacology* 2016;41:1874–87.

- 106 Lu J, Wu D mei, Zheng Y lin, et al. Ursolic acid improves high fat diet-induced cognitive impairments by blocking endoplasmic reticulum stress and I α B kinase β /nuclear factor- κ B-mediated inflammatory pathways in mice. *Brain Behav Immun* 2011;25:1658–67.
- 107 Jeon BT, Jeong EA, Shin HJ, et al. Resveratrol attenuates obesity-associated peripheral and central inflammation and improves memory deficit in mice fed a high-fat diet. *Diabetes* 2012;61:1444–54.
- 108 Pistell PJ, Morrison CD, Gupta S, et al. Cognitive impairment following high fat diet consumption is associated with brain inflammation. *J Neuroimmunol* 2010;219:25–32.
- 109 Hao S, Dey A, Yu X, Stranahan AM. Dietary obesity reversibly induces synaptic stripping by microglia and impairs hippocampal plasticity. *Brain Behav Immun* 2016;51:230–9.
- 110 Kälén S, Heppner FL, Bechmann I, Prinz M, Tschöp MH, Yi CX. Hypothalamic innate immune reaction in obesity. *Nat Rev Endocrinol* 2015;11:339–51.
- 111 Williams KW, Elmquist JK. From neuroanatomy to behavior: Central integration of peripheral signals regulating feeding behavior. *Nat Neurosci* 2012;15:1350–5.
- 112 Waise TMZ, Toshinai K, Naznin F, et al. One-day high-fat diet induces inflammation in the nodose ganglion and hypothalamus of mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;464:1157–62.
- 113 Thaler JP, Yi CX, Schur EA, et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest* 2012;122:153–62.
- 114 Vlasov K, Van Dort CJ, Solt K. Optogenetics and Chemogenetics. *Methods Enzymol.*, vol. 603, 2018:181–96.
- 115 Roth BL. DREADDs for Neuroscientists. *Neuron* 2016;89:683–94.
- 116 Atasoy D, Sternson SM. Chemogenetic tools for causal cellular and neuronal biology. *Physiol Rev* 2018;98:391–418.
- 117 Ovchinnikov YA. Ion Channels of Excitable Membranes. *Sci. Sci.*, 1981:235–41.

- 118 Nicoll R. The coupling of neurotransmitter receptors to ion channels in the brain. *Science* (80-) 1988;241:545–51.
- 119 Clark JT, Kalra PS, Crowley WR, Kalra SP. Neuropeptide y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology* 1984;115:427–9.
- 120 Grandison L, Guidotti A. Stimulation of food intake by muscimol and beta endorphin. *Neuropharmacology* 1977;16:533–6.
- 121 Hikosaka O, Wurtz RH. Modification of saccadic eye movements by GABA-related substances. I. Effect of muscimol and bicuculline in monkey superior colliculus. *J Neurophysiol* 1985;53:266–91.
- 122 Kelly J, Rothstein J, Grossman SP. GABA and hypothalamic feeding systems. I. Topographic analysis of the effects of microinjections of muscimol. *Physiol Behav* 1979;23:1123–34.
- 123 Fenno L, Yizhar O, Deisseroth K. The Development and Application of Optogenetics. *Annu Rev Neurosci* 2011;34:389–412.
- 124 Sternson SM, Roth BL. Chemogenetic Tools to Interrogate Brain Functions. *Annu Rev Neurosci* 2014;37:387–407.
- 125 White B, Osterwalder T, Keshishian H. Molecular genetic approaches to the targeted suppression of neuronal activity. *Curr Biol* 2001;11:R1041–53.
- 126 Strobel SA, Ortoleva-Donnelly L, Ryder SP, Gate JH, Moncoeur E. Complementary sets of noncanonical base pairs mediate RNA helix packing in the group I intron active site. *Nat Struct Biol* 1998;5:60–6.
- 127 Bishop AC, Shah K, Liu Y, Witucki L, Kung CY, Shokat KM. Design of allele-specific inhibitors to probe protein kinase signaling. *Curr Biol* 1998;8:257–66.
- 128 Collot J, Gradinaru J, Humbert N, Skander M, Zocchi A, Ward TR. Artificial Metalloenzymes for Enantioselective Catalysis Based on Biotin–Avidin. *J Am Chem Soc* 2003;125:9030–1.
- 129 Häring D, Distefano MD. Enzymes by design: Chemogenetic assembly of transamination active sites containing lysine residues for covalent catalysis. *Bioconjug Chem* 2001;12:385–90.

- 130 Straders CD, Gaffneysb T, Suggn EE, et al. Allele-specific activation of genetically engineered receptors. vol. 266. 1991.
- 131 Coward P, Wada HG, Falk MS, et al. Controlling signaling with a specifically designed Gi-coupled receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:352–7.
- 132 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* 2007;104:5163–8.
- 133 English JG, Roth BL. Chemogenetics-a transformational and translational platform. *JAMA Neurol* 2015;72:1361–6.
- 134 Kim CK, Adhikari A, Deisseroth K. Integration of optogenetics with complementary methodologies in systems neuroscience. *Nat Rev Neurosci* 2017;18:222–35.
- 135 Conklin BR, Hsiao EC, Claeyson S, et al. Engineering GPCR signaling pathways with RASSLs. *Nat Methods* 2008;5:673–8.
- 136 Sternson SM, Eiselt A-K. Three Pillars for the Neural Control of Appetite. *Annu Rev Physiol* 2017;79:401–23.
- 137 Nakajima KI, Cui Z, Li C, et al. Gs-coupled GPCR signalling in AgRP neurons triggers sustained increase in food intake. *Nat Commun* 2016.
- 138 Krashes MJ, Koda S, Ye CP, et al. Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. *J Clin Invest* 2011;121:1424–8.
- 139 Berlyne DE. Novelty and curiosity as determinants of exploratory behaviour. *Br J Psychol Gen Sect* 1950;41:68–80.
- 140 Ennaceur A. One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues. *Behav Brain Res* 2010;215:244–54.
- 141 Murtagh, E., & NCD Risk Factor Collaboration. Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents and adults. *Yearb Paediatr Endocrinol* 2018.
- 142 Singh GM, Danaei G, Farzadfar F, et al. The age-specific quantitative effects of metabolic risk factors on cardiovascular diseases and diabetes: A pooled

analysis. PLoS One 2013.

- 143 Anstey KJ, Cherbuin N, Budge M, Young J. Body mass index in midlife and late-life as a risk factor for dementia: A meta-analysis of prospective studies. *Obes Rev* 2011.
- 144 Zendehdel M, Mokhtarpouriani K, Hamidi F, Montazeri R. Intracerebroventricular injection of ghrelin produces hypophagia through central serotonergic mechanisms in chicken. *Vet Res Commun* 2013;37:37–41.
- 145 Betley JN, Cao ZFH, Ritola KD, Sternson SM. Parallel, redundant circuit organization for homeostatic control of feeding behavior. *Cell* 2013;155:1337–50.
- 146 Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW. Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: A Phaseolus vulgaris-Leucoagglutinin study in the rat. *J Comp Neurol* 1994;348:41–79.
- 147 Stamatakis AM, Maaike X, Swieten V, et al. Systems/Circuits Lateral Hypothalamic Area Glutamatergic Neurons and Their Projections to the Lateral Habenula Regulate Feeding and Reward. *Soc Neurosci* 2016.
- 148 Jennings JH, Rizzi G, Stamatakis AM, Ung RL, Stuber GD. The inhibitory circuit architecture of the lateral hypothalamus orchestrates feeding. *Science* (80-) 2013;341:1517–21.
- 149 Ali S, Stone MA, Peters JL, Davies MJ, Khunti K. The prevalence of co-morbid depression in adults with Type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Diabet Med* 2006;23:1165–73.
- 150 Jacka FN, Cherbuin N, Anstey KJ, Sachdev P, Butterworth P. Western diet is associated with a smaller hippocampus: A longitudinal investigation. *BMC Med* 2015.
- 151 Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: Modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity* 2007;15:798–808.
- 152 Stranahan AM, Norman ED, Lee K, et al. Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *Hippocampus* 2008;18:1085–8.
- 153 Carey AN, Gomes SM, Shukitt-Hale B. Blueberry Supplementation Improves

- Memory in Middle-Aged Mice Fed a High-Fat Diet. ACS Publ 2014;62:3972–8.
- 154 Heyward FD, Walton RG, Carle MS, Coleman MA, Garvey WT, Sweatt JD. Adult mice maintained on a high-fat diet exhibit object location memory deficits and reduced hippocampal SIRT1 gene expression. *Neurobiol Learn Mem* 2012;98:25–32.
 - 155 Cordner ZA, Tamashiro KLK. Effects of high-fat diet exposure on learning & memory. *Physiol Behav* 2015;152:363–71.
 - 156 Kosse C, Burdakov D. Natural hypothalamic circuit dynamics underlying object memorization. *Nat Commun* 2019.
 - 157 Izawa S, Chowdhury S, Miyazaki T, et al. REM sleep-active MCH neurons are involved in forgetting hippocampusdependent memories. *Science* (80-) 2019;365:1308–13.
 - 158 Aitta-aho T, Pappa E, Burdakov D, Apergis-Schoute J. Cellular activation of hypothalamic hypocretin/orexin neurons facilitates short-term spatial memory in mice. *Neurobiol Learn Mem* 2016;136:183–8.
 - 159 Zimmer MR, Schmitz AE, Dietrich MO. Activation of Agrp neurons modulates memory-related cognitive processes in mice. *Pharmacol Res* 2019;141:303–9.
 - 160 Beck B, Pourié G. Ghrelin, neuropeptide Y, and other feeding-regulatory peptides active in the Hippocampus: Role in learning and memory. *Nutr Rev* 2013;71:541–61.
 - 161 Dietrich MO, Zimmer MR, Bober J, Horvath TL. Hypothalamic Agrp neurons drive stereotypic behaviors beyond feeding. *Cell* 2015;160:1222–32.
 - 162 Sharpe MJ, Marchant NJ, Whitaker LR, et al. Lateral Hypothalamic GABAergic Neurons Encode Reward Predictions that Are Relayed to the Ventral Tegmental Area to Regulate Learning. *Curr Biol* 2017;27:2089-2100.e5.
 - 163 Burnett CJ, Li C, Webber E, et al. Hunger-Driven Motivational State Competition. *Neuron* 2016;92:187–201.
 - 164 Lizarbe B, Soares AF, Larsson S, Duarte JMN. Neurochemical modifications in the hippocampus, cortex and hypothalamus of mice exposed to long-term

high-fat diet. *Front Neurosci* 2019.

- 165 Tahara Y, Hirao A, Moriya T, Kudo T, Shibata S. Effects of medial hypothalamic lesions on feeding-induced entrainment of locomotor activity and liver Per2 expression in Per2::Luc mice. *J Biol Rhythms* 2010;25:9–18.
- 166 Marciello M, Sinnamon HM. Locomotor Stepping Initiated by Glutamate Injections Into the Hypothalamus of the Anesthetized Rat. *Behav Neurosci* 1990;104:980–90.
- 167 Simon P, Dupuis R, Costentin J. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. *Behav Brain Res* 1994;61:59–64.
- 168 Keleher MR, Zaidi R, Patel K, et al. The effect of dietary fat on behavior in mice. *J Diabetes Metab Disord* 2018;17:297–307.
- 169 Sivanathan S, Thavartnam K, Arif S, Elegino T, McGowan PO. Chronic high fat feeding increases anxiety-like behaviour and reduces transcript abundance of glucocorticoid signalling genes in the hippocampus of female rats. *Behav Brain Res* 2015;286:265–70.

10. ETİK KURUL ONAYI



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

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
01/08/2019	41		Dr. Öğr. Üyesi Muhammed İktbal Alp

"Uzun Dönem Yağlı Beslenmenin Arkuat Çekirdekte Bulunan Glutamaterjik Nöronların Davranışsal Süreçlere Etkisinin Araştırılması" başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna "Oybirliği" ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 01.08.2019 - 15 ay

ÇAĞIRI	AD SOYADI	İMZA
--------	-----------	------



E-İmzalıdır

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

Sayı : E-38828770-604.01.01-16676
Konu : Etik Kurulu Kararı

15/06/2020

Sayın Dr. Öğr. Üyesi Muhammed İkbāl ALP

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 01.08 2019 tarihli 41karar no ile onay verilen “Uzun Dönem Yağlı Beslenmenin Arkuat Çekirdekte Bulunan Glutamaterjik Nöronların Davranışsal Süreçlere Etkisinin Araştırılması” isimli çalışmanın başlığını “Uzun Dönem Yağlı Beslenmenin Hipotalamustaki Glutamaterjik Nöronlar Üzerinden Davranışsal Süreçlere Etkisi” olarak değiştirilmesi isteğiniz uygun bulunmuş olup kayıt altına alınmıştır.

Bilgilerinize rica ederim.

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

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 15.06.2020 tarihinde e-imzalanmıştır. Evrağınızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 69A93377X5 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi

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

Tel: 444 85 44

İnternet: www.medipol.edu.tr

Ayrıntılı Bilgi İçin : bilgi@medipol.edu.tr