



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**MELANİN KONSANTRE EDEN HORMON NÖRONLARININ
İŞTAH VE ÖDÜL REGÜLASYONUNDAKİ ROLÜ**

PELİN DİLSİZ ERİM

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. ERTUĞRUL KILIÇ

İSTANBUL-2021

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.

PELİN DİLSİZ ERİM

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması İstanbul Medipol Üniversitesi Sağlık Bilim ve Teknolojileri Enstitüsü Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi'nin bilimsel araştırmalara sağladığı olanak ve desteklerle yapılmıştır. Sağladığı standartların üstündeki imkanlar için REMER Müdürü ve Sinirbilim Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Gürkan Öztürk'e,

Yol göstericilikleri, bitmeyen destekleri ve en önemlisi bana sundukları bu imkan için teşekkürden daha fazlasını borçlu olduğum danışmanlarım Prof. Dr. Ertuğrul Kılıç ve Doç. Dr. Deniz Atasoy'a,

Bu çalışmanın her aşamasında çok emeği bulunan ve desteklerini hiç esirgemeyen, başta İlknur Çoban, Utku Soğukpınar, Tayfun Ates ve Yavuz Yavuz olmak üzere laboratuvar arkadaşlarıma ve başta Dr. Öğr. Üyesi Taha Keleştemur, Dr. Mehmet Şerif Aydın, Dr. Öğr. Üyesi Neşe Aysıt, Dr. Öğr. Üyesi Muhammed İkbâl Alp, Hilmi Kaan Alkan, Tuba Oğuz, Burcu Kurt Vatandaşlar, Emre Vatandaşlar ve Esra Yiğit olmak üzere tüm REMER ve MEDİTAM ailesine, eşsiz desteği ve yol göstericiliği için Göknil Erbatu Çelik'e,

Yıllardır her konuda yanımda olan, beraber bu yola başladığım ve asla eskimeyecek olan Deniz Ashan Madencioğlu Kul, Emel Esen Sergin, Fatma Zehra Hapil Zevkliler, Gülçin Gümüş, Halit Fahri Nizamettinoğlu ve Özge Sungur'a

Sonsuz desteklerinin ve güvenlerinin bitip tükenmeyeceğini bildiğim, en büyük dayanaklarımdan olan annem Ayşe Dilsiz, babam Yusuf Dilsiz, kardeşim İpek Dilsiz ve eşim Dr. Öğr. Üyesi Ümit Can Erim'e teşekkürlerimi sunarım.

Pelin Dilsiz Erim

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
RESİMLER LİSTESİ.....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	x
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	6
4.1. Beslenmenin Hipotalamik Kontrolü.....	6
4.2. Beslenme Mekanizmalarında Hipotalamik Nöron Alt Grupları	7
4.3. Lateral Hipotalamik Alan	9
4.3.1. Lateral Hipotalamik Alanın İştah Regülasyonu	9
4.3.2. Lateral Hipotalamik Alan Kontrolünde Ödül Algısı	10
4.4. Melanin Konsantre Eden Hormon Nöronları	11
4.4.1. MCH Nöronlarının Enerji Homeostazı ve Ödül Algısındaki Rolü	12
5. MATERYAL VE METOT	15
5.1. Materyal.....	15
5.2. Metot	18
5.2.1. Transgenik deney hayvanları	18
5.2.2. Genotipleme.....	19
5.2.2.1. DNA elde etme	19
5.2.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)	19
5.2.2.3. Agaroz jel elektroforezi ve görüntüleme	20
5.2.3. Rekombinant adeno-asosiyé virüs üretimi.....	21
5.2.3.1. Plazmit DNA çoğaltma.....	21
5.2.3.2. DNA izolasyonu	22
5.2.3.3. 293AAV Hücre transfeksiyonu	22

5.2.3.4 Pürifikasyon.....	23
5.2.4. İntrakraniyal rekombinant adeno-asosiye virüs enjeksiyonu	25
5.2.5. Optogenetik uyarım için fiber optik implantasyonu	26
5.2.6. Besin tüketimi ölçümü	26
5.2.6.1. Kemogenetik yöntemlerle yapılan MCH nöron aktivasyonu	26
5.2.6.2. Optogenetik yöntemlerle yapılan MCH nöron aktivasyonu	28
5.2.6.3. Kemogenetik yöntemlerle yapılan MCH nöron inhibisyonu	29
5.2.7. Açık alan testi	29
5.2.7. Yükseltilmiş artı labirent testi.....	30
5.2.8. MCH nöronlarının foto-uyarımı ile besin tüketiminin eşleştirilmesi	30
5.2.9. <i>Pmch-cre</i> farelerde besinden bağımsız oto-uyarım	31
5.2.9.1. Burun hareketi ile optogenetik oto-uyarım.....	31
5.2.9.2. Basamak ile optogenetik oto-uyarım.....	31
5.2.10. Elektrofizyoloji	32
5.2.11. Doku fiksasyonu ve kesit alma	33
5.2.12. İmmünohistokimyasal antikor boyaması	34
5.2.13. Mikroskopik görüntüleme ve analiz	34
5.2.14. İstatistiksel analizler	34
6. BULGULAR	36
6.1. MCH nöronlarında transgen ifadesi	36
6.1.1. MCH nöronlarında hM3Dq-mCherry ve hM34i-mCherry transgen ifadesi	36
6.1.2. MCH nöronlarında ChR2-eYFP transgen ifadesi.....	37
6.1.3. Rekombinant Adeno-Asosiye Virüslerin Fonksiyonel Analizi.....	38
6.2. MCH nöronlarının akut iştah regülasyonu üzerindeki etkisi.....	40
6.2.1. MCH nöronlarının kemogenetik uyarımının ve inhibisyonunun akut iştah regülasyonu üzerindeki etkisi	40
6.2.2. MCH nöronlarının optogenetik uyarımının akut iştah regülasyonu üzerindeki etkisi.....	42
6.3. MCH nöronlarının lokomotor aktivite üzerindeki etkisi.....	43
6.4. MCH nöronlarının lokomotor aktivite üzerindeki etkisi	46
6.5. MCH nöronlarında besin tüketimi ile eşleşmiş foto-uyarım	48

6.6. MCH nöronlarında besinden bağımsız oto-uyarım	49
6.6.1. Burun hareketi ile besinden bağımsız oto-uyarım	49
6.6.2. Basamak ile besinden bağımsız oto-uyarım	51
6.7. Davranış deneyleri sonrası post-hoc analizler	52
7. TARTIŞMA	53
8. SONUÇ.....	62
9. KAYNAKLAR	62
10. ETİK KURUL ONAYI.....	75
11. ÖZGEÇMİŞ.....	76



KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

Semboller	Açıklamalar
A/P	Anterior/Posterior
AgRP	Aguti-ilişkili peptid
ARC	Arkuat Nükleus
AAV	Adeno-Asosiye Virüs
BAT	Kahverengi adipoz doku
CLZ	Klozapin
CNO	Clozapine-N-Oxide
D/V	Dorsal/Ventral
DREADD	Dizayn Edilmiş İlaçları Aktive Eden Dizayn Edilmiş Reseptörler
DMH	Dorsomedial Hipotalamus
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EtOH	Etil Alkol
FLEX	Flip-Excision
LHA	Lateral Hipotalamik Alan
M/L	Medial/Lateral
MCH	Melanin Konsantre Eden Hormon
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltilisi
PBN	Parabrakial Nükleus
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Pmch	MCH transgenik faresi
POMC	Pro-opiomelanokortin
PVN	Paraventriküler Nükleus
rAAV	Rekombinant Adeno-Asosiye Virüs
TAE	Tris-Asetat-EDTA
tdTom	tdTomato
VTA	Ventral Tegmental Alan
i.c.v.	İntraserebroventriküler
i.p.	İntraperitoneal
aCSF	Yapay Beyin Omurilik Sıvısı

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 6.1.3.1. a) MCH ^{hM3Dq} spontan aktivitesi sırasında perfüzyona 5 µM klozapin eklenmesi sonucunda artan ateşleme oranı b) MCH ^{hM4Di} spontan aktivitesi sırasında perfüzyona 5 µM klozapin eklenmesi sonucunda azalan ateşleme oranı	39
Şekil 6.1.3.2. MCH ^{ChR2} ifadesi (yeşil) ve foto-uyarımın ardından yapılan anti-cFos antikoru (kırmızı) boyaması. Foto-uyarım sonrası cFos ifade eden MCH ^{ChR2} hücre sayısında anlamlı bir artış görülmüştür (p<0,05).	40
Şekil 6.2.1.1. Kemogenetik manipülasyonunun akut iştah üzerinde etkisi a) Gündüz döngüsü b) Gece döngüsü	41
Şekil 6.2.1.2. Kemogenetik MCH manipülasyonunun akut iştah üzerinde etkisi a) Dişi farelerde gündüz döngüsü b) Erkek farelerde gündüz döngüsü c) Dişi farelerde gece döngüsü d) Erkek farelerde gece döngüsü.	42
Şekil 6.2.2.1. MCHChR2 akut iştah üzerinde etkisi a) Gündüz döngüsü b) Gece döngüsü	43
Şekil 6.3.2. MCHChR2 ve MCHtdTom açık alan testi a) Orta alanda geçirilen süre b) Toplam mesafe c) Ortalama hız d) Açık alan ısı ve takip haritaları	45
Şekil 6.3.2. MCH ^{hM4Di} ve MCH ^{tdTom} açık alan testi a) Orta alanda geçirilen süre b) Toplam mesafe c) Ortalama hız d) Açık alan ısı ve takip haritaları	46
Şekil 6.4.1. MCH ^{ChR2} ve MCH ^{tdTom} yükseltilmiş artı labirent testi a) Açık kola giriş b) Geçirilen süre c) Ortalama hız d) Isı ve takip haritaları.....	47
Şekil 6.4.2. MCHhM4Di ve MCHtdTom yükseltilmiş artı labirent testi a) Açık kola giriş b) Geçirilen süre c) Ortalama hız d) Isı ve takip haritaları	47
Şekil 6.5.1. MCHChR2 ve MCHtdTom farelerde besin tüketimi ile eşleşmiş foto-uyarım sonrası yem tüketim yüzdesi.....	49
Şekil 6.6.1.1. MCHChR2 ve MCHtdTom farelerde burun hareketi ile a) Uyarımsız günlere oranla oto-uyarım yüzdesi b) Oto uyarım sonrası değişen tercih yüzdesi	50
Şekil 6.6.2.1. MCH ^{ChR2} ve MCH ^{tdTom} farelerde basamak ile a) Uyarımsız günlere oranla oto-uyarım yüzdesi b) Oto uyarım sonrası değişen tercih yüzdesi	52

RESİMLER LİSTESİ

Resim 6.1.1.1. a) MCH^{hM3Dq} enjeksiyonunun şematik gösterimi, b) MCH^{hM3Dq} ifadesi	36
Resim 6.1.1.2. a) MCH^{hM4Di} enjeksiyonunun şematik gösterimi, b) MCH^{hM4Di} ifadesi	37
Resim 6.1.2.1. a) MCH^{ChR2} enjeksiyonunun ve fiber optik implantasyonunun şematik gösterimi, b) MCH^{ChR2} ifadesi ve fiber optik izi	38
Resim 6.3.1. MCHChR2 açık alan testinin şematik gösterimi	44
Resim 6.3.3. MCH^{hM4Di} açık alan testinin şematik gösterimi	45
Resim 6.5.1. MCHChR2 ve MCHtdTom farelerde besin tüketimi ile eşleşmiş foto-uyarımın şematik gösterimi.....	48
Resim 6.6.1.1. MCHChR2 ve MCHtdTom farelerde burun hareketi ile besinden bağımsız oto-uyarım.....	50
Resim 6.6.2.1. MCHChR2 ve MCHtdTom farelerde basamak ile besinden bağımsız oto-uyarım	51
Resim 6.7.1. ChR2-eYFP enfeksiyon haritası.....	52

TABLolar LİSTESİ

Tablo 5.1.1. Yapılan DeneYlerde Kullanılan Biyolojik Materyaller ve Kimyasallar	15
Tablo 5.1.2. Yapılan DeneYlerde Kullanılan Gereçler.....	16
Tablo 5.2.2.2.1. PCR Protokolü	20
Tablo 5.2.3.4.1. %17 pürifikasyon çözeltisi.....	23
Tablo 5.2.3.4.2. %25 pürifikasyon çözeltisi.....	23
Tablo 5.2.3.4.3. %40 pürifikasyon çözeltisi.....	24
Tablo 5.2.3.4.4. %60 pürifikasyon çözeltisi.....	24
Tablo 5.2.10.1. Elektrofizyoloji kesme çözeltisi.....	32
Tablo 5.2.10.2. Yapay beyin omurilik sıvısı çözeltisi.....	33

1. ÖZET

MELANİN KONSANTRE EDEN HORMON NÖRONLARININ İŞTAH VE ÖDÜL REGÜLASYONUNDAKİ ROLÜ

İştah ve ödül algısı, fizyolojik birer durum olmanın yanı sıra, merkezi ve periferel sinir sisteminde bulunan çok karmaşık sinirsel ağlar tarafından kontrol edilmektedir. Hipotalamusta bulunan çekirdek ve alanların, enerji homeostazını düzenlediği ve ödül algısı yarattığı bilinmektedir. Lateral Hipotalamik Alan nöral alt gruplarından olan ve oreksijenik olduğu düşünülen Melanin Konsantre Eden Hormon (MCH) nöronları, önemli iştah ve ödül merkezleriyle sinaptik iletişim halinde bulunmakta, fakat etkisi ve rolü henüz bilinmemektedir. Bu çalışmada, MCH nöronlarının akut iştah ve ödül regülasyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır. *Pmch-cre* transgenik farelerin MCH nöronlarının akut aktivasyonunun ve inhibisyonunun kısa süreli iştah üzerindeki etkisi incelenmiştir. Elde edilen bulgular sonucunda, oreksijenik olduğu düşünülen bu nöronların, akut iştahı başlatmakta ve sürdürmekte yetersiz kaldığı belirlenmiştir. Optogenetik ve kemogenetik metotlar ile test edilen lokomotor aktivite düzeyinde bir farklılık saptanmamış; ancak MCH nöron baskılanmasının anksiyolitik etkileri olduğu gözlenmiştir. Ödül algısının anlaşılabilmesi için, MCH nöronlarının foto-uyarımı besin tüketimi ile eşleştirilmiş; tüketilen her besin için nöral aktivasyon sağlanınca besin tüketiminin arttığı anlaşılmıştır. Deneyler sonucunda bu nöronların iştahı etkilemediği tespit edildiğinden, gözlemlenen artışın MCH nöronlarının tetiklediği ödül algısından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Bu noktadan yola çıkılan deneylerde, besin veya post-oral bir ipucundan bağımsız olarak nöral aktivasyonun oto-uyarım olarak farelerin kontrole bırakılmasının, uyarım oranlarını anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, MCH nöronları akut iştahı başlatma ve sürdürmede yetersiz kalırken, bu nöronların uyarımının post-oral etmenlerden bağımsız olarak ödül algısını tetiklediği anlaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Akut iştah, kemogenetik, optogenetik, oto-uyarım, ödül algısı

2. ABSTRACT

THE ROLE OF MELANIN CONCENTRATING HORMONE NEURONS IN APPETITE AND REWARD REGULATION

Appetite and reward perception, besides physiological regulation, is controlled by complex neural networks in central and peripheral nervous system. Nuclei and areas in the hypothalamus are known to regulate energy homeostasis and create a sense of reward. Melanin Concentrating Hormone (MCH) neurons of Lateral Hypothalamic Area are thought to be orexigenic due to their synaptic communication with important appetite and reward centers. Yet, the role of MCH neurons in appetite and reward regulation remained known. In this study, the effect of MCH neurons on acute appetite and reward regulation was investigated. The effect of acute activation and inhibition of MCH neurons on short-term appetite was studied. The findings demonstrated that MCH neurons, which were initially thought to be orexigenic, remained ineffective in triggering or sustaining the appetite. Locomotor activities and anxiety levels were tested with optogenetic and chemogenetic methods. No difference was observed in locomotor activity, yet MCH neural inhibition exhibited anxiolytic effects. In order to evaluate their role in reward mechanism, photo-stimulation of MCH neurons was paired with food, where significant increase in food consumption was detected. Since MCH neurons were found to be ineffective in appetite control, this increase pointed out their rewarding characteristic upon stimulation. Therefore, the post-oral cues were removed, and neural activation was offered as self-stimulation. Interestingly, in the absence of a post-oral cue, the rate of MCH neuron self-stimulation rate elevated significantly. Collectively, MCH neurons are insufficient to initiate or maintain acute appetite, yet their activation triggers reward mechanisms independent of post-oral cues.

Key words: Acute appetite, chemogenetic, optogenetic, reward mechanism, self-stimulation

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Son yıllarda, sadece fizyolojik bir durum olduğu düşünülen iştah ve beslenmenin, aslında çok karmaşık sinirsel ağlar tarafından kontrol edildiği fark edilmiş ve çalışmalar bu alana yönelmiştir. Şimdiye kadar açlık ve tokluk regülasyonu yapan ve ödül algısı yaratan pek çok sinirsel ağ deşifre edilmiş olsa da, merkezi ve periferel sinir sistemlerinin enerji homeostazı üzerindeki rolü tamamıyla anlaşılamamıştır. İştah kontrolü ve ödül algısının sinir sisteminde birden fazla merkez tarafından yönetiliyor olması ve sinirsel ağların birbirleriyle olan bağlantılarının karmaşıklığı, bu alanda yapılan çalışmaların önemini arttırmaktadır (1, 2).

Merkezi sinir sistemi, organizmanın enerji durumunun algılanmasında ve kontrol edilmesinde anahtar rol oynamaktadır (3). Hipotalamus bölgesinde bulunan birçok çekirdek ve alanın, beslenme ve enerji homeostazını düzenlediği anlaşılmıştır. Bu sebeple, merkezi sinir sisteminin iştah kontrolü görevindeki en önemli mediatörün, hipotalamus bölgesi olduğunu söylemek mümkündür. Hipotalamus bölgesinde yer alan bazı çekirdek ve alanların aferent ve eferent projeksiyonları, organizmanın açlık ve tokluk kontrolünü sağlamakla kalmayıp, besinlere kodlanan ödül değerini de değiştirmektedir (4).

Lateral Hipotalamik Alan (LHA), birçok farklı hücre popülasyonunu bir arada bulundurması, oldukça heterojen bir bölge olması ve çok sayıda sinirsel ağlara sahip olması sebebiyle bu açlık-tokluk merkezinin en önemli alanlardan biri olarak kabul edilmektedir. LHA, karmaşık intra-hipotalamus projeksiyonlarının yanı sıra, merkezi sinir sisteminin farklı bölgeleriyle de iletişim halindedir. Bütün bu özellikler, Lateral Hipotalamus bölgesinin akut iştah kontrolü ve ödül algısı oluşumundaki rolüne işaret etmektedir (5, 6).

LHA bölgesinde farklı nöron alt grupları bulunmaktadır. Melanin Konsantre Eden Hormon (MCH) nöronları, LHA sınırları içerisinde, oldukça geniş yer kaplayan bir hücre popülasyonudur. Merkezi sinir sistemi boyunca yaygın bir projeksiyon ağına sahiptir. Kritik iştah kontrol ve ödül regülasyonu yapan merkezler ile bağlantılar

yapmaktadır. Bunun yanı sıra, MCH reseptörleri merkezi sinir sisteminde boyunca oldukça yaygın bir şekilde ifade edilmektedir (7).

Lateral hipotalamik Alan bünyesinde bulunan Melanin Konsantre Eden Hormon nöronlarının, enerji homeostazı, ödül ve uyku-uyanıklık düzenlemesinde rol oynadığı uzun süredir bilinmektedir. MCH nöronlarının intraserebroventriküler (i.c.v.) infüzyonu, gıda alımında akut bir artışa neden olmakta ve uzun süreli infüzyonu kilo alımını desteklemektedir (8). Genetik olarak MCH peptidinin aşırı ifadelendiği fare modellerinde, kilo artışı, insülin direnci ve artan hiperfajik davranış tespit edilmiştir. Pmch geninin aşırı ekspresyonu ise artan besin tüketimine bağlı kilo alımına neden olan kritik faktörlerdendir (9).

Öte yandan, MCH reseptör antagonistleri anti-obezite etkisine sahiptir (8, 10, 11). MCH peptidinin veya reseptörünün genetik olarak ablasyonu, zayıflığa ve yüksek yağlı diyetle indüklenen obeziteye dirence neden olur (9, 12-14). Benzer şekilde, MCH nöronları ablasyonlu olan fareler, gelişmiş bir glikoz toleransı ve geç başlangıçlı zayıflık sergilemektedir (15, 16).

Mevcut literatürdeki tüm bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, MCH nöronlarının beslenme davranışını düzenleyen tipik oreksijenik bir nöropeptit gibi davrandığı düşünülebilir. (17). Fakat yapılan tüm çalışmalar, genetik olarak MCH nöronlarının manipülasyonlarını kapsadığından, farklı kompensatuvar mekanizmaların devrede olabileceği düşünülmektedir. Dolayısıyla, bu nöronların akut iştah kontrolündeki rolü tam olarak deşifre edilememiştir.

MCH nöronlarının iştahı etkileyebileceği mekanizmalar net olmasa da, homeostatik ihtiyaçların ödül fonksiyonu ile ilişkilendirilmesi üzerine bir rol önerilmiştir (17-21). Yapılan çalışmalarda, glikozun *ex vivo* MCH nöronal aktivitesini arttırdığı (22, 23) ve bu aktivasyonda periferik glikoz homeostazının yanı sıra ödül fonksiyonunda da rol oynadığı ileri sürülmektedir (21, 23, 24). Buna rağmen, MCH nöron aktivitesinin ödül algısını etkileyip kısa vadeli iştahı akut bir şekilde değiştirip değiştiremeyeceği açık değildir. MCH nöron uyarımının, besinlerin veya post-oral ipuçlarından

bağımsız etmenlerin ödül algısına yaptığı katkı net değildir. Bunun temel sebebi ise manipülasyonların çoğunun, MCH nöronlarının konjenital ablasyonlarını, eksprese edilen genleri veya MCH reseptörü agonistlerinin ve antagonistlerinin farmakolojik uygulamasını içermesidir. Çok az çalışma, organizmaya ve stimülasyon zamanına bağlı olarak değişken sonuçlar veren MCH nöronlarının elektriksel aktivite değişikliklerinin rolünü ele almıştır (21, 23, 25). Bununla beraber, inhibisyonun akut etkisi henüz bildirilmemiştir.

Bu tez çalışmasında, kombine optogenetik ve kemogenetik yöntemler kullanarak, akut MCH nöronal aktivite manipülasyonlarının davranışsal ve fizyolojik etkilerinin; başka bir deyişle MCH nöronlarının akut iştah ve ödül regülasyonu üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. MCH nöron aktivasyonu ve inhibisyonunun, akut iştah üzerindeki rolünün deşifre edilmesi ve bu nöronların enerji harcaması, lokomotor aktivite ve anksiyete seviyesindeki etkilerinin anlaşılması hedeflenmiştir. Son olarak, MCH nöronlarının ödül algısına yaptığı katkı ve bu katkının oral veya post-oral bir ipucuna bağımlı olup olmadığının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Beslenmenin Hipotalamik Kontrolü

Merkezi sinir sistemi, iç ve dış uyaranlara yanıt olarak açlık-tokluk duygusunu oluşturmaktan ve gıda alım davranışlarını kontrol etmekten sorumludur (26). Yapılan çalışmalar, obezite patogeneğinde yer alan merkezi süreçleri anlamak ve potansiyel ilaç hedeflerini belirlemek için, hipotalamik fonksiyonları anlamaya odaklanmıştır. Son yıllarda, besin tüketimi, enerji harcaması, ödül algısı, üreme, cinsel davranış, saldırganlık, sosyal davranış ve termoregülasyon gibi birçok davranış ve fizyolojik adaptasyonun kontrolünün, hipotalamik modülasyonları tarafından gerçekleştiği anlaşılmıştır (27-30).

Merkezi sinir sistemi, organizmanın enerji durumunun hissedilmesinde ve kontrol edilmesinde anahtar rol oynar (3). Hipotalamus, beslenme ve enerji homeostazını sağladığı için, merkezi sinir sisteminin kritik düzenleyicilerindedir. Hipotalamus bölgesinde bulunan Arkuat çekirdek (ARC), beslenme ve metabolizmanın düzenlenmesinde kritik öneme sahiptir. ARC, “geçirgen” kan-beyin bariyerine yol açan kapilerlere sahip olan median eminens (ME) bölgesine yakın yer almaktadır. ME, periferel hormon ve besin sinyallerinin taşınmasını ve bunların ARC nöronları tarafından tanınmasını sağlar (31). Bu sayede ARC periferel dolaşımdaki hormonal ve besinsel metabolik sinyalleri algılayarak koordine bir geri besleme tepkisi verir. Arkuat çekirdek, yoğun sinirsel ağlar aracılığıyla Lateral Hipotalamik Alan (LHA), Paraventriküler Hipotalamik Çekirdek (PVN), Dorsomedyal Hipotalamus (DMH) ve Ventromedial Hipotalamus (VMH) bölgeleri ile bağlantılı halde bulunmakta, dolayısıyla bu bölgelerin de açlık – tokluk mekanizmalarında etkili olduğuna işaret etmektedir (26).

ARC bölgesi ile diğer hipotalamik bölgeler ile bağlantı halinde olduğunun bulunmasının ardından, çalışmalar bu bölgeler üzerinde yoğunlaşmıştır. Farklı hipotalamik bölgelerin işlevlerini tayin edebilmek için lezyon çalışmaları yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda hipotalamik bölgelerin zıt yönlerde açlık – tokluk kontrolü

yaptığını göstermiştir. Buna göre, LHA bölgesinin işlevsizleştirilmesi veya lezyonlarının, hipofajik, zayıf bir fenotipe yol açar. Bu durum LHA bölgesinin gıda alımını tetikleyici rolünü vurgulamaktadır (32). Öte yandan, PVN bölgesinin işlevsizleştirilmesi veya çıkarılması aşırı yeme ve obeziteye yol açmakta, dolayısıyla bu bölgede bulunan nöronların besin tüketimini baskılayıcı etkiye sahip olduğu anlaşılmaktadır (33). VMH bölgesi ortadan kaldırıldığında hiperfaji ve obezite (34), DMH bölgesi ortadan kaldırıldığında ise hipofaji ve zayıf fenotip (35) görülmektedir. Fakat, bu çalışmalarda yapılan manipülasyonlar, tüm hipotalamik çekirdek veya alanda lezyon yapmak üzerine kuruludur. Dolayısıyla bu çalışmalar, incelenen hipotalamik bölgelerde bulunan nöronların işlevlerini açıklamada yetersiz kalmıştır.

İlerleyen zamanlarda yapılan çalışmalarda, arkuat çekirdekte, oreksijenik (iştah arttırıcı) AgRP/NPY nöronları ve anoreksijenik (iştah baskılayıcı) POMC nöronları olmak üzere fonksiyonel olarak birbirine antagonist iki farklı nöron tipi bulunduğu gösterildi (36). Zıt beslenme davranışlarını regüle etmek için kendi nöron alt gruplarını barındıran arkuat çekirdek içindeki bireysel nöronların keşfedilmesiyle (37, 38), hipotalamik beslenme ve tokluk merkezleri fikri güncelliğini yitirdi. Hipotalamik çekirdek ve alanların beslenmeyi düzenlediği düşüncesinin yerini, zıt etkili beslenme ve tokluk nöronları aldı.

4.2. Beslenme Mekanizmalarında Hipotalamik Nöron Alt Grupları

Arkuat çekirdek bünyesinde, beslenme regülasyonu bakımından birbirleri ile zıt fonksiyonları olan AgRP ve POMC nöronlarının keşfi sonrası, çalışmalar hipotalamik nöron alt gruplarına yöneldi.

Gıda alımını takiben, POMC kırılarak α -melanosit-stimule eden hormona (α -MSH) dönüştürülür. α -MSH ise PVN bölgesindeki nöronlar da dahil olmak üzere yolağın altındaki nöronlarda melanokortin 3 ve 4 reseptörlerini (MC3/4) aktive eder ve bu sayede gıda alımı azalır, enerji harcanımı ise artar (39). Her ne kadar MC4R ekspresyonu beyin farklı bölgelerinde yaygın dağılım gösterse de (40, 41), hipotalamusta en yüksek MC4R ekspresyonu PVN bölgesinde bulunur (42, 43). Bu

durumla tutarlı bir şekilde, fare çalışmalarında MC4R'nin özellikle PVN bölgesinde ortadan kaldırılmasının glukoz homeostazındaki bozulmalara ek olarak hiperfaji ve azalmış enerji harcanımının sonucunda obeziteye yol açtığı gösterilmiştir (44, 45). MC4R aktivasyonunun gıda alımının düzenlenmesinde, beyin-kökenli nörotropik faktör (BDNF) (46, 47), kortikotropin-salgılatıcı hormon (CRH) (48) ve tirotropin-salgılatıcı hormon (TRH) (49, 50) gibi alt mediatörlerin bulunduğu düşünülmektedir. Her ne kadar gıda alımının hipotalamik melanokortinerjik nöronlar tarafından sabit bir şekilde baskılandığı düşünülse de (51), MC4R aktivasyonu, sempatik sinir sisteminin aktivitesini arttırarak kahverengi adipoz doku aktivasyonuna yol açmak suretiyle enerji harcanımını yükseltir (52, 53). POMC nöronların özellikle LHA, PVN, DMH ve VMH bölgelerinde bulunan ikinci-derece nöronlara uzanım yaparlar. Bu ikinci derece nöronlar, alınan bilgiyi işleyerek hipotalamus dışında bulunan ve karmaşık bir trafiğe sahip farklı sinir ağlarına iletir. Dolayısıyla, enerji alımı ve harcanımı olarak cevap oluşmasını sağlarlar (54).

Açlık durumunda AgRP/NPY nöronları uyarılır (55) ve bu nöronlar aynı anda NPY ve AgRP salgırlar. NPY, NPY Y1 (56) ve Y5 (57-59) reseptörlerini aktive ederek doğrudan gıda alımını uyarır (60, 61). Ayrıca NPY Y1-reseptörü aracılığıyla PVN ve beyin kökünde tirozin hidroksilaz ekspresyonunun düşmesini sağlayarak kahverengi adipoz dokusuna giden sempatik uyarımın, dolayısıyla da aktivitesinin azalmasına yol açar. Bu sayede enerji harcanımını azaltır (62). PVN bölgesinde bulunan nöronlar, periferal organlara sempatik sinyal akışını düzenler (63) ve bir dizi düzenleyici nöropeptit salgılar (64). PVN nöronları beslenmeyi destekleyen LH nöronlarından inhibe edici innervasyon alırken POMC ve AgRP / NPY nöronları VMH ve PVN gibi diğer hipotalamik çekirdeklerden aktiveleştirici glutamaterjik geribildirim girdisi alır, ve bu da gıda alımını düzenleyen ince ayarlanmış bir yanıtla sonuçlanır (65). LHA, ARC^{POMC} ve ARC^{AgRP} nöronlarından güçlü girdi alır ve her iki nöron ve bunların peptitleri, LHA nöronlarındaki nöronal aktiviteyi modüle edebilir (66, 67).

4.3. Lateral Hipotalamik Alan

Lateral hipotalamik alan (LHA) birçok farklı hücre popülasyonunu içeren büyük ve heterojen bir bölge olup, hipotalamusun diğer bölgelerle en çok bağlantı barındıran alanıdır. Bu durum, LHA'nın içsel ve dışsal bilgi alımını kolaylaştırarak bilişsel, iskelet motor, otonomik ve endokrin fonksiyonlarda görev almasını sağlar (68).

Preoptik alanın posteriorunda ve ventral tegmental alanın anteriorunda yer alan LHA, sinir sistemi boyunca yaptığı uzanımlar sayesinde çeşitli bilişsel ve fizyolojik süreçleri kontrol etmekte önemli bir rol oynar. LHA'nın fizyolojik süreçleri kontrol etmedeki rolü, 1940'lardaki lezyon çalışmalarından sonra dikkat çekmeye başlamıştır (69).

LHA nöronları, hipotalamusun en büyük nöronlarıdır ve bu nöronlar arasında beyin-omurilik ekseni boyunca uzanım yapan oreksin nöronları ve melanin konsantre eden hormon nöronları başı çeker. LHA, hipokampal yapı, amigdala, bazal gangliyonlar, talamus, orta beyin, pons, beyin sapı, omurilik ve hipotalamusun birçok farklı hücre popülasyonuna uzanım yapmaktadır. LHA aferentlerinin ise, prefrontal/orbitofrontal, insular ve koku alma korteksi, amigdala, hipokampal yapı, nükleus akumbens kabuğu ve beyin sapı gibi farklı kortiko-limbik yapılardan köken aldığı gösterilmiştir (59, 70-74).

4.3.1. Lateral Hipotalamik Alanın İştah Regülasyonu

LHA'yı hedef alan lezyonların beslenme ve içme davranışlarını baskıladığını göstermiştir (69). Norepinefrin ya da dopamin içeren katekolaminerjik liflerin kimyasal lezyonlarla hasara uğratıldığı sonraki çalışmalarda, medyan ön beyin demetindeki bu geçiş liflerinin beslenme ve içme davranışını kontrol eden önemli regülatörler olduğu gösterilmiştir. LHA somatasını ortadan kaldıran fakat geçiş liflerini hasarlandırmayan kimyasal lezyonlar beslenme ve içme eylemlerini baskılamaktadır (70, 75, 76). Kemirgenlerde LHA'nın elektrik aracılığıyla

uyarılmasını hedef alan çalışmalar, bu bölgedeki elektriksel aktivitenin farklı beslenme davranışlarını tetiklediğini göstermiştir (72-74).

Lateral Hipotalamik Alanda, homeostatik ve hedonik beslenmede zıt rollere sahip uyarıcı glutamat ($LHA^{glutamat}$) ve inhibe edici GABA (LHA^{GABA}) nöronlarının geniş dağılımları mevcuttur (2). LHA^{GABA} nöronları, gıda alımını teşvik ederken (1), $LHA^{glutamat}$ nöronları, gıda alımını inhibe eder (77). LHA^{GABA} nöronları, iştah açıcı veya tüketici beslenme davranışları sergileyen ayrı nöronal popülasyonlardan oluşur (1). Hipokretin/oreksin (Hcr/ox) ($LHA^{Hcr/ox}$) ifade eden nöronlar uyarılma ve besin ödül algısı (78) ile ilişkilendirilmiştir. Lateral habenula bölgesine projeksiyon yapan $LHA^{glutamat}$ nöronları, beslenmeyi bastırır ve isteksizliği teşvik eder (79). Bu nedenle, $LHA^{glutamat}$ nöronları beslenmeyle ilgili aktivasyon modellerine dayalı olarak nöronal alt gruplara ayrılabilir. LHA tipik olarak hipotalamik sinyallerin bir entegratörü olarak görülür, ancak iştah ve besin tüketimi ile ilişkili nöronların yoğunluğu, LHA seviyesinde daha fazla nöronal besleme devrelerinin varlığına işaret eder.

4.3.2. Lateral Hipotalamik Alan Kontrolünde Ödül Algısı

LHA'nın beyin ödül sistemindeki rolü, esas olarak kemirgen çalışmalarında intrakraniyal olarak kendi kendini uyarma yoluyla gösterilmiştir. Deney hayvanlarının ödüllendirici LHA elektriksel uyarımını almak için, isteyerek harekete geçtiği saptanmıştır (72-74). LHA oto-uyarımının ödüllendirici etkisi, büyük ölçüde dopamin ve opioid sistemlerinden etkilenir. Çünkü bu sistemlerdeki tahribatın kendi kendini uyarma davranışını bastırdığı veya bozduğu gösterilmiştir (72-74). GABAerjik nöronlar, bir ödülün verilmesini öngören ipuçlarına yanıt vermeyi öğrenmede de önemli bir rol oynar. Öğrenme, ödül süreçleri ve beslenme davranışı için çok önemli olduğu bilinen ve dopamin nöronları açısından zengin bir merkez olan ventral tegmental alan (VTA), LHA'nın GABAerjik nöronlarından da projeksiyonlar alır (80).

Lateral Hipotalamik Alan sınırlarında yapılan elektriksel oto-uyarım sonucu gözlenen ödül algısını anlamayabilmek için, LHA bölgesinde bulunan farklı nöron alt gruplarını incelemek gerekmektedir.

Her iki LHA popülasyonu, VTA bölgesine yaptığı projeksiyonları ile ödül algısı bakımından değerlendirilmelidir. LHA^{GABA} > VTA aferentleri VTA^{dopamin} nöronlarını (VTA^{GABA} inter-nöronlarının disinhibisyonu ile) uyarırken, LHA^{glutamat} > VTA aferentleri VTA^{dopamin} nöronlarını (VTA^{GABA} inter-nöronlarının uyarımı ile) inhibe eder (80). LHA^{glutamat} nöronları, lateral habenula yoluyla gıda alımının inhibisyonuna aracılık eder. Dolayısıyla beslenmeyi ve ödül algısının kattığı değerleri modüle eden ve muhtemelen bağımsız etkili devrelerin varlığını destekler (79).

LHA^{GABA} nöronları, uzun formu leptin reseptörü (Lepr), nörotensin (Nts) ve galanin eksprese eden nöronlardan oluşur ve bunların tümü, LHA^{Hcr/oreksin} nöronlarını ve ödül algısını innerve eder ve yiyecek ödülü (7, 81, 82). Nts ve galanin birçok LHA nöronunda birlikte eksprese edilir (68). LHA^{Nts} nöronları VTA'yı innerve ederken, LHA^{galanin} nöronları lokus coeruleus'u (LC) innerve eder (81, 82). LHA^{galanin} nöronlarının aktivasyonu, LHA^{GABA} nöronlarının aktivasyonuna benzer şekilde besin ödül değerini artırmak için yeterlidir. LHA^{galanin} nöronları, metabolik beslemeyi etkilemeden hedonik beslemeyi artırabilir (83). LH^{Nts} nöronlarının aktivasyonu, metabolik gıda alımını baskılar, ancak hedonik beslenme üzerinde etki gösteremez (84).

4.4. Melanin Konsantre Eden Hormon Nöronları

Melanin konsantre eden hormon (MCH) nöronları merkezi sinir sistemi boyunca uzanım yapar ve MCH reseptörleri beyinde yaygın ekspresyon göstermektedir. MCH reseptör ekspresyonu, özellikle orbitofrontal, prelimbik, sensorimotor, motor ve piriform korteks, koku alma yolları, nükleus akkumbens kabuğu, striatum, hipokampus, locus coeruleus ve NTS başta olmak üzere korteks boyunca yüksek gözlenir (85, 86).

Melanin konsantre eden hormon, 165 amino asitlik preprohormondan kodlanan 19 amino asitlik halkasal bir peptittir (87). MCH nöronlarının birçok davranışla bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Karşılaştırma yapılan bütün memeli MCH amino asit sekansları aynı çıkmıştır. Dolayısıyla hayli korunmuş bir proteindir. Bunun yanında alternatif kırılan preproMCH peptitleri iki çeşit daha peptit üretir; nöropeptit E-I (NEI) ve nöropeptit G-E (NGE) (88).

Bazı MCH nöronları, GABA (glutamatik asit dekarboksilaz; GAD67) belirteçleri ifade ederken, diğerleri glutamat (Vglut2) belirteçleri ifade eder (86). Bu durum, MCH nöronlarının inhibitör ve aktivatör alt kümelerden oluştuğunu göstermektedir.

4.4.1. MCH Nöronlarının Enerji Homeostazı ve Ödül Algısındaki Rolü

MCH nöronları beslenme ve uyku-uyanıklık dengesinin düzenlenmesinde rol oynar. MCH peptidinin intraserebroventriküler enjeksiyonların kemirgenlerde beslenmeyi ve vücut ağırlığını gösterilmiştir (8). Yapılan genetik çalışmalar, MCH peptidinin aşırı ekspresyonunun hiperfaji ve obeziteye yol açtığını ortaya koyarken, MCH nöronları veya MCH peptidi olmayan fareler hipofajik ve zayıftır (14, 15). MCH infuzyonu veya MCH peptidinin genetik olarak aşırı ifadelendiği deneylerde, insülin direnci, obezite, besin tüketimi ve yağ kütlelerinde artış gözlenmiştir (8).

Obez bireylerin genetik analizi MCH ve MCH reseptörlerinin farklı varyantlarını ortaya çıkartmıştır. Fakat zayıflık ya da obezite ile hangi farklılıkların ilişkili olduğu kesin bir sonuca vardiirilmamıştır. Bir ilişkilendirme çalışmasında, erken onset ciddi obezite ve hiperfaji öyküsü olan 106 bireyde MCHR1'in iki missense varyantı tanımlanmıştır: Y181H ve R248Q. Bunların ikisi de, 192 kişilik normal ağırlıklı kontrol grubunda bulunamamıştır. R248Q, iki jenerasyonda obezite ile beraber ilerlerken, Y181H varyantıyla ilgili aile datasına ulaşılammıştır. R248Q varyantının fonksiyonel cevabına bakıldığı zaman konstitütif aktivasyon, cAMP sinyalizasyonunda bir değişiklik veya ligand hipersensitivitesi saptanmamıştır (89).

Yapılan in vivo çalışmalar merkezi sinir sisteminin yönettiği, enerji homeostazisi, uyku ve uyanıklık ve duygusallık dahil bazı fizyolojik süreçlerin, MCH peptitleri tarafından yönetildiği göstermiştir (90-92). Az çalışılmış olsa da, MCH peptidinin rolü, bağırsak ve pankreatik islet fonksiyonu gibi periferi dokularda da gösterilmiştir (93, 94). Nörobiyoloji, kemirgen genetiği ve kemirgen farmakoloji çalışmaları MCH peptidinin ve MCH reseptörünün vücut ağırlığını regüle ettiğini göstermiştir (95, 96). Bu bilgiye dayanarak, birçok farmakoloji çalışmaları obeziteyi tedavi etmek amaçlı MCHR1 antagonisti geliştirmeyi amaçlamıştır (96). Şimdiye kadar birkaç MCHR1 antagonisti saptanmış olsa da, klinik çalışmalarda obeziteyi engelleyen etkili bir bileşik saptanamamıştır. Etkili bir tedavinin bulunamamış olmasının MCHR1 yolağının tam olarak tesirinin olmamasından mı yoksa güvenli, tolere edilebilecek ve yüksek etkili ve farmakodinamik özellikleri olan bir bileşiğin daha üretilmemiş olmasından mı olduğu tam olarak bilinmemektedir.

MCH peptit ve nöronunun enerji homeostazisi üzerindeki etkilerini araştıran bir çalışmada, ataksin-3 ile nöron ablasyonu yapıldı ve MCH nöron aktivasyonunu susturuldu. Bu farelerde, gelişim boyunca Promch geni mevcutken, yaşamın ilk birkaç haftasında MCH nöronların %60-70'i dejenere oldu (15). MCH ablasyonlu fareler 7 haftalık olduktan sonra, düşük vücut ağırlığı, baskılanmış boy uzaması, düşük yağ kütlesi, yağsız kitle ve leptin seviyeleri geliştirdi (15). Bu farelerde zayıflık, hipofaji ve artan enerji harcaması gözlemlendi. Leptin eksikliği olan ob / ob farelerde, Promch veya MCH nöronların kaybı obeziteyi, diyabeti ve hepatik steatozu iyileştirdi. Bu durum MCH nöronlarının leptin eksikliğine verilen yanıtın önemli bir aracısı olduğunu düşündürmektedir (15, 97)

MCH nöronları glikoza duyarlıdır; hücre dışı glikoz seviyeleri yükseldiğinde artan aktivite gösterir (22, 24). MCH nöronları, dopaminerjik nöronların bulunduğu striatum ve orta beyindeki ödül merkezlerine yoğun projeksiyonlar gönderir. Ek olarak, MCH nöronları, dopaminerjik nöronların bulunduğu striatum ve orta beyindeki ödül merkezlerine yoğun projeksiyonlar gönderir. MCH nöronları ile ödül çekirdekleri arasındaki bu güçlü anatomik bağlantı ve ayrıca MCH nöronlarının glikoz seviyelerini algılaması, bu hipotalamik nöronların sakarozun ödül değerini aktarmada bir rol oynayabileceğine işaret etmektedir (21).

Mevcut literatüre göre, MCH nöronları, glikoz algılama ve şeker ödülü arasında temel bir bağlantı görevi görür. Yapılan çalışmalar, MCH nöronlarının ödül değeri yüksek, doğal hedonik besinlerin, yapay hedonik besinlere tercih edilmesini sağlayan nöronal devrelerin önemli bir bileşenini olduğuna göstermektedir (21, 22). Dolayısıyla, MCH nöronlarına bağlı glikoz hassasiyetinin, ödül değeri taşıdığı düşünülmektedir.



5. MATERYAL VE METOT

5.1. Materyal

Tablo 5.1.1. Yapılan Deneylerde Kullanılan Biyolojik Materyaller ve Kimyasallar

Biyolojik Materyaller ve Kimyasallar	Marka	Ürün Kodu
anti-MCH primer antikoru	Phoenix Pharmaceuticals	H-070-47
Anti-cFos primer antikoru	Cell Signaling	2250
Keçi anti-tavşan IgG (H+L) Alexa Fluor® 488 (Thermo Scientific)	Life Technologies	A11008
Keçi anti-tavşan IgG (H+L) Alexa Fluor® 633 (Thermo Scientific)	Life Technologies	A21070
Keçi Serumu	Sigma-Aldrich	G9023
LB Agar	Biomatik	A8523-500G
LB Broth	Biomatik	A8523-500G
Kontrol ve transgenik primerler	Sentegen	
rAAV plazmitleri	Addgene	
293AAV hücre hattı	Cell BioLabs	AAV-100
Sodyum Pirüvat ($C_3H_3NaO_3$)	Sigma-Aldrich	P5280
Ethanol	Sigma-Aldrich	46139
Glasiyal Asetik Asit	Sigma-Aldrich	537020
Agaroz	Sigma-Aldrich	A9539
Glutamax-I	Gibco	35050-061
Paraformaldehit	Sigma-Aldrich	15127
Fosfat Tamponlu Tuz (PBS)	Multicell	311-010-CL
Fenol Kırmızısı	Capricorn	600-070-IG
OptiPrep™ Density Gradient Medium	Sigma-Aldrich	D1556
Benzonase	Sigma-Aldrich	E8263
Trypsin (0,25%) in DPBS	Capricorn	CPTRY2B
DMEM High Glucose	Multicell	WS319005CL
EndoFree Plasmid maxi kit	Qiagen	12362
D-Sorbitol High Purity	Sigma-Aldrich	BMA2450
SafeView	Alfagen	G108
Gel Loading Dye Purple (6X)	NEB	B7024 S

Taq PCR Kit	NEB	E5000 S
Fluoromount Mounting Medium	Sigma-Aldrich	F4680
Triton X-100	Sigma-Aldrich	X100
Clozapine N-Oxide	Enzo LifeSciences	BML-NS105
Klozapin		
Sükroz	Sigma-Aldrich	0389
Dekstroz	Sigma-Aldrich	D9434
Sodyum Askorbat (C ₆ H ₇ NaO ₆)	Sigma-Aldrich	PHR1279
Opti-MEM Reduced Serum Medium	Life Technologies	51985-034

Tablo 5.1.2. Yapılan Deneylerde Kullanılan Gereçler

Kullanılan Gereçler	Marka	Ürün Kodu
Coulbourn Metabolik Kafesleri	Harvard Apparatus	
Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter	Millipore	UFC910024
OptiSeal Santrifüj Şişeleri	Thermo Scientific	7600302
MicroPunch	Harvard Apparatus	340140
Portatif Anestezi Cihazı	Beyza Medikal	
Micromotor	Istanbul Dis Deposu	
One-axis Oil Hydraulic Micromanipulator	Narishige	MO-10
Drummond Wiretrol™ II Kalibre Mikropipet	Minstar	
Peristaltik Pompa	Fisher Scientific	21-176-2A
0,2 mL PCR tüpleri	Isolab	123.01.002
ChemiDoc™ MP System	BioRAD	
Çalkalayıcı	Benchmark Scientific	BR2000
dH ₂ O Cihazı	Millipore	ZRQSV8W
Ear Tag	Harvard Apparatus	52-4717
Eppendorf® LoBind Microcentrifuge Tube	Sigma-Aldrich	Z666505
Manyetik Karıştırıcı	Benchmark Scientific	H400HSB
Multi-Therm Çalkalayıcı	Benchmark Scientific	H5000-HC
pH metre	Isolab	pH7110
PowerPac™ Universal Power Supply	BioRAD	1645070
Santrifüj	Orto Alsera	Biocen 22R

Spectrometre cihaz	BioRAD	
T100™ Thermal Cyclers	BioRAD	1861096
Tartı	Ohaus Explorer	EX124-US
Ultrasonikator	Bandelin Sonarex	
Vorteks	Benchmark Scientific	BV1000
Konfokal Mikroskop	Zeiss	LSM-780
Konfokal Mikroskop	Zeiss	LSM-800
Vibratom	Leica	VT1000S
Mikropipet Çekici	Sutter Instruments	P-1000
Stereo Mikroskop	Zeiss	Discovery V8



5.2. Metot

Bu tez çalışmasında, polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile genotipleri tayin edilerek *Pmch-cre* transgenik fareler kullanıldı. Pürifiye edilmiş rekombinant adeno-asosiyeye virüsler üretildi. İntrakraniyal enjeksiyon tekniği ile beynin Lateral Hipotalamus bölgesinde bulunan Melanin Konsantre Eden Hormon nöronlarında tdTomato, hM3D, hM4D ve ChR2-cre genleri taşıyan adeno-asosiyeye virüs transdüksiyonu gerçekleştirildi. Lateral Hipotalamik alanda bulunan bu nöronların uyarımının ve inhibisyonunun iştah kontrolü üzerindeki etkisi kemogenetik ve optogenetik yöntemlerle incelendi. Bu nöronların uyarımı elektrofizyolojik yöntemlerle gösterildi. *Pmch-cre* transgenik farelerin kemogenetik aktivasyonu ve inhibisyonunun şartlanma sonrası tat tercihindeki rolü gösterildi. Yapılan oto-uyarım deneyleri ile bu nöronların ödül algısında yarattığı değişim tespit edildi. Açık alan ve yükseltilmiş artı deneyleri ile Melanin Konsantre Eden Hormon nöronlarının anksiyete üzerindeki etkisi incelendi.

5.2.1. Transgenik deney hayvanları

Tg(*Pmch-cre*)1Lowl/J (Jackson Laboratuvarı Stok No: 014099) hemizigot transgenik fareler Jackson Laboratuvarı'ndan satın alınmıştır. Bu transgenik farelerin Lateral Hipotalamus bölgesinde bulunan Melanin Konsantre Eden Hormon nöronlarında cre enzimi ifade edilmektedir ve bu sebeple *Pmch-cre* transgenik fareler olarak da bilinmektedir. Erkek *Pmch-cre* transgenik fareler, dişi C57BL/6 yabanıl tip fareler ile veya dişi *Pmch-cre* transgenik fareler, dişi C57BL/6 yabanıl tip fareler ile çaprazlandı. Doğan yavrular 21 ila 28 günlüğe ulaştıklarında, yavrular izofloran inhalasyonu ile anestezi altına alınarak, kulaklarından doku örnekleri alındı ve doğan yavruların genotipleri belirlendi. Yapılan genotipleme testlerine göre transgenik olduğu belirlenen dişi ve erkek *Pmch-cre* transgenik fareler deneyler için ayrıldı. Deney grupları toplam 60 adet (30 dişi ve 30 erkek) *Pmch-cre* transgenik fare ile oluşturuldu. Transgenik ve yabanıl tüm farelerin bakımı ve üretimi İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırma Merkezi (MEDİTAM) tarafından gerçekleştirildi.

Hayvan deneyleri, İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İMÜ-HADYEK) tarafından onaylanmıştır (Karar No:69).

5.2.2. Genotipleme

Yavru fareler doğumdan itibaren, deneylere kadar annelerinden ayrılmadı ve yavrular 21 ila 28 günlüğe ulaştıklarında genotipleri tayin edildi. Deneylerde cinsiyet farkını ortadan kaldırmak için dişi ve erkek transgenik fareler birlikte kullanılacağından, doğan tüm yavrulara cinsiyet ayırt etmeksizin genotipleme yapıldı.

5.2.2.1. DNA elde etme

Yavru farelerden, doğumdan sonraki 21 ila 28 günlerde genotipleme için gereken doku alımı gerçekleştirildi. Kısa süreli izofloran inhalasyonu ile anestezi altına yavru farelerin bir kulağına deneyler süresince kullanılmak üzere numaralı kulak küpesi takıldı ve fareler deneyler boyunca bu numaralar ile adlandırıldı. Yavru farelerin diğer kulağından ise kulak delme pensi yardımıyla bir miktar doku 0,2 mL PCR tüplerine alınarak, farelerin kulak küpesi numaralarına göre adlandırıldı. Her bir tüp içine 75 µL 25 mM NaOH/EDTA eklenerek, yavru farelerden alınan kulak dokuları numaralarına göre tüplere koyuldu. 0,2 mL PCR tüpleri, 1 saat boyunca 98°C sıcaklıkta T100™ Thermal Cycler PCR cihazında ısıtıldı. Ardından tüplerin içine 75 µL 40 mM Tris/HCl eklenerek toplam hacmi 150 µL olan tüpler 4000 rpm hızında 3 dakika boyunca santrifüj edildi. DNA içeren süpernatantlar, farelerin numaralarına göre adlandırılmış yeni tüplere aktarıldı.

5.2.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

İçinde DNA bulunan süpernatantlar ile polimeraz zincir reaksiyonu yapıldı. 10X Reaksiyon tampon çözeltisi, 0,5 M ortak primer, 0,5 M transgenik geri primeri, 200 M dNTP çözeltisi, 1,25 ünite/50 PCR Taq Polimeraz enzimi ve ddH₂O ile kontrol PCR karışımı ve 10X Reaksiyon tampon çözeltisi, 0,5 M ortak primer, 0,5 M iç

pozitif kontrol geri primeri, 200 M dNTP cozeltisi, 1,25 ünite/50 PCR Taq Polimeraz enzimi ve ddH₂O ile transgenik PCR karışımı belirtilen oranlarda hazırlandı. Her bir fare için ayrı ayrı hem kontrol hem de transgenik PCR karışımı hazırlandı. Farelerden elde edilen DNA örnekleri, numaralarına göre tüplere eklendi. Hazırlanan PCR tüplerinin son hacimleri, ddH₂O kullanılarak 12 µL'ye tamamlandı. Negatif kontrol olması amacıyla, içinde DNA bulunmayan fazladan bir tüp hazırlandı. Sadece PCR karışımı içeren bu tüpün son hacmi, ddH₂O ile tamamlandı Polimeraz zincir reaksiyonlarında kullanılan primer dizileri (5' → 3'); Ortak primer: GAA AAG ATA AGG CCT TCA AGT GCT, iç pozitif kontrol geri primeri: GAT CTT TCT GCA GTA TCT TCC TTC ve transgenik primer: ATC GAC CGG TAA TGC AGG CAA olacak şekilde dizayn edildi.

0,2 mL PCR tüpleri içinde hazırlanan karışımlar, T100™ Thermal Cyclus cihazına yerleştirildi. Tablo 5.2.2.2.1'de verilen polimeraz zincir reaksiyonu protokolü ile amplifikasyon gerçekleştirildi.

Tablo 5.2.2.2.1. PCR Protokolü

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

5.2.2.3. Agaroz jel elektroforezi ve görüntüleme

40 mM Tris/HCl, 20 mM Glasiyal asetik asit, 1mM pH:7,6 EDTA kullanarak 1X TAE tampon çözeltisi hazırlandı. %3'lük agaroz çözeltisi hazırlamak için, 100 mL 1x TAE tampon çözeltisi içine, 3 g agaroz eklendi. Hazırlanan solüsyon berraklaşana kadar 200 °C'de kaynatıldı. Şeffaf hale gelen çözeltiliye 5µL Safeview eklendi ve karıştırıldı. Bio-Rad marka elektroforez kasetine yükleme tarakları takıldı. Berraklaşan %3'lük agaroz çözeltisi, elektroforez kasetine döküldü ve katılaşması

beklendi. Hazırlanan çözelti jel kıvamına gelince elektroforez tankına yerleştirildi ve bu tank 1X TAE tampon çözeltisi ile dolduruldu. Yükleme taraklarının çıkartılması ile jel içinde kuyular belirginleşti. İlk kuyuya 5 µL hacminde belirteç yüklendi. Diğer kuyulara ise numuneler eklendi. 9 µL PCR ürünü ve 1 µL yükleme boyası karıştırıldı ve farelerin kulak numaraları baz alınarak, sırasıyla kuyulara yüklendi. 25 dakika 100V potansiyel uygulandı ve örnekler yürütüldü. Ardından, BioRAD ChemiDoc cihazı ile agaroz jel görüntüledi. 200 ve 306 baz çiftlerinde 2 bant görülen örneklerin *Pmch-cre* transgenik farelere ait olduğu, tek bant görünen örneklerin ise yabani farelere ait olduğu bilindiğinden, fareler kulak numaralarına göre genotiplerine ayrıldı.

5.2.3. Rekombinant adeno-asosiye virüs üretimi

Addgene firmasından, rekombinant adeno-asosiye virüs üretiminde kullanılmak üzere, kompetant Stbl3 *E. Coli* transformasyonu ile yapılmış ve ampisilline dirençli CAG-FLEX-tdTomato, EF1a-DIO-hM3D(Gq)-mCherry, EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry ve EF1a-FLEX-hChR2(H134R)-eYFPWPRE-HGHpA ana vektörlerini içeren plazmitler ile 2/1 yardımcı vektör ve helper yardımcı vektör plazmitleri satın alındı. Jel besi yeri içinde bakteriyel sürüntü olarak temin edilen plazmitler, hemen çoğaltılmaya başlandı.

5.2.3.1. Plazmit DNA çoğaltma

ddH₂O kullanarak, 35 g/L konsantrasyonunda LB agar çözeltisi ve 20 g/L konsantrasyonunda LB sıvı besi yeri hazırlandı. Hazırlanan LB agar çözeltisi ve LB sıvı besi yeri otoklavlandı, sterilize edildi ve soğumaya bırakıldı. Addgene firmasından satın alınan plazmitlerin ampisiline dirençli olması sebebiyle, LB agar çözeltisine 100 µg/mL konsantrasyonunda ampisillin eklendi. 10 cm polistiren petri kaplarına, yaklaşık %65'i dolduracak şekilde, antibiyotik eklenmiş LB agar çözeltisi koyuldu ve katılaşması bekledi. Katılaştıran agar üzerine plazmit sürüntüleri yaydırıldı. Petri kapları gece boyunca 37 °C inkübatörde bekletildi. 16-18 saatlik inkübasyonun ardından agar üzerinde bakteri kolonizasyonu gözlemlendi. Öze

yardımıyla toplanan koloniler LB sıvı besisi yerine transfer edildi. Bakteriler sıvı besisi yeri içerisinde, 18 saat boyunca, 37 °C sıcaklık ve 250 rpm koşullarında logaritmik olarak çoğalmaya bırakıldı. Ertesi gün, bakteriler 4 °C sıcaklık ve 6000 rpm koşullarında 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatantın atılmasının ardından, pellet halinde dibe çöken bakteriler, tekrar kullanılmak üzere -80 °C’de dondurulup, saklandı. Bu işlemler tüm vektörler için tekrarlandı.

5.2.3.2. DNA izolasyonu

Her bir rekombinant adeno-asosiyasyon virüsü için bir ana vektör, 2/1 yardımcı vektör ve helper yardımcı vektör gerekmektedir. DNA izolasyonunda, kullanılacak vektörleri içeren bakteri çöktürücüleri çözdürüldü. Qiagen Endofree Plasmid Kit (Qiagen, 12362) kullanarak, talimatlar doğrultusunda DNA izolasyonu yapıldı. DNA konsantrasyonları SpectraMax spektroskopisi cihazı ile belirlendi.

5.2.3.3. 293AAV Hücre transfeksiyonu

293AAV hücre hattı, rekombinant adeno-asosiyasyon virüsü üretimi için kullanılmaktadır. Bu hücre hattı Cell BioLabs firmasından temin edilmiştir (Cell BioLabs, AAV-100). Hücre hattı vasatı olarak D-MEM (yüksek glukoz), %10 fetal bovin serum, 0,1 mM MEM esansiyel olmayan amino asitler ve 2 mM L-glutamin kullanıldı. Bu vasat ile 37 °C, %5 CO₂, %20 O₂ koşullarında hücreler çoğaltılmaya başlandı. Yaklaşık 10⁷ 293AAV hücresi, 15x15 cm petri kabına ekildi. 37 °C, %5 CO₂, %20 O₂ koşullarında inkübe edildi. Hücreler %70-80 doluluk oranına ulaştığında, hücreler pasajlandı. Yeterli miktarda hücre elde edilince, transfeksiyon işlemine başlandı. 24 µg helper yardımcı vektör, 20 2/1 µg yardımcı vektör, 12 µg ana vektör, Opti-MEM transfeksiyon medyumunu ve polietilenimin transfeksiyon ajanı steril bir tüp içinde karıştırıldı. Hazırlanan karışım, petri kaplarında yeterli doluluk oranına ulaşan hücrelerin üzerine eklendi. 37 °C, %5 CO₂, %20 O₂ koşullarında 72 saat boyunca inkübasyon yapıldı. 3 günün sonunda hücreler toplandı. 4 °C sıcaklık ve 1100 rpm koşullarında 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve hücreler çöktürücü halinde -80 °C’de dondurularak saklandı.

5.2.3.4 Pürifikasyon

150 mM NaCl ve 20 mM Tris/HCl pH 8,0 ile steril liziz çöktisi hazırlandı. Dondurulmuş olan hücre pelletine 9 mL steril liziz çöktisi eklendi. Kuru buz ve %70 EtOH karışımı hazırlandı. Hücreler ilk olarak 2 dakika boyunca bu karışımda bekletildi. Ardından hücreler 2 dakika boyunca 37 °C sıcak su banyosunda bekletildi. Bu işlem 3 defa tekrarlandı. Ardından hücreler 3 dakika boyunca sonikasyon işlemine maruz bırakıldı ve hücreler patlatılarak içinde bulunan virüsler açığa çıkarıldı. Virüsleri hücre lizizlerinden arındırmak için pürifikasyon işlemi yapıldı. Hücre lizizi ve virüs karışımına 1 mM MgCl₂ ve 250 U/mL Benzonaz (Sigma E8263-25K) eklendi. 4 °C sıcaklık ve 4000 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj yapıldı. Pürifikasyon için gereken %17, %25, %40 ve %60 oranlarındaki çöktitler, aşağıda verilen tablolara göre hazırlandı.

Tablo 5.2.3.4.1. %17 pürifikasyon çöktisi

Materyal	Konsantrasyon	Hacim
PBS	10x	5 mL
MgCl ₂ çöktisi	1 M	0,05 mL
KCl çöktisi	1 M	0,125 mL
NaCl çöktisi	5 M	10 mL
Iodixanol		12,5 mL
ddH ₂ O		50 mL'ye kadar

Tablo 5.2.3.4.2. %25 pürifikasyon çöktisi

Materyal	Konsantrasyon	Hacim
PBS	10x	5 mL
MgCl ₂ çöktisi	1 M	0,05 mL
KCl çöktisi	1 M	0,125 mL
NaCl çöktisi	5 M	20 mL

Iodixanol		12,5 mL
Fenol kırmızısı	%0,5	0,1 mL
ddH ₂ O		50 mL'ye kadar

Tablo 5.2.3.4.3. %40 pürifikasyon çözeltisi

Materyal	Konsantrasyon	Hacim
PBS	10x	5 mL
MgCl ₂ çözeltisi	1 M	0,05 mL
KCl çözeltisi	1 M	0,125 mL
NaCl çözeltisi	5 M	10 mL
Iodixanol		33,3 mL
ddH ₂ O		50 mL'ye kadar

Tablo 5.2.3.4.4. %60 pürifikasyon çözeltisi

Materyal	Konsantrasyon	Hacim
MgCl ₂ çözeltisi	1 M	0,05 mL
KCl çözeltisi	1 M	0,125 mL
Iodixanol		50 mL
Fenol kırmızısı	%0,5	0,025 mL

Hazırlanan bu katmanlar, sıraları göz önünde bulundurulmak kaydıyla ve şırınga yardımıyla 3 mL %60'lık çözelti, 5 mL %40'lık çözelti, 6 mL %25'lik çözelti, 6 mL %17'lik çözelti ve hücre lizatı olacak şekilde Optiseal ultra santrifüj tüplerine (Beckman 361625) yavaşça damlatıldı. 18 °C sıcaklıkta ve 90 dakika boyunca 60000 rpm'de ultra santrifüj yapıldı. 90 dakikalık santrifüj sonucunda, virüsler %40'lık katmanda birikti. Ultra santrifüj tüpünü dışarıdan şırınga ile delerek %40'lık katman toplandı. 100 mL 10x PBS, 50 g D-Sorbitol, 42,4 mL %5 NaCl ile hazırlanan 1L 1x saklama tampon çözeltisi ile Amicon 100K filtreli kolonlar (Millipore, UFC910024) ıslatıldı ve 15 dakika boyunca santrifüj yapıldı. Ardından, içinde virüslerin de

bulunduğu %40'lık çözelti katmanı, ıslatılmış olan filtreli kolonlara koyuldu ve 15 mL'ye tamamlayacak hacimde 1x saklama tampon çözeltisi eklendi. 4 °C sıcaklık ve 3500 rpm'de 30 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kolonun alt kısmında biriken çözelti atıldı ve üst kısmına 15 mL'ye tamamlayacak hacimde 1x saklama tampon çözeltisi eklenerek tekrar aynı koşullarda santrifüj yapıldı. Bu işlem toplam 3 defa tekrarlandı. Virüslerin bulunduğu, filtreli kolonun üst kısmındaki çözelti toplandı, alikotlandı ve -80 °C'de dondurulup, saklandı.

5.2.4. İntrakraniyal rekombinant adeno-asosiyale virüs enjeksiyonu

30 günlük dişi ve erkek fareler izofloran inhalasyonu ile stabil anestezi altında alındı ve stereotaksik çerçeveye yerleştirildi. Fareler düz bir şekilde stereotaksik çerçeveye sabitlendi ve antiseptik betadin çözeltisi ile kafa derileri temizlendi. Kafa derisinin bisturi yardımı ile kesilmesinin ardından, kafatasına hidrojen peroksit uygulandı ve kemikler belirgin hale getirildi. Kraniyal koordinatların belirlenebilmesi için kemiklerin yeterince görünür olmasının ardından, hidrojen peroksit temizlendi. SteREO Discovery V8 mikroskop ile Lateral Hipotalamus bölgesinin koordinatları belirlendi. Koordinat tayin etme sırasında Narishige mikro-manipülatör kullanıldı. Bregma noktasında tüm koordinatlar sıfır kabul edildi. Lateral Hipotalamik Alan (LHA) bölgesi için koordinatlar, Anterior/Posterior (A/P) düzleminde -1,30 mm ve Medial/Lateral düzleminde +/- 1,0 mm olarak tayin edildi. Belirtilen noktalarda freze kullanarak bilateral olarak delikler açıldı. Isı yardımıyla camı inceltip mikropipet yapan, Sutter P-1000 marka mikropipet çekici ile intrakraniyal enjeksiyon için gereken mikropipetler hazırlandı. Mikropipetlerin içi mineral yağ ile dolduruldu. Ardından cam mikropipetler, koordinat düzlemi bulmada kullanılan Narishige mikro-manipülatörün enjektörüne yerleştirildi. Hazırlanan rekombinant adeno-asosiyale virüsler, bu cam pipetlerin içine çekildi. Koordinat düzleminde kayma olmadığından emin olmak için A/P ve M/L düzlemleri tekrar kontrol edildi. Dorsal/Ventral (D/V) düzlemde sıfır noktası beyin yüzeyi olarak kabul edildi ve cam pipetler beyin içinde yavaşça ilerletildi. İlk intrakraniyal enjeksiyonlar Medial/Lateral düzlemin pozitif yönünde yapıldı. Dorsal/Ventral (D/V) düzlemde öncelikle -4,90 mm noktasına gelindi ve 75 nL/dk hızında 300 nL hacminde virüs enjekte edildi. Virüsün pipet

içine geri kaçmasını engellemek amacıyla 10 dakika bu noktada beklendi. Ardından yavaşça -4,70 mm noktasına doğru yukarı çıkıldı. Bu noktada da, 75 nL/dk hızında 300 nL hacminde virüs enjekte edildi ve 10 dakika boyunca mikropipet hareket ettirilmedi. Cam mikropipet yavaşça beyinden çıkarıldı ve aynı işlemler, sırasıyla Medial/Lateral düzlemin negatif yönünde yapıldı. Bilateral olarak, toplam 600 nL rekombinant adeno-asosiyasyon virüsü enjekte edildi. Enjeksiyonlardan sonra cam pipet beyin içinden çıkarıldı ve farelerin kafa derileri dikildi. Fareler, 14 gün boyunca operasyon sonrası bakıma alındı. Bu 14 günlük süre zarfında farelerin operasyon sonrası semptomlarının iyileşmesi ve transgen ifadesinin tamamlanması beklendi.

5.2.5. Optogenetik uyarım için fiber optik implantasyonu

Optogenetik uyarım deneylerinde kullanılacak ve intrakraniyal olarak *rAAV-CAG-FLEX-tdTomato* veya *rAAV-EF1a-FLEX-hChR2(H134R)-eYFPWPRE-HGHpA* enjekte edilmiş farelerin kafa derileri, fiber optik implantasyonu yapılacağından dikilmedi. Bu farelerde, virüs enjeksiyonundan sonra Lateral Hipotalamus bölgesinin üstüne, Anterior/Posterior (A/P) düzleminde -1,30 mm, Medial/Lateral düzleminde +/- 1,0 mm ve Dorsal/Ventral (D/V) düzleminde -4,50 mm koordinatlarında ferul başlıklı fiber optik (Çap = 200 µ, NA=0,50, ThorLabs) yerleştirildi. Optogenetik deneyler için fiber optik implantasyonu yapılan fareler 21 gün süre ile operasyon sonrası bakıma alındı. Bu süre zarfında farelerin operasyon sonrası semptomlarının iyileşmesi ve transgen ifadesinin tamamlanması beklendi.

5.2.6. Besin tüketimi ölçümü

5.2.6.1. Kemogenetik yöntemlerle yapılan MCH nöron aktivasyonu

Kemogenetik MCH nöron aktivasyonu için, LHA bölgesinde bulunan MCH nöronlarına intrakraniyal olarak *rAAV-CAG-FLEX-tdTomato* veya *rAAV-EF1a-DIO-hM3D(Gq)-mCherry* enjekte edilmiş, P30 dişi ve erkek *Pmch-cre* transgenik fareler 14 gün boyunca operasyon sonrası bakıma alındı. Bu süre zarfında transgen ifadesi tamamlanmış oldu. *rAAV-CAG-FLEX-tdTomato* enjekte edilmiş fareler kontrol

grubu olarak ayrıldı. 14 günlük operasyon sonrası bakım süresi sonunda, kontrol ve deney fareleri davranış deneyleri için tekli kafeslere yerleştirildi ve farelerin yeni ortamlarına alışması için 3 gün zaman tanındı. *Ad libitum* olarak beslenen farelerin, günlük besin tüketimi gözlenmeye başlandı. Besin tüketiminin stabil bir grafikte ilerlemesinin ve referans bir değer oluşmasının ardından, besin tüketimi deneyleri başlatıldı. Gündüz döngüsü, sabah saat 08:00'de başlatıldı ve farelerin besin tüketimleri 2 saat boyunca 30 dakika arayla kaydedildi. Saat 10:00 itibari ile 300 µL hacminde intraperitoneal (i.p.) enjeksiyonlar gerçekleştirildi.

Birinci gruba, ilk gün saat 10:00 itibari ile 300 µL %0,9 izotonik NaCl solüsyonu içinde 3 mg/kg EtOH plasebo enjekte edildi. Besin tüketimleri 2 saat boyunca 30 dakika arayla gözlemlendi. İkinci gün 300 µL %0,9 izotonik NaCl solüsyonu içinde 3 mg/kg CNO veya 0,01 mg/kg CLZ enjekte edildi ve besin tüketimleri 2 saat boyunca 30 dakika arayla gözlemlendi. Üçüncü ve dördüncü günler, sırayla birinci ve ikinci günlerde yapılan prosedür tekrarlandı. *Pmch-cre* farelerin besin tüketimleri kaydedildi.

İkinci gruba ise, ilk gün saat 10:00 itibari ile 300 µL %0,9 izotonik NaCl solüsyonu içinde 3 mg/kg 3 mg/kg CNO veya 0,01 mg/kg CLZ enjekte edildi. Besin tüketimleri 2 saat boyunca 30 dakika arayla gözlemlendi. İkinci gün 300 µL %0,9 izotonik NaCl solüsyonu içinde EtOH plasebo enjekte edildi ve besin tüketimleri 2 saat boyunca 30 dakika arayla gözlemlendi. Üçüncü ve dördüncü günler sırayla birinci ve ikinci günlerde yapılan prosedür tekrarlandı. *Pmch-cre* farelerin besin tüketimleri kaydedildi.

Deney gruplarını kendi aralarında tekrar gruplara bölüp farklı günler, farklı enjeksiyonlar yaparak, deneyin gidişatını olumsuz etkileyebilecek çevresel etkenler gözlemlendi. İntraperitoneal enjeksiyonlar sonrası farelerin besin tüketimleri 2 saat boyunca 30 dakika arayla kaydedildi ve deneyler saat 12:00 itibari ile sonlandırıldı.

Besin tüketimini test etmek için yapılan aynı deney düzeneği, gündüz deneylerinin bitiminin ardından saat 19:00'da başlayan gece döngüsü için de yapıldı. Saat 17:00 itibari ile farelerin besin tüketimleri 2 saat boyunca 30 dakika arayla kaydedildi. *Pmch-cre* farelerin besin tüketimi, iki gruba ayrılmış ve dönüşümlü olarak 300 µL %0,9 izotonik NaCl solüsyonu içinde 3 mg/kg EtOH plasebo veya 300 µL %0,9

izotonik NaCl solüsyonu içinde 3 mg/kg CNO / 0,01 mg/kg CLZ enjekte etmek suretiyle aynı deney prosedürüyle test edildi.

5.2.6.2. Optogenetik yöntemlerle yapılan MCH nöron aktivasyonu

Optogenetik MCH nöron aktivasyonu için, LHA bölgesinde bulunan MCH nöronlarına intrakraniyal olarak *rAAV-CAG-FLEX-tdTomato* veya *rAAV-EF1a-FLEX-hChR2(H134R)-eYFPWPRE-HGHpA* enjekte edilmiş, P30 dişi ve erkek *Pmch-cre* transgenik fareler 21 gün boyunca operasyon sonrası bakıma alındı. Bu süre zarfında transgen ifadesi tamamlandı. *rAAV-CAG-FLEX-tdTomato* enjekte edilmiş fareler kontrol grubu olarak kullanıldı. 14 günlük operasyon sonrası bakım süresi sonunda, kontrol ve deney fareleri davranış deneyleri için tekli kafeslere yerleştirildi ve farelerin yeni ortamlarına alışması için 3 gün zaman tanındı. *Ad libitum* olarak beslenen farelerin, günlük besin tüketimi gözlenmeye başlandı. Besin tüketiminin stabil bir grafikte ilerlemesinin ve referans bir değer oluşmasının ardından, besin tüketimi deneyleri başlatıldı. Gündüz döngüsü, sabah saat 08:00'de başlatıldı ve farelerin besin tüketimleri 2 saat boyunca 30 dakika arayla kaydedildi. Saat 10:00 itibari ile Lateral Hipotalamus bölgesi üzerine 473-nm diyot lazer ile (Doric Lenses Inc., QC, Canada) 20 Hz foto-uyarım verilmeye başlandı. 2 saat boyunca 4 saniyede bir tekrar eden saniyede 10-ms pulslarla 20-Hz foto-uyarım yapıldı ve farelerin besin tüketimleri kaydedildi. Besin tüketimleri, uyarım yapılmayan günler ile karşılaştırıldı.

Besin tüketimini test etmek için yapılan aynı deney düzeneği, gündüz deneylerinin bitiminin ardından saat 19:00'da başlayan gece döngüsü için de yapıldı. Saat 17:00 itibari ile farelerin besin tüketimleri 2 saat boyunca 30 dakika arayla kaydedildi. Saat 19:00'da 2 saat boyunca 4 saniyede bir tekrar eden saniyede 10-ms pulslarla 20-Hz foto-uyarım yapıldı ve farelerin besin tüketimleri kaydedildi.

5.2.6.3. Kemogenetik yöntemlerle yapılan MCH nöron inhibisyonu

Kemogenetik MCH nöron inhibisyonu için, LHA bölgesinde bulunan MCH nöronlarına intrakraniyal olarak *rAAV-CAG-FLEX-tdTomato* veya *rAAV-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry* enjekte edilmiş, P30 dişi ve erkek *Pmch-cre* transgenik fareler 14 gün boyunca operasyon sonrası bakıma alındı ve transgen ifadesi beklendi. *rAAV-CAG-FLEX-tdTomato* enjekte edilmiş fareler kontrol grubu olarak kullanıldı. Ardından fareler davranış deneyleri için tekli kafeslere yerleştirildi ve farelerin yeni ortamlarına alışması için 3 gün zaman tanındı. *Ad libitum* olarak beslenen farelerin, günlük besin tüketimi gözlenmeye başlandı. Besin tüketiminin stabil bir grafikte ilerlemesinin ve referans bir değer oluşmasının ardından, besin tüketimi deneyleri başlatıldı. Gündüz döngüsü, sabah saat 08:00'de başlatıldı ve farelerin besin tüketimleri 2 saat boyunca 30 dakika arayla kaydedildi. 300 µL hacminde intraperitoneal (i.p.) enjeksiyonlar gerçekleştirildi. *Pmch-cre* farelerin besin tüketimi, iki gruba ayrılmış ve dönüşümlü olarak 300 µL %0,9 izotonik NaCl solüsyonu içinde 3 mg/kg EtOH plasebo veya 300 µL %0,9 izotonik NaCl solüsyonu içinde 3 mg/kg CNO / 0,01 mg/kg CLZ enjekte etmek suretiyle Bölüm 5.2.6.1.'de açıklanan prosedürüyle test edildi. Deneyler gündüz ve gece döngüsü için ayrı ayrı yapıldı.

5.2.7. Açık alan testi

Açık alan deneyleri için *rAAV-CAG-FLEX-tdTomato*, *rAAV-EF1a-DIO-hM3D(Gq)-mCherry* virüsleri veya *rAAV-CAG-FLEX-tdTomato*, *rAAV-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry* virüsleri enjekte edilmiş veya *rAAV-CAG-FLEX-tdTomato*, *rAAV-EF1a-FLEX-hChR2(H134R)-eYFPWPRE-HGHpA* virüsleri enjekte edilmiş ve fiber optik bağlanmış *Pmch-cre* fareler, deneyden önce 3 gün boyunca testlerin yapılacağı odaya alıştırdı. Tekli kafeslerde bulunan farelerin, bu süre boyunca stresleri en aza indirilmeye çalışıldı. Deneyler 40 cm x 40 cm x 40 cm açık alan deney düzeneklerinde yapıldı. MCH^{hM4Di} ve MCH^{tdTom} fareler intraperitoneal olarak 300 µL %0,9 izotonik NaCl solüsyonu içinde 3 mg/kg CNO enjekte edilerek deney düzeneğine bırakıldı. MCH^{ChR2} ve MCH^{tdTom} fareler ise 30 dakika boyunca 10 ms 20-Hz frekansında, 15 mW gücünde ve 473 nm dalga

boyunda optogenetik uyarımı ile uyarıldı. Açık alan deneyi AnyMaze yazılımı ile takip edildi ve CCD kameralar ile kayıt altına alındı.

5.2.7. Yükseltilmiş artı labirent testi

rAAV-CAG-FLEX-tdTomato, *rAAV-EF1a-DIO-hM3D(Gq)-mCherry* virüsleri veya *rAAV-CAG-FLEX-tdTomato*, *rAAV-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry* virüsleri enjekte edilmiş veya *rAAV-CAG-FLEX-tdTomato*, *rAAV-EF1a-FLEX-hChR2(H134R)-eYFPWPRE-HGHpA* virüsleri enjekte edilmiş ve fiber optik bağlanmış *Pmch-cre* fareler, deneyden önce 3 gün boyunca testlerin yapılacağı odaya alıştırıldı. Deneyleerde 5 cm x 35 cm boyutlarında 2 açık kolu ve 5 cm x 35 cm x 20 cm boyutlarında 2 kapalı kolu olan ve 35 cm yükseklikte deney düzeneği kullanıldı. 300 µL %0,9 izotonik NaCl solüsyonu içinde 3 mg/kg CNO enjekte edilmiş MCH^{hM4Di} ve MCH^{tdTom} fareler; ve 10 ms 20-Hz frekansında, 15 mW gücünde ve 473 nm dalga boyunda optogenetik olarak uyarılmış MCH^{ChR2} ve MCH^{tdTom} fareler, labirentin ortasına, yüzleri açık kola bakacak şekilde bırakıldı. Fareler 5 dakika boyunca test edildi. Deneyleer AnyMaze yazılımı ile takip edildi ve CCD kameralar ile kayıt altına alındı.

5.2.8. MCH nöronlarının foto-uyarımı ile besin tüketiminin eşleştirilmesi

Oto uyarım deneyleeri için *rAAV-CAG-FLEX-tdTomato* veya *rAAV-EF1a-FLEX-hChR2(H134R)-eYFPWPRE-HGHpA* virüsü enjekte edilmiş ve fiber optik bağlanmış *Pmch-cre* fareler, Coulbourn Habitest metabolik test kafeslerine alındı ve farelerin kafeslere alışması için 3 gün zaman tanındı. Kafeslerin bir tarafına girinti yeri bırakıldı ve içine hareket sensörü yerleştirildi. Sensörler otomatik yem veren bir sisteme bağlandı. Böylece, fare girintiye kafasını her soktuğunda otomatik sistem sayesinde bir yem alması sağlandı. 3 gün boyunca farelerin girintiden 20 mg pellet yemeyi öğrenmesi beklendi. 3. günün sonunda, girintideki sensöre, 10 ms 20-Hz frekansında, 15 mW gücünde ve 473 nm dalga boyunda optogenetik uyarım sağlayacak lazer sistem bağlandı. Fareler girintiye burunlarını her soktuğunda

hareket sensörü hem MCH nöronlarını optogenetik olarak uyardı, hem de fareye 1 adet pellet yem verdi. Sonraki 2 gün boyunca 1'er saat farelerin yem tüketimi gözlemlendi. Otomatik verilen yem miktarları Graphic State yazılımı ile tespit edildi ve farelerin hareketleri CCD kameralar ile kayıt altına alındı.

5.2.9. *Pmch-cre* farelerde besinden bağımsız oto-uyarım

5.2.9.1. Burun hareketi ile optogenetik oto-uyarım

Oto uyarım deneyleri için *rAAV-CAG-FLEX-tdTomato* veya *rAAV-EF1a-FLEX-hChR2(H134R)-eYFPWPRE-HGHpA* virüsü enjekte edilmiş ve fiber optik bağlanmış *Pmch-cre* fareler, Coulbourn Habitest metabolik test kafeslerine alındı ve farelerin kafeslere alışması için 3 gün zaman tanındı. Kafeslerin sağ ve sol taraflarına girinti yerleri bırakıldı ve içlerine hareket sensörleri takıldı. Fareler karanlık döngüde, günde 1'er saat, 3 gün boyunca her iki girintiye de alıştırıldı. 3 gün boyunca farelerin girintilerden hangisini tercih ettiği tespit edildi. Tercih etmediği girintideki sensöre, 10 ms 20-Hz frekansında, 15 mW gücünde ve 473 nm dalga boyunda optogenetik uyarım sağlayacak lazer sistem bağlandı. Fareler girintiye burunlarını her soktuğunda hareket sensorunun MCH nöronlarının optogenetik olarak uyarılması sağlandı. Diğer girinti herhangi bir uyarım bağlanmadı. Sonraki 2 gün boyunca 1'er saat farelerin hangi girintiye burunlarını sokmayı tercih ettikleri gözlemlendi.

5.2.9.2. Basamak ile optogenetik oto-uyarım

Oto uyarım deneyleri için *rAAV-CAG-FLEX-tdTomato* veya *rAAV-EF1a-FLEX-hChR2(H134R)-eYFPWPRE-HGHpA* virüsü enjekte edilmiş ve fiber optik bağlanmış *Pmch-cre* fareler, Coulbourn Habitest metabolik test kafeslerine alındı ve farelerin kafeslere alışması için 3 gün zaman tanındı. Kafeslerin sağ ve sol taraflarına farelere uygun basamaklar yerleştirildi ve farelerin o basamaklara basmayı öğrenmeleri beklendi. Fareler karanlık döngüde, günde 1'er saat, 3 gün boyunca her iki basamağa da alıştırıldı. Ardından tercih etmediği basamağa 10 ms 20-Hz frekansında, 15 mW gücünde ve 473 nm dalga boyunda optogenetik uyarım sağlayacak lazer sistem

bağlandı. Fareler basamağa her bastıklarında MCH nöronlarının optogenetik olarak uyarılması sağlandı. Diğer basamağa herhangi bir uyarım bağlanmadı. Sonraki 2 gün boyunca 1'er saat farelerin hangi basamağa basmayı tercih ettikleri gözlemlendi.

5.2.10. Elektrofizyoloji

İntrakraniyal rekombinant adeno-asosiyasyon virüsü enjeksiyonu ile *rAAV-EF1a-DIO-hM3D(Gq)-mCherry* veya *rAAV-EF1a-FLEX-hChR2(H134R)-eYFPWPRE-HGHpA* vektörleri verilmiş fareler, elektrofizyolojik deneyler için ayrıldı. Elektrofizyolojik deneyler öncesinde Tablo 5.2.10.1'de verilen kesme çözeltisi, taze olarak hazırlandı ve soğutuldu.

Tablo 5.2.10.1. Elektrofizyoloji kesme çözeltisi

Materyal	Konsantrasyon
Sükroz çözeltisi	234 g/mM
NaHCO ₃ çözeltisi	28 g/mM
Dekstroz çözeltisi	7 g/mM
MgCl ₂ çözeltisi	7 g/mM
CaCl ₂ çözeltisi	0,5 g/mM
Sodyum askorbat çözeltisi	1 g/mM
Sodyum pürivat çözeltisi	3 g/mM
NaH ₂ PO ₄ çözeltisi	1,25 mM

Soğutulmuş kesme solüsyonu %95 O₂ + %5 CO₂ ile havalandırılmaya başlandı. İzofloran inhalasyonu ile anestezi altına alınan fareler dekapite edildi ve beyinleri çıkarıldı. Soğuk ve havalandırılan kesme çözeltisi barındıran vibratom ile 300 µm kalınlığında canlı beyin dokusu kesitleri alındı. Taze olarak Tablo 5.2.10.2'de verilen oranlarda yapay beyin omurilik sıvısı (aCSF) hazırlandı.

Tablo 5.2.10.2. Yapay beyin omurilik sıvısı çözeltisi

Materyal	Konsantrasyon
NaCl çözeltisi	119 g/mM
NaHCO ₃ çözeltisi	25 g/mM
Dekstroz çözeltisi	7 g/mM
KCl çözeltisi	2,5 g/mM
MgCl ₂ çözeltisi	7 g/mM
CaCl ₂ çözeltisi	0,5 g/mM
Sodyum askorbat çözeltisi	1 g/mM
Sodyum pürivat çözeltisi	3 g/mM
NaH ₂ PO ₄ çözeltisi	1,25 mM

Yapay beyin omurilik sıvısı (aCSF) %95 O₂ + %5 CO₂ karışımı ile havalandırılmaya başlandı. Alınan kesitler havalandırılmakta olan yapay beyin omurilik sıvısına aktarıldı. Sutter P-1000 marka mikropipet çekici ile hazırlanan cam pipete bir miktar aCSF çekildi. Lateral Hipotalamus bölgesinde bulunan melanin konsantre eden hormon nöronlardan kayıt alınmaya başlandı. Elektrotların ucundaki rezistans 3-6 MΩ, potansiyel -60 V olarak belirlendi. *rAAV-EF1a-DIO-hM3D(Gq)-mCherry* ile enjekte edilmiş farelerin Melanin Konsantre Eden Hormon nöronlarından alınan kayıtlar sırasında 5 µM konsantrasyonunda klozapin eklendi. MCH nöronlarının spontan aktiviteleri kaydedildi.

5.2.11. Doku fiksasyonu ve kesit alma

Davranış deneylerinin ardından MCH^{hM3Dq} farelere CLZ/CNO uyarımı, MCH^{ChR2} farelere ise foto-uyarım yapıldı. 30 dakika sonra, farelere önce 0,1 M fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) (pH 7.4), sonra 0,1 M fosfat tamponlu tuz çözeltisi içinde %4 paraformaldehit ile hazırlanan paraformaldehit fiksatifisi ile kardiyak perfüzyon yapıldı. Fareler dekapite edildi ve elde edilen beyinler 4 saat boyunca 4°C %4'lük PFA çözeltisi içinde bekletildi. Ardından %30 sükröz çözeltisi içinde alındı ve 24 saat bekletildi. VT1000S vibratom ile 75 µm kalınlığında beyin kesitleri alındı.

5.2.12. İmmünohistokimyasal antikor boyaması

Doku fiksasyonu sonrası elde edilen 75 µm kalınlığındaki beyin kesitleri 1x fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile 30 dakika boyunca yıkandı. Kesitlerin üzerine 0,1 M PBS Triton-X-100 (%0,1 PBST) ve %5 keçi serumu ile hazırlanan bloklama çözeltisi damlatıldı ve kesitler 1 saat boyunca oda sıcaklığında bekletildi. 1x PBS, %0,1 Triton-X-100 ve %5 keçi serumu içeren çözelti icine 1:500 oranında Anti-melanin concentrating hormone antikorü (H-070-047, Phoenix Pharmaceuticals) veya 1:5000 oranında Anti-cFos antikorü (2250, Cell Signaling) eklendi ve beyin kesitlerinin üzerine damlatıldı. Kesitler gece boyunca 4°C’de çalkalayıcıda bekletildi. Bazı beyin kesitlerine, negatif kontrol olması açısından sadece bloklama solüsyonu damlatıldı. Ertesi gün, beyin kesitleri 3 defa 20’şer dakika boyunca %0,1 PBST ile yıkandı. Sekonder antikor boyaması için 1:500 oranında keçi anti-tavşan IgG (H+L) sekonder antikorü, Alexa Fluor® 488 (A-11008, Thermo Scientific) veya 1:500 oranında keçi anti-tavşan IgG (H+L) Alexa Fluor® 633 (A-21070, Thermo Scientific) sekonder antikorü bulunduran %0,1 PBST ve %5 keçi serumu çözeltisi ile seyreltildi. Kesitler 3 defa 20’şer dakika boyunca %0,1 PBST ile yıkandı ve lamlara aktarıldı. Kesitlerin kurumasının ardından Fluoromount (F4680, Sima) eklendi ve üstleri lameller ile kapatıldı.

5.2.13. Mikroskopik görüntüleme ve analiz

İmmünohistokimya boyamasının floresan görüntülemeleri Zeiss LSM 780 ve Zeiss LSM 800 Konfokal Mikroskopları ile yapıldı. Konfokal mikroskoplarıyla elde edilen görüntüler hücre sayımı ve post-hoc bölge analizleri için ImageJ programına aktarıldı.

5.2.14. İstatistiksel analizler

İstatistiksel analizler, GraphPad Prism (RRID:SCR_002798, GraphPad, San Diego, CA) programı ile yapıldı. Deneylerden elde edilen bulgular, Student’s t-test ve ANOVA ile değerlendirildi. Bulgular \pm standart hata olarak gösterildi. $p > 0,05$;

istatistiksel olarak anlamsız olarak değerlendirildi. $p < 0,05$; *, $p < 0,01$; **, $p < 0,001$; *** olarak belirtildi.

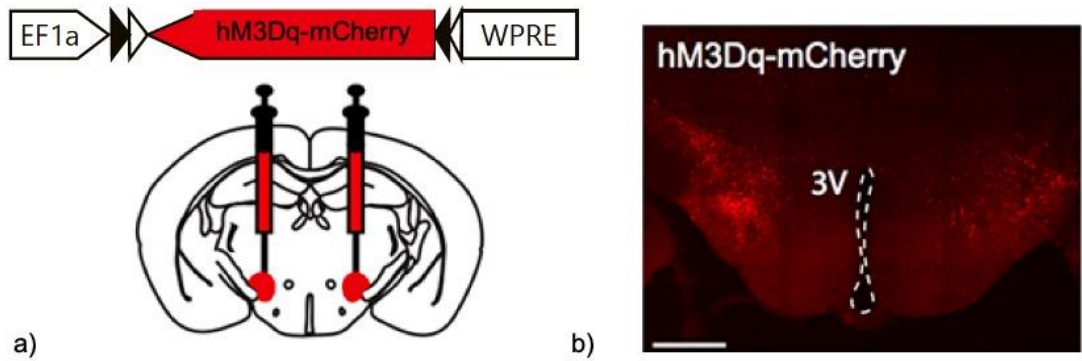


6. BULGULAR

6.1. MCH nöronlarında transgen ifadesi

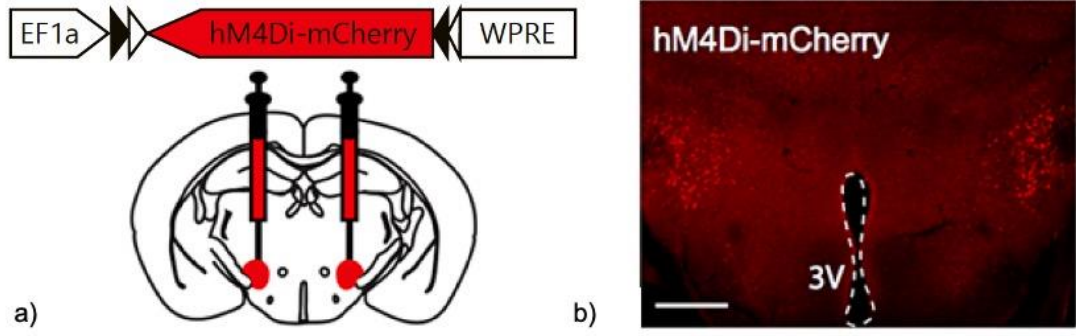
6.1.1. MCH nöronlarında hM3Dq-mCherry ve hM34i-mCherry transgen ifadesi

Lateral Hipotalamus bölgesinde bulunan Melanin Konsantre Eden Hormon nöronlarının akut iştah regülasyonu üzerindeki etkisinin anlaşılabilmesi için ilk olarak bu nöronlar, kemogenetik yöntemlerle uyarıldı. *Pmch-cre* transgenik farelere intrakraniyal olarak *rAAV-EF1a-DIO-hM3D(Gq)-mCherry* virüsü enjekte edildi (Resim 6.1.1.1.). İntrakraniyal virüs enjeksiyonları bilateral olarak, önceden test edilmiş LH koordinatlarına yapıldı. Kontrol grubuna ise, kemogenetik etkisi bulunmayan *rAAV-CAG-FLEX-tdTomato* virüs enjeksiyonu yapıldı.



Resim 6.1.1.1. a) MCH^{hM3Dq} enjeksiyonunun şematik gösterimi, b) MCH^{hM3Dq} ifadesi

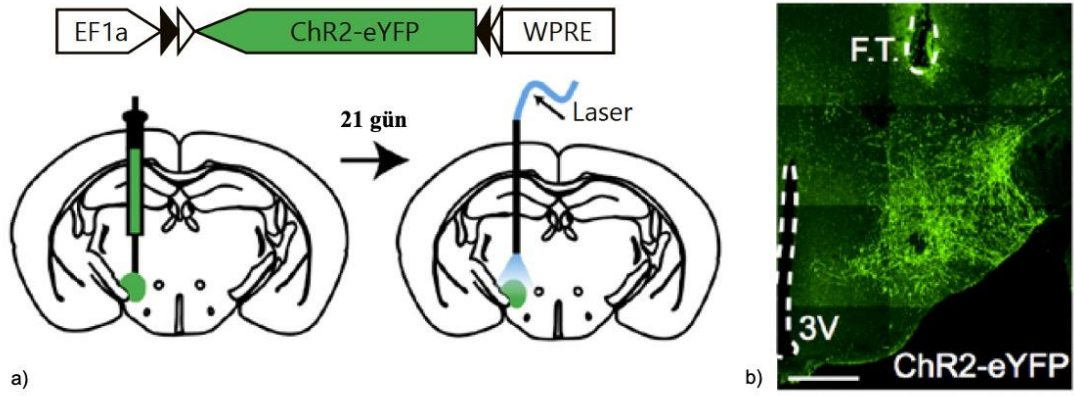
MCH nöronlarının kemogenetik olarak inhibe edilmesi için ise, bilateral olarak, önceden test edilmiş LH koordinatlarına *rAAV-EF1a-DIO-hM4D(Gi)-mCherry* virüsü enjekte edildi (Resim 6.1.1.2.) *rAAV-CAG-FLEX-tdTomato* virüsü enjekte edilen fareler kontrol olarak kullanıldı. Kemogenetik MCH nöron uyarım ve inhibisyon deneylerinde dişi ve erkek fareler birlikte kullanıldı.



Resim 6.1.1.2. a) MCH^{hM4Di} enjeksiyonunun şematik gösterimi, b) MCH^{hM4Di} ifadesi

6.1.2. MCH nöronlarında ChR2-eYFP transgen ifadesi

MCH nöronları, uyarıldıklarında güçlü bir ateşleme oranı sergilemektedir. Bu nöronların akut iştah üzerindeki etkisini saniyeler içinde görebilmek ve kemogenetik uyarımın olası yan etkilerini giderebilmek için, optogenetik ile aktivasyon yapıldı. Optogenetik uyarımın, akut iştah regülasyonu üzerindeki etkisi incelendi. Optogenetik uyarım için, *Pmch-cre* farelerin LHA bölgesine *rAAV-EF1a-FLEX-hChR2(H134R)-eYFPWPRE-HGHpA* virüsü enjekte edildi ve LHA bölgesinin yaklaşık 400 nm üzerine fiber optik ferül takıldı. Operasyon sonrası bakım için farelere 21 gün süre verildi ve bu zaman zarfında ChR2-eYFP transgen ifadesi de tamamlandı. Fareler sadece implant edilmiş ferül ile operasyon sonrası bakıma alındı. Deney habitasyon günleri ve deney günleri dışında, lazer uyarımı yapacak fiber optikler bağlanmadı (Resim 6.1.2.1.).

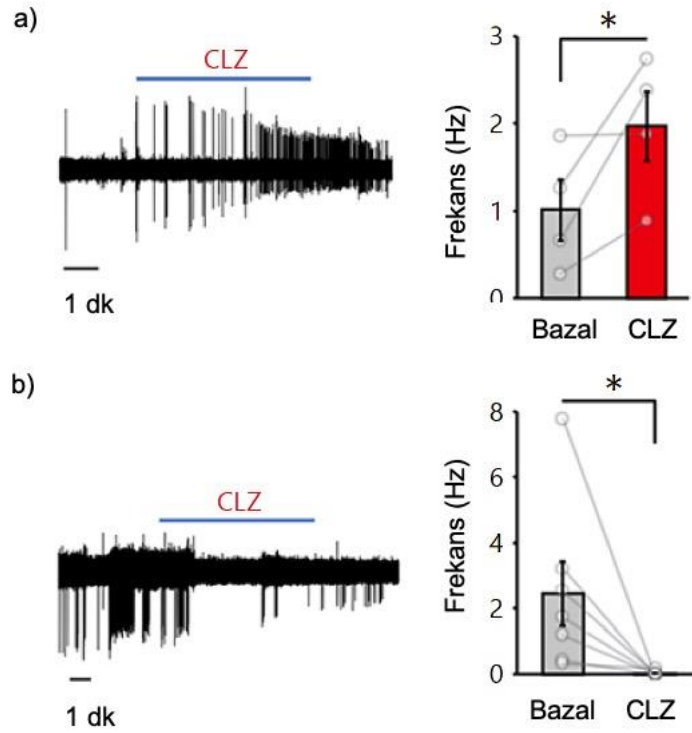


Resim 6.1.2.1. a) MCH^{ChR2} enjeksiyonunun ve fiber optik implantasyonunun şematik gösterimi, b) MCH^{ChR2} ifadesi ve fiber optik izi

6.1.3. Rekombinant Adeno-Asosiy Virüslerin Fonksiyonel Analizi

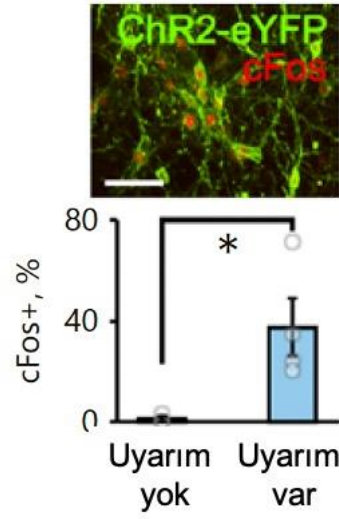
hM3Dq-mCherry ve hM4Di-mCherry vektörlerini barındıran rekombinant adeno-asosiy virüslerin kemogenetik olarak işlevselliğinin test edilebilmesi için, elektrofizyolojik kayıtlar alındı. hM3Dq-mCherry enjekte edilmiş *Pmch-cre* fareden kaydedilen spontan aktivite sırasında perfüzyona 5 μ M klozapin eklenmesi sonucunda, ateşleme oranı artış göstermiştir. Bazal aktivite $1,05 \pm 0,35$ Hz seviyesinde iken, perfüzyona klozapin eklenmesi durumunda ateşleme oranı $1,97 \pm 0,40$ Hz seviyesine çıkmıştır (n=4 nöron). Spontan aktivitedeki bu artış istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmaktadır (p=0,0462) (Şekil 6.1.3.1.).

hM4Di-mCherry enjekte edilmiş *Pmch-cre* fareden kaydedilen spontan aktivite sırasında 5 μ M klozapin eklenmesinin, aktiviteyi baskılandığı görülmüştür. Bazal aktivite $2,45 \pm 0,97$ Hz seviyesinde iken, perfüzyona klozapin eklenmesi ve spontan aktivitenin baskılanmasıyla, ateşleme oranı $0,03 \pm 0,03$ Hz seviyesine düşmüştür (n=6 nöron). hM4Di-mCherry ile elde edilen bu baskılanma; ateşleme oranında istatistiksel olarak anlamlı bir farka sebep olmuştur (p=0,024) (Şekil 6.1.3.1.). Bazal ateşleme oranını tekrar eski düzeyine çıkarabilmek için perfüzyona GABAA blokleri olan pikrotoksin eklenmiştir.



Şekil 6.1.3.1. a) MCH^{hM3Dq} spontan aktivitesi sırasında perfüzyona $5 \mu M$ klozapin eklenmesi sonucunda artan ateşleme oranı b) MCH^{hM4Di} spontan aktivitesi sırasında perfüzyona $5 \mu M$ klozapin eklenmesi sonucunda azalan ateşleme oranı

ChR2-eYFP virüsünün etkinliğinin test edilebilmesi için davranış deneyleri sonlanan fareler 30 dakikalık foto-uyarım sonrası sakrifiye edildi. Doku fiksasyonu sonrası anti-cFos antikoruna ile immunohistokimyasal boyama yapıldı. cFos ifadesi, uyarım sonrası oluşan nöronal aktiviteyi göstermektedir. *Pmch-cre* farelerine enjekte edilen ChR2-eYFP (yeşil) rAAV ile anti-cFos (kırmızı) boyamasının beraber ifadelendiği nöronlar, uyarım sonrası depolarize olan MCH nöronlarını göstermektedir. Konfokal mikroskop ile elde edilen görüntüler, ImageJ programına aktarılmış ve hücre sayımları yapılmıştır. ChR2-eYFP ifade eden, anti-cFos antikoruna ile boyanan ve ikisinin birlikte ifade edildiği hücre sayıları belirlenmiştir Buna göre, foto-uyarım sonrası cFos ifade eden MCH^{ChR2} hücre sayısında anlamlı bir artış görülmüştür. Uyarım yapılmayan farelerde cFos ifade eden MCH^{ChR2} hücre oranı $\%1,03 \pm 1,03$ iken, foto-uyarım yapılan farelerde cFos ifade eden MCH^{ChR2} hücre oranı $\%37,5 \pm 11,53$ olarak tespit edilmiştir. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,0222$) (Şekil 6.1.3.2.).



Şekil 6.1.3.2. MCH^{ChR2} ifadesi (yeşil) ve foto-uyarımın ardından yapılan anti-cFos antikoru (kırmızı) boyaması. Foto-uyarım sonrası cFos ifade eden MCH^{ChR2} hücre sayısında anlamlı bir artış görülmüştür (p<0,05).

6.2. MCH nöronlarının akut iştah regülasyonu üzerindeki etkisi

6.2.1. MCH nöronlarının kemogenetik uyarımının ve inhibisyonunun akut iştah regülasyonu üzerindeki etkisi

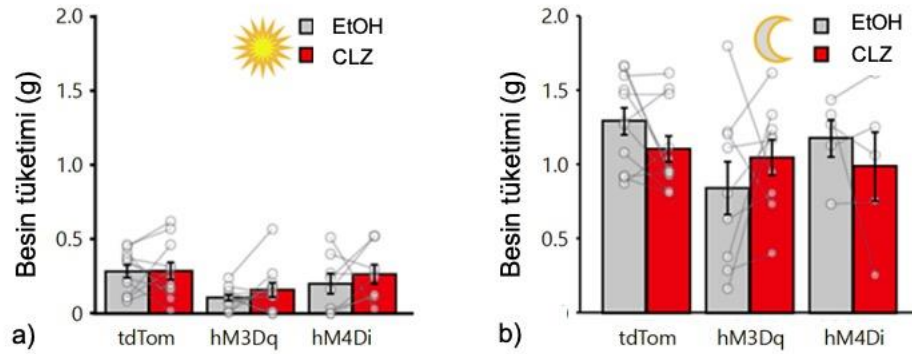
MCH nöron aktivasyonunun akut iştah kontrolü üzerindeki etkisinin tayin edilebilmesi için MCH^{hM3Dq} ve MCH^{tdTom} farelere intraperitoneal olarak 0,01 mg/kg klozapin enjekte edilmiş ve MCH nöronları aktive edilmiştir. İlk olarak gündüz döngüsündeki akut iştah regülasyonu test edilmiştir. MCH nöronlarının hM3Dq-mCherry ile kemogenetik olarak aktive edilmesi, plasebo olarak verilen %0,9 izotonik NaCl + EtOH çözeltisine kıyaslandığında anlamlı bir farklılık yaratmamıştır (MCH^{hM3Dq} %0,9 izotonik NaCl + EtOH = 0,11 ± 0,02 g, MCH^{hM3Dq} %0,9 izotonik NaCl + CLZ = 0,16 ± 0,05 g, p>0,05) (Şekil 6.2.1.1.).

hM4Dq-mCherry virüs enjeksiyonu ile sağlanan MCH inhibisyonu sonrasında da, %0,9 izotonik NaCl + EtOH çözeltisi veya %0,9 izotonik NaCl + CLZ enjeksiyonu sonrası besin tüketimi arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (MCH^{hM4Di} %0,9

izotonik NaCl + EtOH çözeltisi = $0,20 \pm 0,07$ g, MCH^{hM4Di} %0,9 izotonik NaCl + CLZ = $0,26 \pm 0,06$ g, $p > 0,05$) (Şekil 6.2.1.1.).

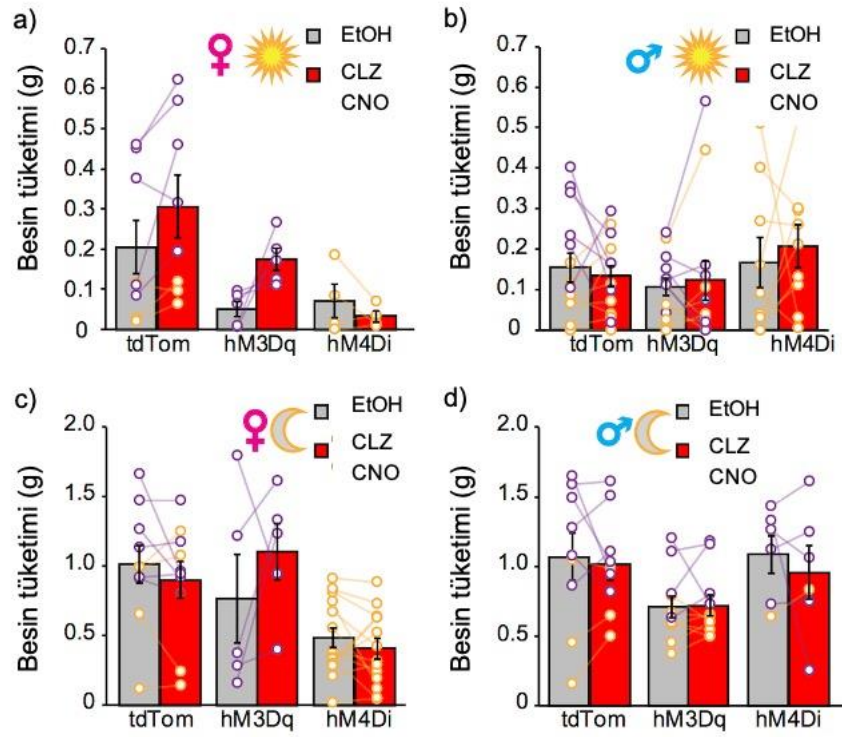
MCH^{hM3Dq} ve MCH^{hM4Di} grupları, CLZ molekülü ile aktifleşmeyen MCH^{tdTom} kontrol grubu ile kıyaslandıklarında, bu nöronlara gündüz döngüsünde yapılan kemogenetik manipülasyonların, akut iştah değişikliğine yol açmadığı anlaşılmıştır (MCH^{tdTom} %0,9 izotonik NaCl + EtOH çözeltisi = $0,28 \pm 0,04$ g, MCH^{tdTom} %0,9 izotonik NaCl + CLZ = $0,29 \pm 0,06$ g, $p > 0,05$) (Şekil 6.2.1.1.).

MCH nöronlarının manipülasyonu, gece döngüsünde de test edilmiştir. Elde edilen bulgular, bu nöronların gece döngüsünde de akut iştah kontrolü yapmakta yetersiz kaldığını göstermektedir (MCH^{tdTom} %0,9 izotonik NaCl + EtOH çözeltisi = $1,28 \pm 0,09$ g, MCH^{tdTom} %0,9 izotonik NaCl + CLZ = $1,10 \pm 0,09$ g; $p > 0,05$; MCH^{hM3Dq} %0,9 izotonik NaCl + EtOH çözeltisi = $0,84 \pm 0,18$ g, MCH^{hM3Dq} %0,9 izotonik NaCl + CLZ = $0,14 \pm 0,12$ g, $p > 0,05$; MCH^{hM4Di} %0,9 izotonik NaCl + EtOH çözeltisi = $1,17 \pm 0,12$ g, MCH^{hM4Di} %0,9 izotonik NaCl + CLZ = $0,98 \pm 0,23$ g, $p > 0,05$) (Şekil 6.2.1.1.).



Şekil 6.2.1.1. Kemogenetik manipülasyonunun akut iştah üzerinde etkisi a) Gündüz döngüsü b) Gece döngüsü

Deneyleerde dişi ve erkek *Pmch-cre* fareler bir arada kullanılmıştır. Cinsiyetler arası olası farkları test edebilmek için, gündüz ve gece döngüsünde dişi ve erkek farelerin MCH nöron manipülasyonları sonrası besin tüketimleri ayrı ayrı incelenmiştir. DREADD agonisti olarak CLZ ve CNO kullanılmıştır. Analizler sonucunda, dişi veya erkek fareler arasında anlamlı bir farka rastlanmamıştır ($p > 0,05$) (Şekil 6.2.1.2.).



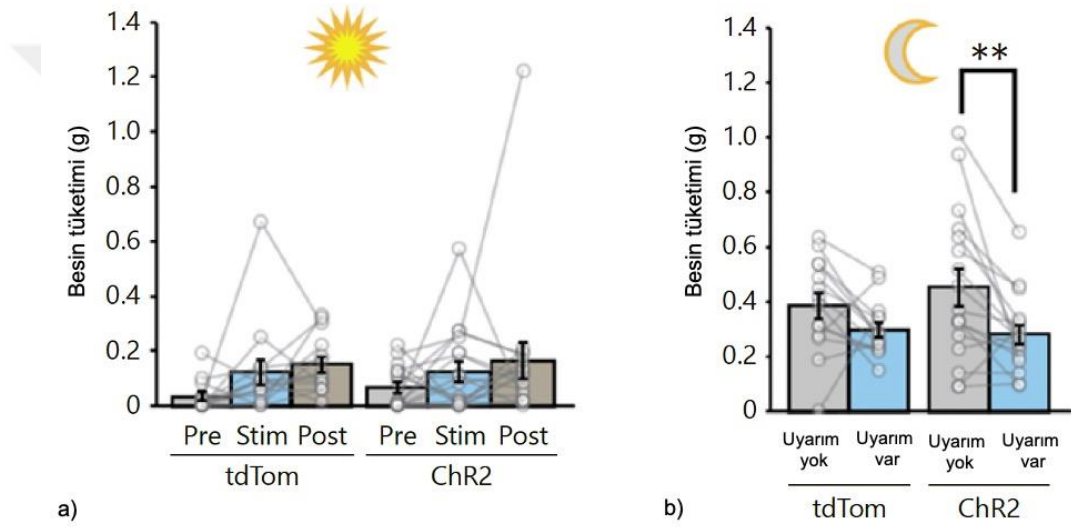
Şekil 6.2.1.2. Kemogenetik MCH manipülasyonunun akut iştah üzerinde etkisi a) Dişi farelerde gündüz döngüsü b) Erkek farelerde gündüz döngüsü c) Dişi farelerde gece döngüsü d) Erkek farelerde gece döngüsü.

6.2.2. MCH nöronlarının optogenetik uyarımının akut iştah regülasyonu üzerindeki etkisi

21 günlük, operasyon sonrası bakımın ardından, optogenetik uyarım için LHA bölgesine 2 saat boyunca 4 saniyede bir tekrar eden, saniyede 10-ms pulslarla 20-Hz frekansında, 15 mW gücünde ve 473 nm dalga boyunda foto-uyarım yapıldı. *Pmch-cre* farelerin besin tüketimleri kaydedildi.

Gündüz döngüsünde, MCH^{tdTom} farelerin besin tüketimi; uyarım öncesi = $0,034 \pm 0,01$ g, uyarım sırası = $0,12 \pm 0,05$ g ve uyarım sonrası = $0,15 \pm 0,03$ g iken; MCH^{ChR2} farelerin besin tüketimi; uyarım öncesi = $0,07 \pm 0,02$ g, uyarım sırası = $0,12 \pm 0,04$ g ve uyarım sonrası = $0,17 \pm 0,07$ g olarak bulunmuştur. Gruplar arası anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p > 0,05$) (Şekil 6.2.2.1.).

Gece döngüsünde ise MCH^{tdTom} farelerin besin tüketimi; uyarım öncesi = $0,39 \pm 0,05$ g, uyarım sırası = $0,30 \pm 0,03$ g iken; MCH^{ChR2} farelerin besin tüketimi; uyarım öncesi = $0,46 \pm 0,07$ g ve uyarım sırası = $0,28 \pm 0,03$ g ($p=0,0040$) olarak bulunmuştur. Uyarım sonrası, MCH^{ChR2} ve MCH^{tdTom} farelerin akut iştahlarında değişiklik kaydedilmemiştir ($p>0,05$) (Şekil 6.2.2.1.). Nokturnal olmaları sebebiyle, *Pmch-cre* farelerin besin tüketimi gece döngüsünde yüksektir. Hali hazırda yüksek olan besin tüketimini uyarım ile ilişkilendirip, yanıltıcı bir sonuca varmamak için, uyarım sonrası besin tüketimi kaydedilmemiştir.



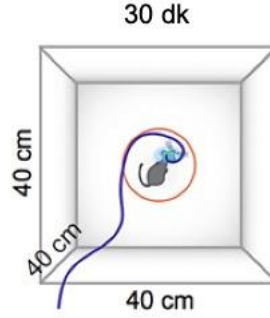
Şekil 6.2.2.1. MCHChR2 akut iştah üzerinde etkisi a) Gündüz döngüsü b) Gece döngüsü

Optogenetik MCH uyarımı ile kemogenetik MCH aktivasyon ve inhibisyon deney bulgularına göre MCH nöronlarının akut iştah kontrolü üzerinde etkisi bulunmamaktadır.

6.3. MCH nöronlarının lokomotor aktivite üzerindeki etkisi

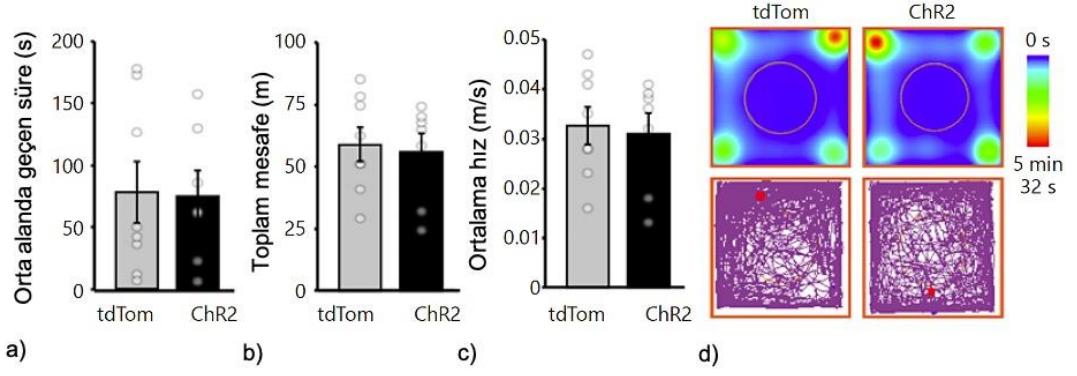
MCH nöronlarının kemogenetik ve optogenetik manipülasyonunun akut iştah düzenlenmesi için gerekli veya yeterli olmadığı bulunması üzerine, enerji harcamasını anlayabilmek için *Pmch-cre* farelerin lokomotor aktiviteleri test edildi. Locomotor aktiviteyi değerlendirebilmek için, açık alan deneyleri yapıldı.

Optogenetik uyarımla yapılan açık alan deneyinde, fiber optik ferül takılmış MCH^{ChR2} ve MCH^{tdTom} fareler, 40 cm x 40 cm x 40 cm ebatlarındaki açık alan deney düzeneğine bırakılmış ve 30 dakika boyunca 10 ms 20-Hz frekansında, 15 mW gücünde ve 473 nm dalga boyunda optogenetik uyarıma maruz kalmıştır. Deney düzeneğinin şematik gösterimi Resim 6.3.1.'de sunulmuştur.



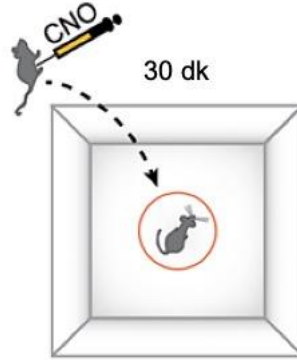
Resim 6.3.1. MCH^{ChR2} açık alan testinin şematik gösterimi

Fiber optik ferül takılmış MCH^{ChR2} ve MCH^{tdTom} fareler ile yapılmış açık alan deneylerinin sonuçlarına göre, orta alanda geçen zaman (MCH^{tdTom} : $78,29 \pm 24,08$ s, MCH^{ChR2} : $75,2 \pm 20,06$ s; $p > 0,05$), toplam mesafe (MCH^{tdTom} : $58,92 \pm 6,89$ m, MCH^{ChR2} : $55,89 \pm 7,45$ m; $p > 0,05$) ve ortalama hız (MCH^{tdTom} : $0,033 \pm 0,004$ m/s, MCH^{ChR2} : $0,031 \pm 0,004$ m/s; $p > 0,05$) bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Deneyler AnyMaze yazılımı ile takip edilmiş, ısı ve takip haritaları çıkarılmıştır. Isı haritası 0 saniye ile 5 dk arasındaki hareketi göstermektedir. Takip haritasında görülen kırmızı nokta $Pmch-cre$ farelerin son pozisyonunu belirlemektedir (Şekil 6.3.2.).



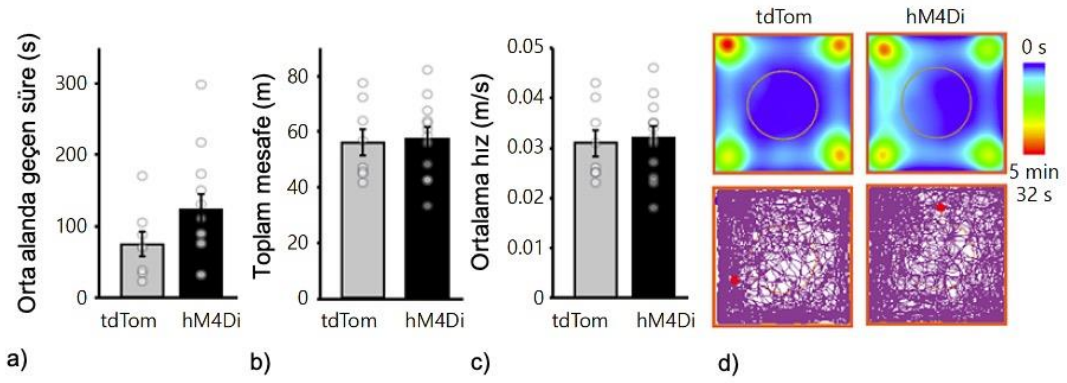
Şekil 6.3.2. MCHChR2 ve MCHtdTom açık alan testi a) Orta alanda geçirilen süre b) Toplam mesafe c) Ortalama hız d) Açık alan ısı ve takip haritaları

Kemogenetik manipülasyon ile yapılan açık alan deneyinde, intraperitoneal olarak, 300 μ L %0,9 izotonik NaCl solüsyonu içinde 3 mg/kg CNO enjekte edilmiş MCH^{hM4Di} ve MCH^{tdTom} fareler, 30 dakika boyunca 40 cm x 40 cm x 40 cm ebatlarındaki açık alan deney düzeneğine test edilmiştir. Deney düzeneğinin şematik gösterimi Resim 6.3.3.'de sunulmuştur.



Resim 6.3.3. MCH^{hM4Di} açık alan testinin şematik gösterimi

CNO uygulanmış MCH^{hM4Di} ve MCH^{tdTom} fareler ile yapılan açık alan deneyi sonuçlarına göre, orta alanda geçen zaman (MCH^{tdTom} : $75,05 \pm 16,80$ s, MCH^{hM4Di} : $122,86 \pm 22,42$ s; $p > 0,05$), toplam mesafe (MCH^{tdTom} : $56,03 \pm 4,83$ m, MCH^{hM4Di} : $57,50 \pm 4,06$ m; $p > 0,05$) ve ortalama hız (MCH^{tdTom} : $0,031 \pm 0,0027$ m/s, MCH^{hM4Di} : $0,032 \pm 0,0023$ m/s; $p > 0,05$) bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Deneyler AnyMaze yazılımı ile takip edilmiş, ısı ve takip haritaları çıkarılmıştır (Şekil 6.3.4.).

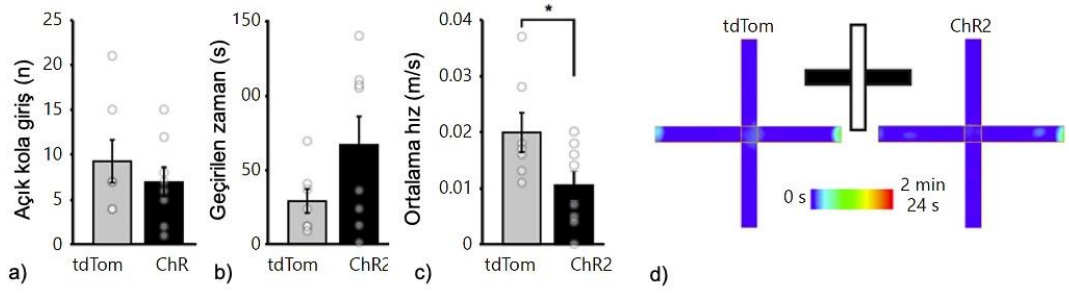


Şekil 6.3.2. MCH^{hM4Di} ve MCH^{tdTom} açık alan testi a) Orta alanda geçirilen süre b) Toplam mesafe c) Ortalama hız d) Açık alan ısı ve takip haritaları

6.4. MCH nöronlarının lokomotor aktivite üzerindeki etkisi

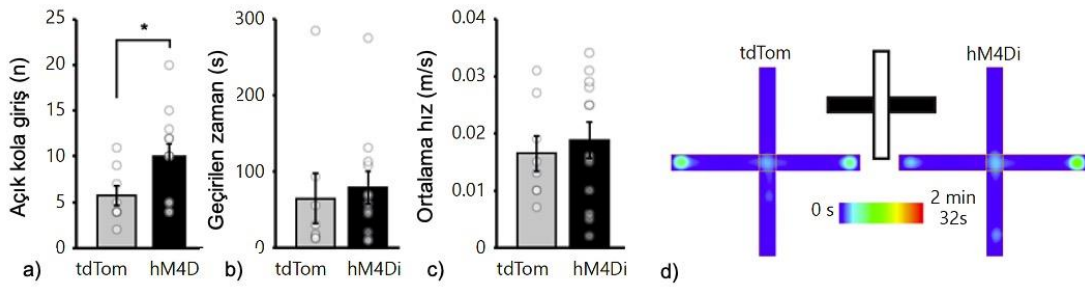
MCH nöronlarının, akut iştah ve enerji harcaması regülasyonunda rolünün bulunmaması üzerine, bu nöronların anksiyete üzerindeki etkileri araştırıldı. MCH nöronları uyarılmış farelerin anksiyete seviyelerini değerlendirebilmek için, yükseltilmiş artı labirent testi yapıldı. 5 cm x 35 cm boyutlarında 2 açık kolu, 5 cm x 35 cm x 20 cm boyutlarında 2 kapalı kolu olan ve 35 cm yükselebilen deney düzeneği kuruldu. Fiber optik ferül takılmış MCH^{Chr2} ve MCH^{tdTom} fareler, 5 dakika boyunca 10 ms 20-Hz frekansında, 15 mW gücünde ve 473 nm dalga boyunda optogenetik uyarıya maruz bırakıldı ve yükseltilmiş artı labirent deney düzeneğinde test edildi. Deneyler AnyMaze yazılımı ile takip edildi, ısı ve takip haritaları çıkarıldı.

Elde edilen bulgulara göre, açık kola giriş sayılarının MCH^{tdTom}. ($n = 9,29 \pm 2,47$) ve MCH^{Chr2} ($n = 7,00 \pm 1,67$) farelerde değişiklik göstermediği tespit edildi ($p > 0,05$). Açık kolda geçirilen zaman, MCH^{tdTom}. ($29,00 \pm 8,22$ s) ve MCH^{Chr2} ($66,86 \pm 19,06$ s) gruplarında farklılık gösterse de, uyarım sonrası gözlenen bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$). Gruplar arası en önemli fark, açık koldaki ortalama hız değerlerinde tespit edildi. MCH^{tdTom} fareler açık kolda ortalama $0,0020 \pm 0,0035$ m/s hız ile hareket ederken, bu değer MCH^{Chr2} farelerde $0,0011 \pm 0,0026$ m/s değerine düştü. MCH nöronlarının uyarılmasından sonra açık kolda kaydedilen ortalama hız düşüşü, istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$) (Şekil 6.4.1.).



Şekil 6.4.1. MCH^{ChR2} ve MCH^{tdTom} yükseltmiş artı labirent testi a) Açık kola giriş b) Geçirilen süre c) Ortalama hız d) Isı ve takip haritaları

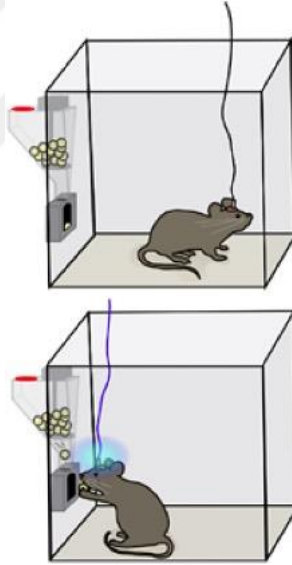
MCH nöronlarının baskılanmasının anksiyete üzerindeki etkisinin araştırılması için, bu nöronlar kemogenetik olarak susturulmuştur. MCH^{hM4Di} ve MCH^{tdTom} farelerin kullanıldığı bu deneylerde aynı yükseltmiş artı labirent düzeneğinden faydalanılmıştır. 300 µL %0,9 izotonik NaCl solüsyonu içinde 3 mg/kg CNO enjekte edilmesinin ardından, fareler 5 dakika boyunca test edilmiştir. MCH^{tdTom} fareler açık kola $5,75 \pm 1,06$ defa girmişken; MCH^{hM4Di} farelerin açık kola giriş sayıları $10,00 \pm 1,41$ olarak kaydedilmiştir. MCH nöron inhibisyonu sonucu, açık kola gitme sayısı önemli ölçüde artmıştır ($p < 0,05$). Gruplar arasında açık kolda geçirilen zaman (MCH^{tdTom}: $65,00 \pm 32,93$ s, MCH^{hM4Di}: $79,54 \pm 21,15$ s) ve açık kolda kaydedilen ortalama hız (MCH^{tdTom}: $0,017 \pm 0,0030$ m/s, MCH^{hM4Di}: $0,019 \pm 0,0032$ m/s) bakımından değişim tespit edilmemiştir (Şekil 6.4.2.).



Şekil 6.4.2. MCH^{hM4Di} ve MCH^{tdTom} yükseltmiş artı labirent testi a) Açık kola giriş b) Geçirilen süre c) Ortalama hız d) Isı ve takip haritaları

6.5. MCH nöronlarında besin tüketimi ile eşleşmiş foto-uyarım

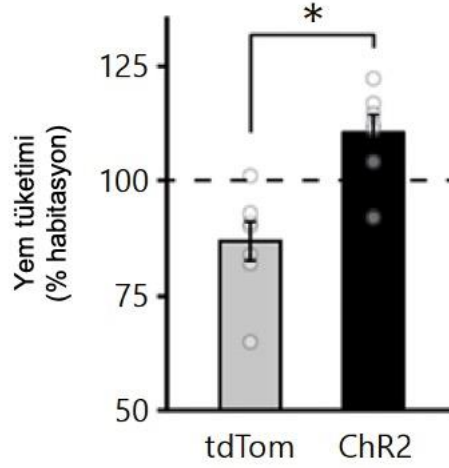
MCH nöron aktivasyonunun akut iştahı başlatacak veya var olan iştahı pekiştirecek güçte olmadığına anlaşılması üzerine, bu nöronların ödül algısına olan katkısı test edildi. Metabolik kafeslerde hareket sensörüne bağlı yem dağıtımı düzeneği kuruldu. Habitasyon günleri boyunca farelerin bu yem vericiyi kullanmayı öğrenmesi beklendi. Bu sürede herhangi bir foto-uyarım verilmedi. Test gününde, hareket sensörüne bağlı yem dağıtım düzeneği ile MCH nöronlarının optogenetik olarak uyarımı eşleştirildi. Kurulan deney düzeneğine göre, MCH^{ChR2} veya MCH^{tdTom} fareler yem almak için kafalarını sensörün bulunduğu girintiye soktuklarında 1 adet 20 mg pellet yem aldılar ve eşzamanlı olarak 10 ms 20-Hz frekansında, 15 mW gücünde ve 473 nm dalga boyunda foto-uyarım ile MCH nöronları aktive edildi. Dolayısıyla, MCH nöronlarının uyarımı besin ile eşleşmiş olarak kendilerine bırakıldı. Kurulan deney düzeneği Resim 6.5.1.'de şematize edilmiştir.



Resim 6.5.1. MCH^{ChR2} ve MCH^{tdTom} farelerde besin tüketimi ile eşleşmiş foto-uyarımın şematik gösterimi

Besin tüketimi ile optogenetik aktivasyonunun eşleşmesi, dolayısıyla MCH nöronlarının stimülasyonunun oto-uyarım şeklinde MCH^{ChR2} ve MCH^{tdTom} farelerin kontrolüne bırakılması, besin tüketimini önemli ölçüde arttırdı. Habitasyon, yani foto-uyarımın olmadığı günlere kıyaslandığında MCH^{tdTom} farelerde pellet yem tüketim oranı $86,87 \pm 4,30$ seviyesinde kaldı. Ancak, MCH^{ChR2} farelerde foto-

uyarım sonrası besin tüketimi, uyarım olmayan günlere kıyasla $110,67 \pm 3,72$ seviyesine çıktı. Besin tüketimi ile eşleştirilen MCH nöronlarının foto-uyarımı, tüketim yüzdesini istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırdı ($p=0,0013$). Elde edilen bulgular Şekil 6.5.1.'de verilmiştir.



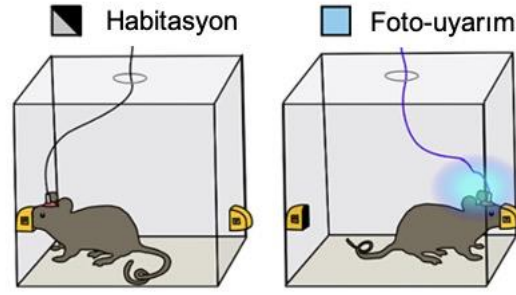
Şekil 6.5.1. MCH^{ChR2} ve MCH^{tdTom} farelerde besin tüketimi ile eşleşmiş foto-uyarım sonrası yem tüketim yüzdesi

6.6. MCH nöronlarında besinden bağımsız oto-uyarım

MCH nöronlarının akut iştah regülasyonu üzerinde etkisi bulunmaması; ancak besin tüketiminin foto-uyarım ile eşleşmesi sonucu iştahın artması üzerine, oto-uyarımın besinden bağımsız olarak yapıldığı deney düzenekleri kuruldu.

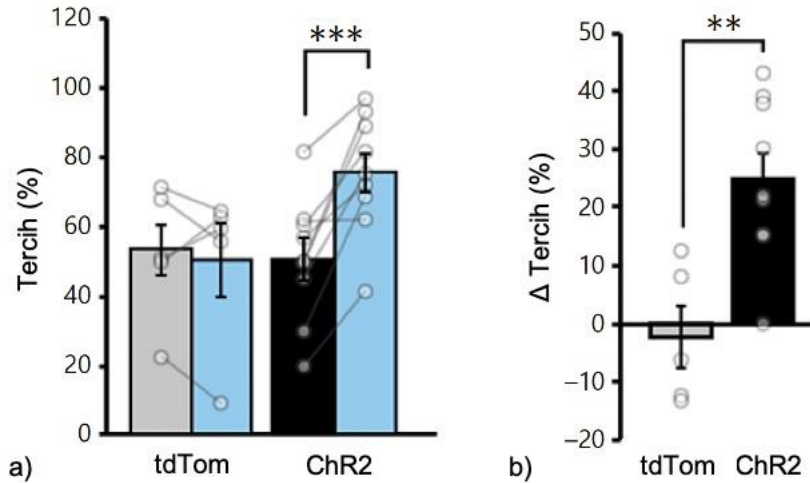
6.6.1. Burun hareketi ile besinden bağımsız oto-uyarım

Metabolik kafeslerin sağ ve sol taraflarına birer girinti açıldı ve içlerine hareket sensörleri yerleştirildi. Habitasyon süreci boyunca, herhangi bir uyarım olmadan farelerin tercih etmediği girinti belirlendi. Test gününde tercih edilmeyen girintideki sensöre, MCH nöronlarını uyaracak 10 ms 20-Hz frekansında, 15 mW gücünde ve 473 nm dalga boyunda foto-uyarım bağlandı. Diğer girintideki sensöre foto-uyarım bağlanmadı. MCH^{ChR2} ve MCH^{tdTom} farelerin girintilerdeki aktiviteleri gözlemlendi. Kurulan deney düzeneği Resim 6.6.1.1.'de şematize edilmiştir.



Resim 6.6.1.1. MCHChR2 ve MCHtdTom farelerde burun hareketi ile besinden bağımsız oto-uyarım

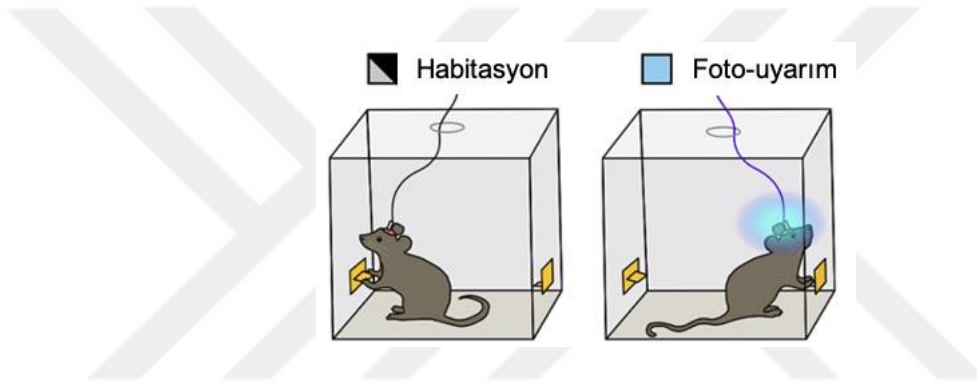
Test gününde elde edilen bulgular, MCH nöronlarının foto-uyarımını MCH^{ChR2} farelerin kontrolüne bırakmanın, tercihi önemli ölçüde arttırdığını gösterdi. Buna göre, MCH^{tdTom} farelerde habitasyon gününde tercih $52,66 \pm 8,70$ seviyesindeyken, uyarım gününde herhangi bir değişiklik gözlenmedi ve tercih $50,34 \pm 10,44$ seviyesinde kaldı ($p > 0,05$). Ancak, oto-uyarım imkanı MCH^{ChR2} farelerde tercihi önemli ölçüde arttırdı. MCH^{ChR2} farelerde habitasyon gününde $50,68 \pm 6,02$ olan tercih, uyarım gününde $75,56 \pm 5,75$ seviyesine yükseldi. MCH^{ChR2} farelerine sunulan MCH nöronlarının oto-uyarım imkanı, tercihi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırdı ($p = 0,0002$). Oto-uyarım kontrolü MCH^{tdTom} farelerin tercihini sadece $-2,32 \pm 5,34$ değiştirebilirken, MCH^{ChR2} farelerin tercihini $24,88 \pm 4,64$ oranına çıkardı ($p = 0,003$) (Şekil 6.6.1.1.).



Şekil 6.6.1.1. MCHChR2 ve MCHtdTom farelerde burun hareketi ile a) Uyarımsız günlere oranla oto-uyarım yüzdesi b) Oto uyarım sonrası değişen tercih yüzdesi

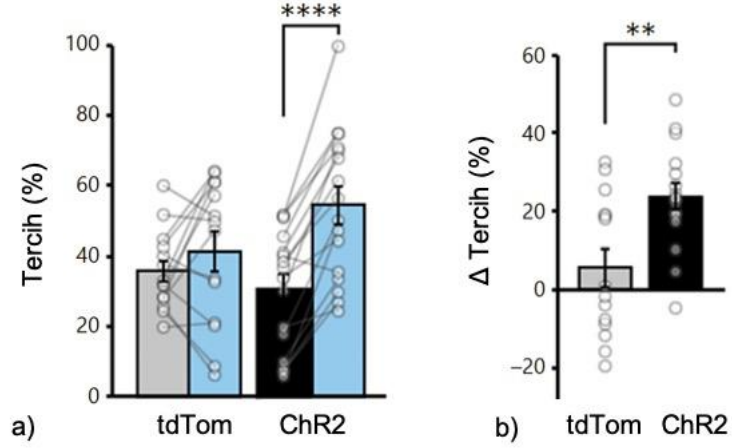
6.6.2. Basamak ile besinden bağımsız oto-uyarım

Metabolik kafeslerin sağ ve sol taraflarına, farelerin basabileceği birer basamak yerleştirildi. Habitasyon süreci boyunca, herhangi bir uyarım olmadan farelerin basamağa basmaları izlendi ve tercih etmedikleri basamak belirlendi. Test gününde tercih edilmeyen basamağa, MCH nöronlarını uyaracak 10 ms 20-Hz frekansında, 15 mW gücünde ve 473 nm dalga boyunda foto-uyarım bağlandı. Diğer basamaga ise foto-uyarım bağlanmadı. MCH^{ChR2} ve MCH^{tdTom} farelerin basamaklardaki aktiviteleri gözlemlendi. Kurulan deney düzeneği Resim 6.6.2.1.'de şematize edilmiştir.



Resim 6.6.2.1. MCHChR2 ve MCHtdTom farelerde basamak ile besinden bağımsız oto-uyarım

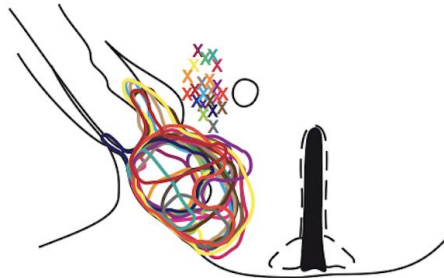
Test gününde, besinden bağımsız olarak MCH nöronlarının foto-uyarımını MCH^{ChR2} farelerin kontrolüne bırakmanın, tercihi oldukça fazla arttırdığı gözlemlendi. MCH^{tdTom} farelerde habitasyon gününde tercih $35,81 \pm 2,98$ seviyesindeyken, uyarım gününde herhangi bir değişiklik gözlenmedi ve tercih $41,41 \pm 5,52$ seviyesinde kaldı ($p > 0,05$). Ancak, oto-uyarımın MCH^{ChR2} farelerin kontrolüne verilmesi, tercihi önemli ölçüde arttırdı. MCH^{ChR2} farelerde habitasyon gününde $30,68 \pm 4,19$ olan tercih, uyarım gününde ciddi bir artış göstererek $54,37 \pm 5,36$ seviyesine yükseldi. MCH^{ChR2} farelerine sunulan MCH nöronlarının oto-uyarım imkanı, tercihi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırdı ($p < 0,00001$). Oto-uyarım kontrolü MCH^{tdTom} farelerin tercihini sadece $-5,60 \pm 4,80$ değiştirebilirken, MCH^{ChR2} farelerin tercihini $23,69 \pm 3,38$ oranına çıkardı ($p = 0,0039$) (Şekil 6.6.2.1.).



Şekil 6.6.2.1. MCH^{ChR2} ve MCH^{tdTom} farelerde basamak ile a) Uyarımsız günlere oranla oto-uyarım yüzdesi b) Oto uyarım sonrası değişen tercih yüzdesi

6.7. Davranış deneyleri sonrası post-hoc analizler

MCH^{ChR2} , MCH^{hM3Dq} , MCH^{hM4Di} ve MCH^{tdTom} fareler, davranış deneyleri sonrası sakrifiye edildi ve rAAV enfeksiyonu olan hücre sayıları belirlendi. Optogenetik aktivasyon deneylerinde kullanılan farelerde, Lateral Hipotalamus bölgesinin yaklaşık 400 nm üstüne fiber optik yerleştirildi. Fiber optik ferülün MCH nöronlarına zarar verip vermediğini ve intrakraniyal enjeksiyonun tutarlılığını tespit edebilmek için post-hoc analizler yapıldı. Konfokal mikroskop ile elde edilen görüntülerdeki enfeksiyon alanları ImageJ programı ile sınırlandırıldı ve Resim 6.7.1.'de gösterilen enjeksiyon haritası çıkarıldı. Buna göre, ChR2-eYFP enjeksiyonun, Lateral Hipotalamus bölgesinde bulunan MCH nöronlarını kapsayan geniş bir alanı etkilediği tespit edildi.



Resim 6.7.1. ChR2-eYFP enfeksiyon haritası

7. TARTIŞMA

İştah ve beslenmenin sadece fizyolojik bir durum olmadığı, merkezi ve periferal sinir sistemlerinde bulunan, çok karmaşık sinir ağları tarafından kontrol edildiğinin fark edilmesiyle çalışmalar bu alana yönelmiştir. İştah regülasyonu yapan ve ödül algısı yaratan çok sayıda sinirsel ağ deşifre edilmiş olsa da, merkezi ve periferal sinir sistemlerinin enerji homeostazı üzerindeki rolü tamamıyla anlaşılammıştır. Merkezi sinir sisteminin Hipotalamus bölgesinde bulunan birçok çekirdek ve alan, organizmanın enerji durumunun algılanmasında ve kontrol edilmesinde anahtar rol oynar (3). Bu bölgede bulunan Lateral Hipotalamik Alan, farklı hücre popülasyonlarını bir arada barındırması, heterojen olması, çok sayıda sinirsel ağlara sahip olması nedeniyle istah ve ödül merkezlerinin en önemlilerinden biri olarak kabul edilmektedir (5, 6). Melanin Konsantre Eden Hormon nöronları, bu alanda bulunan, oldukça geniş yer kaplayan ve yaygın bir projeksiyon ağına sahip olan bir hücre popülasyonudur. Yapılan çalışmalar MCH nöronlarını beslenme davranışını düzenleyen tipik bir oreksijenik nöropeptit gibi sunsa da (8, 98), bu nöronların akut iştah kontrolündeki rolü ve ödül algısı üzerindeki etkisi tam olarak deşifre edilememiştir.

Bu tez çalışmasında, Melanin Konsantre Eden Hormon nöronlarının, akut iştah ve ödül algısı regülasyonundaki etkisi araştırılmaktadır. Bu amaç doğrultusunda, *Pmch-cre* ifade eden transgenik fareler kullanılmıştır. Bu transgenik farelerin MCH nöronlarında cre enzimi bölge spesifik rekombinasyon yapmaktadır. Cre enzimi tarafından tanınan ve hücre tipi spesifik manipülasyon yapmayı mümkün kılan LoxP dizisi ise ürettiğimiz rekombinant adeno-asosiyal virüsler içinde bulunmaktadır. Bu virüslerde ana vektörün yanı sıra, zıt yönlerde LoxP dizileri vardır. Lox P bölgelerinin cre enzimi tarafından tanınması durumunda terse çevrilme gerçekleşeceğinden, bu nöronlarda virüs içerisinde bulunan transgen ifadesi başlayacaktır. Cre enzimi bulunmayan hücrelerde iki LoxP arasındaki DNA dizisi terse çevrilmeyecek, dolayısıyla transgen ifade edilmeyecektir. Bu yöntem sayesinde belirli nöron alt gruplar ile çalışmak mümkündür. Bu tez çalışmasında bahsi geçen teknikten yararlanılmıştır. *Pmch-cre* farelere intrakraniyal olarak enjekte edilen

rAAV, zıt yönlere LoxP dizisi içermekte ve MCH nöronlarına transdüksiyonu gerçekleştiren virüslerdeki transgen DNA dizisi tersine çevrilmektedir. Dolayısıyla sadece MCH nöronlarında enjekte edilen vektör ifadenmektedir (99, 100).

MCH nöronlarının aktivitesini invaziv olmayan metotlar ile manipüle edebilmek için optogenetik ve kemogenetik yöntemlerden yararlanıldı. Bu metotlar geri dönüşlü olduğundan ilgili nöronlara hasar vermemekte ve fatal etkiler yaratmamaktadır. rAAV ile intrakraniyal olarak MCH nöronlarına enjekte edilen hM3Dq-mCherry vektörü sayesinde bu nöronları depolarize etmek; hM4Di-mCherry vektörü sayesinde ise bu nöronları hiperpolarize etmek mümkündür. Bu vektörler modifiye G-protein bağlı reseptörler olup, uygun agoniste bağlanmadıkları takdirde hücrelerde inaktif pozisyondadır (99, 100). Dizayn edilmiş ilaçlar ile aktive edilen dizayn edilmiş reseptörleri (DREADD) aktive edebilmek için, klozapin molekülü veya onun sentetik bir türevi olan klozapin-N-oksit (CNO) ligandı gerekmektedir. Bu çalışmada kemogenetik manipülasyon için, intraperitoneal olarak 3 mg/kg CNO veya 0,01 mg/kg CLZ kullanılmıştır.

Uzun yıllar boyunca DREADD agonisti olarak klozapin molekülünün sentetik bir türevi olan CNO kullanılmaktaydı. CLZ yerine CNO kullanmasının en önemli sebebinin, CNO molekülünün biyolojik olarak inert olduğu görüşüydü. Ancak son yıllarda yapılan bazı çalışmalar, DREADD agonisti olarak kullanılan CNO molekülünün, CLZ molekülüne geri metabolize olduğunu göstermiştir (101). Bu geri metabolizasyon durumunda, CNO veya CLZ kullanımının sadece fareye enjekte edilecek madde miktarını değiştirdiği öne sürülmüştür. Öte yandan, bazı çalışmalar CNO molekülünün biyolojik olarak inert olduğunu vurgulamaktadır. Bu ikilemi ortadan kaldırabilmek için, kemogenetik deneyler hem 3 mg/kg CNO, hem de 0,01 mg/kg CLZ ile yapılmıştır. Buna ek olarak, önceden inert olduğu düşünülen CNO molekülünün geri metabolizasyon sonrası, klozapin molekülünde olduğu gibi, serotonin ve dopamin reseptörlerini etkilediği düşünülmektedir (101). Henüz tam olarak gösterilmemiş bu etkinin yaratabileceği sorunları öngörerek, CNO veya CLZ kullanılarak yapılan kemogenetik aktivasyonu, agonist gerektirmeyen optogenetik aktivasyonla tekrarladık.

Optogenetik uyarım, MCH nöronlarında transdüksiyonu gerçekleştiren ChR2-eYFP vektörü ile yapılmıştır. Farelere enjekte edilen ChR2-eYFP vektörü, bu hücrelerde ışığa duyarlı Na⁺ kanalı ifadelenebilirliğini sağlamaktadır. Duyarlı olduğu 473 nm dalga boyunda ışık uygulandığında Na⁺ kanalları açılır ve nöronlar depolarize olur. Bu sayede aksiyon potansiyeli oluşur. Nöron alt gruplarını hedef almayı ve aktive etmeyi mümkün kılan bu teknik ile, saniyeler içinde opsin sentezleyen hücreleri aktive etmek mümkündür (102, 103). Çalışmamızda *Pmch-cre* transgenik farelerde ifadelenen ChR2-eYFP vektörü sayesinde, bu nöronlar ışığa duyarlı hale getirilmiş ve 473 nm dalga boyunda foto-uyarım sonucu depolarize edilmiştir.

Bu tez çalışmasında ilk olarak MCH nöronlarının manipülasyonunun akut iştah kontrolü üzerindeki etkisi araştırıldı. Erken dönem çalışmalar, MCH nöronlarının aşırı ifadelendiği fare modellerinde besin tüketiminin önemli ölçüde arttığını göstermiştir. Bu durumu kilo artışı, obezite ve insülin direnci takip etmektedir (9). Fakat MCH nöronlarının aşırı ifadelendiği fare modelleri, bu hücrelerin akut iştah yaratma veya var olan iştahı sürdürme kontrolü üzerindeki etkisini açıklayamamaktadır. Bu sebeple hücre içi spesifik hM3Dq-mCherry veya ChR2-eYFP transgen ifadesi bulunan MCH nöronlarını akut olarak uyardık ve farelerin besin tüketimlerini gözlemledik. Deneyler ilk olarak, farelerin nokturnal olması sebebiyle, normalde besin tüketimi saati olmayan gündüz döngüsünde yapıldı. Beklenenin aksine, bu nöronların uyarımı gündüz döngüsünde akut iştah üzerinde bir etki göstermedi. Gece döngüsünde, yani farelerin aktif olduğu saatlerde yapılan aktivasyon deneyleri sonucunda, benzer şekilde, akut iştah artışı gözlenmedi. Agonist olarak bir CNO ve CLZ ayrı ayrı test edildi. DREADD agonisti olarak CNO veya CLZ kullanılmasının, MCH nöron aktivasyonunun akut iştah üzerindeki rolünü değiştirmediği tespit edildi.

MCH nöronlarının *in vivo* aktivasyonunun, oldukça yüksek ateşleme kapasitesine sahip olduğu bilindiğinden (90), akut iştah kontrolündeki rolü, kemogenetik uyarıma ek olarak optogenetik uyarımla da test edildi. MCH^{ChR2} ve MCH^{tdTom} fareler, hücrelerde ifade ettirilen Na⁺ kanallarını açacak 473 nm dalga boyu ışığa maruz

kaldıklarında, farelerin akut iştahlarında herhangi bir değişiklik gözlenmedi. Gündüz ve gece döngüsünde yapılan optogenetik aktivasyon sonucu, besin tüketiminde değişim saptanmadı.

MCH nöronlarının akut iştah üzerindeki etkisini test edebilmek için, son olarak bu nöronların aktivasyonu, hM4Di-mCherry vektörü içeren rAAV ile baskılandı. Mevcut literatüre göre, MCH nöronlarının konjenital veya yetişkin ablasyonunun; iştah kaybı, besin tüketiminde azalma ve kilo kaybına sebebiyet verdiğini göstermiştir (15, 16). Yaptığımız deneylerde, MCH nöronlarını akut olarak inhibe etmenin, akut iştahı azaltmadığı ve hatta beslenme davranışında herhangi bir değişikliğe yol açmadığını gözlemledik. Elde ettiğimiz bulgular, sentetik CNO molekülü ve CLZ etken maddesi ile ayrı ayrı test edildi.

Bu noktada, üretmiş olduğumuz, kemogenetik ve optogenetik transgenleri içeren rAAV'lerin işlevselliğini test edebilmek ve dolayısıyla elde ettiğimiz bulguların, gerçek bağlamda MCH nöronlarının özelliği olduğunu gösterebilmek için, elektrofizyolojik ortamda MCH^{hM3Dq} ve MCH^{hM4Di} ifadelenmesini, CLZ ekleyerek test ettik. Buna göre, taze MCH^{hM3Dq} beyin kesitlerinden kaydedilen spontan aktivite sırasında perfüzyona CLZ eklendiğinde depolarizasyon gerçekleştiğini; taze MCH^{hM4Di} beyin kesitlerinden kaydedilen spontan aktivite sırasında perfüzyona CLZ eklendiğinde ise hiperpolarizasyonun gerçekleştiğini gözlemledik. Öte yandan, sakrifiye etmeden hemen önce foto-uyarım yaptığımız MCH^{ChR2} farelerin MCH nöronlarında yoğun cFos ifadelenmesi gözlemledik. Dolayısıyla, elde ettiğimiz bulgular, MCH nöronlarında transgen ifadesi bulunduğuna ve foto-uyarım sonrası nöronal aktivitenin arttığını göstermektedir. Bu durum, elde edilen akut iştah bulgularının güvenilirliğine katkıda bulunur niteliktedir.

Akut iştah regülasyonu üzerine yapılan tüm çalışmalarda ortaya çıkan ortak sonuç, MCH nöronlarının iştah kontrolünde bir rolünün bulunmadığı; bu nöronların beslenme için gerekli veya yeterli olmadığı yönündedir. MCH nöronları, akut iştahı başlatmaya veya var olan akut iştahı değiştirmeye yetkin değildir.

MCH nöronlarının akut iştah etkisine dair elde ettiğimiz bulgular, mevcut literatürden ve bilgi birikiminden farklı bir yol çizmektedir. MCH nöronlarının aşırı ifadelenmesini veya genetik ablasyonunu hedef alan deneyler sonucunda, bu nöronların oreksijenik olduğu düşünülmekteydi (9, 15, 16). Her iki durumda da, kompensatuar mekanizmaların ve farklı yolların devreye girmiş olabileceğini göz önünde bulundurmak gerekmektedir.

Enerji harcamasındaki değişikliklerin, MCH yollarındaki genetik manipülasyonlar sonucu vücut ağırlığında meydana gelen değişikliklere katkıda bulunduğu öne sürülmüştür. Enerji harcamasının lokomotor aktivite ile ölçüldüğü bu deneylerde, MCHR1 knock-out veya nöronal ablasyonlu farelerin hiperaktif olduğu tespit edilmiş (16, 104), ancak MCH peptidi veya MCHR1 agonistlerinin infüzyon ile verilmesinin hareket üzerinde herhangi bir etkisi saptanmamıştır (11, 105). Mevcut literatürdeki bu bulgular, genetik ve farmakolojik yaklaşımlar arasında bir tutarsızlık olduğunu düşündürmektedir. Bu sebeple, yaptığımız açık alan deneylerinde MCH nöronal aktivitesinin kısa süreli manipülasyonlarının lokomotor aktivite üzerindeki etkisini değerlendirdik. MCH^{hM4Di} fareler ile kemogenetik inhibisyon, MCH^{Chr2} fareler ile optogenetik aktivasyon yaparak, akut lokomotor aktivitedeki değişimi gözlemledik. Elde ettiğimiz bulgular akut MCH manipülasyonunun, kısa süreli lokomotor aktivite üzerinde etkisi olmadığını göstermektedir. Hausen ve ark., kemogenetik MCH aktivasyonunu gece döngüsü boyunca 8 saate çıkardıkları ve bilateral olarak uyarım yaptıkları çalışmalarında, bu nöronların lokomotor aktivite üzerindeki baskılayıcı etkisi olduğunu bildirdiler (23). Fakat bu çalışmanın, doğası gereği nokturnal olan farelerin aktif olduğu zaman diliminde, yani gece döngüsünde ve 8 saat boyunca yapıldığının göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Bu tez çalışmasında lokomotor aktiviteyi, besin tüketiminin artmasını öngördüğümüz gündüz döngüsünde ve 30 dakika boyunca test ettik. Bu sayede, elde ettiğimiz akut iştah bulgularında, lokomotor aktivitenin bir rolü olup olmadığını test etmeyi amaçladık.

Elde ettiğimiz bu bulgunun, farelerde artan lokomotor aktivite, stres veya anksiyeteden kaynaklanma olasılığı test edebilmek için, MCH^{hM3Dq} , MCH^{hM4Di} ve MCH^{Chr2} farelere açık alan testi ve yükseltilmiş artı labirent testi yaptık. Açık alan

testinde merkezde geçirilen zaman, toplam alınan mesafe ve ortalama hız parametrelerini; yükseltilmiş artı labirent testinde ise açık kola giriş sayısı, açık kolda geçirilen zaman ve ortalama hız parametrelerini inceledik.

Mevcut literatürde, MCH yolaklarının farmakolojik ve genetik manipülasyonlarının anksiyete benzeri davranışlar üzerindeki etkileri hakkında çelişkili bilgiler bulunmaktadır (106, 107). Yükseltilmiş artı labirent testi ile, MCH nöronlarının bilateral akut kemogenetik aktivasyonu ve inhibisyonu ile unilateral akut optogenetik aktivasyonunun anksiyete üzerindeki etkisini değerlendirdik. Optogenetik aktivasyon sonucu açık koldaki ortalama hızda düşüş, kemogenetik inhibisyon sonucu ise açık kola giriş sayısını önemli ölçüde artış saptanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda, MCH nöronlarının bastırılmasının anksiyolitik bir etkiye sahip olabileceği düşünülmektedir. Bulgularımız, genetik ablasyon çalışmalarının işaret ettiği, ancak MCHR1 antagonistleri ile yapılan farmakolojik çalışmalarda gözlenmeyen (106, 107) MCH nöronlarının anksiyolitik etkisine açıklık getirmiştir. MCH nöronlarının baskılanması anksiyolitik etki yaratmaktadır.

Hipotalamik beslenme ve ödül algısının MCH nöronları tarafından nasıl düzenlendiği uzun yıllardır incelenmektedir (1, 17, 21, 79). Ancak yapılan çalışmaların nicel çoğunluğunun aksine, MCH nöronlarının metabolizma ve ödülün nöronal regülasyonunun altında yatan mekanizmalar tam olarak anlayamamıştır. Kısa vadeli iştah kontrolünde ulaştığımız sonuçlar, MCH manipülasyonunun, toplam besin tüketimi etkilemediği, hatta gıda alımını başlatmak için yeterli veya gerekli olmadığını gösterdi. Bu durum, arkuat çekirdekte bulunan AgRP nöronları veya LH^{VGAT} nöronları gibi diğer oreksijenik popülasyonların aktivasyonu sonucu gözlemlenen davranışlara tezat oluşturmaktadır (1, 36). Eğer MCH nöronları, açlık düzeyini artırmaktan ziyade beslenme sırasında pekiştirici bir role sahipse, tüketim sırasında veya hemen sonrasında aktif hale gelmeleri beklenir. Bu noktada, MCH nöronlarının ödül algısında rolü olabileceği göz önünde bulundurduk ve nöronal aktivasyonu ile besin tüketimini ile eşleştirmenin, tüketilen besinin ödül değerini artırarak aşırı yemeye yol açabileceğini düşündük. Bu hipotezi test edebilmek için, MCH nöronlarının optogenetik aktivasyonunu, otomatik pellet dağıtıcıdan yem

verilmesi ile eşleştirdik. Kurduğumuz dzenekte, fare besin almak için otomatik yem vericinin sensörünü aktive ettiği anda, 473 nm 20-Hz optik lazer devreye girerek, MCH nöronlarında foto-uyarım gerçekleştirmektedir. 20 mg'lık bir yem pelletini tüketmenin yaklaşık 15 saniye sürdüğünü varsayarak, MCH nöronlarının foto-uyarım uzunluğunu, her pellet çıktıktan sonra 15 saniye sürecek şekilde ayarladık. Akut iştah bulgularının aksine, MCH nöronlarının yem tüketimiyle eşleştirilmiş foto-uyarımı, 24 saatlik süre boyunca tüketilen toplam yem miktarında önemli ölçüde artışa sebebiyet verdi. Bütün bu bulgular birlikte ele alındığında, MCH nöron aktivasyonunun tek başına yiyecek arama veya açlık durumunun artmasına katkıda bulunmayacağı, ancak besin tüketimiyle eşleştirildiğinde beslenmeyi güçlendirmede ve pekiştirmede rol oynayabileceği anlaşılmıştır.

Domingos ve ark., MCH nöronlarının ödül algısına katkısını tayin edebilmek için MCH aktivasyonunun kalorisiz ve şekerli içecek ile eşleştirildiği bir dizi deneyler gerçekleştirdi. Sonuc olarak, MCH foto-uyarımının yalnızca oral tat ipuçları mevcut olduğunda, besinlere ödül değerı katabileceği öne sürdü (21). Ancak sonuçlarımız, MCH foto-uyarımının tatlı olmayan yiyeceklerle eşleştirilmesinin bile, tüketimi artırılabilceğini göstermektedir. Bu noktada ortaya çıkan çelişkiyi giderebilmek ve oral tat ipucunun gerekliliğini test edebilmek için, MCH foto-uyarım denkleminde besin ögesini çıkardık. MCH nöronal foto-uyarım imkanı, farelerin kendi tercihine bırakıldı. Metabolik kafeslerin sağ ve sol duvarlarına birer girinti veya basamak yerleştirildi ve farelerin tercih etmediği girintideki sensöre, 10 ms 20-Hz frekansında, 15 mW gücünde ve 473 nm dalga boyunda foto-uyarım sağlayacak lazer sistem bağlandı. Fareler girintiye burunlarını her soktuğunda veya basamağa her bastığında, sensörlerin MCH nöronlarını optogenetik olarak uyarması sağlandı. Diğer taraftaki girinti veya basamağa herhangi bir uyarım bağlanmadı. Sonraki günler, -uyarımli veya uyarımsız-, hangi tarafı tercih ettikleri gözlendi. MCH aktivasyonu, ilk başta tercih edilmeyen, ancak sonradan foto-uyarım ile eşleştirilen taraftaki hareketi önemli ölçüde arttırdı. MCH nöronlarını uyarmayı, farelerin kendi tercihine bıraktığımızda, farelerin oto-uyarım seviyelerinin olduğa fazla yükseldiğini belirledik. Bu bulgular, MCH aktivasyonunun tek başına oral veya post-oral ipuçlarının yokluğunda bile bir ödül etkisi oluşturmak için yeterli olduğunu

düşündürmektedir. 1954 yılında Olds ve ark. tarafından yapılmış bir çalışmada, bütün lateral hipotalamik alan elektriksel uyarımı, farelerin kendi inisiyatiflerine bırakıldı. Diğer bölgelerin oto-uyarımına nazaran, lateral hipotalamik alan oto-uyarımı farelerde doyumsuz bir basma istediği yarattı (72-74). Ancak bu çalışma, genel olarak bütün Lateral hipotalamik alan bölgesinin oto-uyarımını hedef aldığından, nöron alt gruplarının fonksiyonlarını göz ardı etmekteydi. Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda LHA aktivasyonunun ödül etkileri GABAerjik alt popülasyonda kaydedilmişken, glutamat ifade eden nöronlar ise aksine itici etki gösterilmiştir (1, 79). Yaptığımız tez çalışması, bu konuya katkıda bulunmakta ve bir yenilik getirmektedir. LHA^{MCH} nöronlarının aktivasyonunun, besinden veya post-oral bir ipucundan bağımsız olarak, bir ödül algısı oluşturduğunu göstermektedir. Çoğunlukla glutamaterjik olmasına rağmen (17), MCH nöronlarının oto-uyarımı da ödül etkisi yaratmaktadır.

MCH nöronlarının bazı Ventral Tegmental Alan (VTA) ve striatum gibi bazı önemli ödül merkezleri ile karmaşık sinirsel ağlar sayesinde iletim halinde olduğu bilinmektedir. MCH nöronlarının aksonları VTA ve striatuma uzanmakta ve bu bölgelerde yoğun olarak MCHR1 ifade edilmektedir (21, 108). ARC^{AgRP} ve LH^{GAT} nöronlarının aksine, MCH nöronları yeme motivasyonunu doğrudan uyarmak yerine, pekiştirici bir rol üstlenmektedir. Bu sonuçlar, MCHR1 antagonisti verilen sıçanların sükröz çözeltisi alabilmek için basamağa daha az bastıkları, MCH knock-out sıçanlarının yağlı besinlere karşı azalmış yanıt sergilediğini ve MCH nöron ablasyonlu farelerin kalorili veya kalorili olmayan tatlıları ayırt edemediğini gösteren önceki çalışmalarla tutarlıdır ve bu çalışmalara önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır (21, 108-110).

Bu noktadan itibaren yapılması gereken çalışmalar, MCH nöron aktivasyonu ile oluşan bu ödül değerinin hangi bağlantılar sayesinde gerçekleştiğini bulmaya yoğunlaşmalıdır. Bilindiği üzere, VTA ve striatum gibi kritik ödül merkezleri MCH nöronları ile iletişim halindedir (21, 108). Hangi genetik yolağın bu davranış biçimine sebebiyet verdiğini bulabilmek, bu nöronları anlamaya önemli ölçüde katkıda bulunacaktır.

Bu tez çalışmasında, yem tüketimini arttıran etkenin, sürekli MCH nöron aktivasyonu değil, beslemeyle eşleştirilmiş uyarı olduğu ve bu uyarımın ödül niteliği taşıdığı anlaşıldı. Özetle, MCH nöronlarının akut iştah regülasyonu üzerinde bir etkisi bulunmadığını, bu nöronların besin tüketimini değiştirmek için yeterli veya gerekli olmadığını tespit ettik. MCH nöronlarının baskılanmasının, anksiyolitik etkiye sahip olduğunu, ancak MCH nöron manipülasyonunun lokomotor aktivite üzerinde etkisi olmadığını gösterdik. MCH nöron aktivasyonu ile besin tüketimini eşleştirdiğimiz durumda artan yem miktarı ile, başlı başına bu nöronların uyarımının ödül değerinde olduğuna işaret ettik. Sonuç olarak, besinden veya oral bir ipucundan bağımsız MCH oto-uyarımı sonrası, bu nöronların aktivasyonunun bir ödül algısı yarattığını tespit ettik.

8. SONUÇ

Uzun yıllar boyunca iştah kontrolü ile ilişkili olduğu bilinen Lateral Hipotalamik Alan nöron alt popülasyonlarından olan Melanin Konsantre Eden Hormon nöronlarının aktivasyonunun, beklenenin aksine, oreksijenik; inhibisyonunun ise anoreksijenik etkiler yaratmadığı, gündüz ve gece döngülerinde yaptığımız akut iştah kontrolü ile belirledik. Gözlemediğimiz bu etkiler, direkt olarak nöronların fonksiyonlarına işaret etmektedir. Besin tüketiminin enerji harcaması ile ilişkisini göz ardı etmemek için yaptığımız lokomotor aktivite deneylerinde, MCH aktivasyonunun veya inhibisyonunun enerji harcaması üzerinde etkisi olmadığını saptadık. Ancak, nöronal MCH manipülasyonunun anksiyete seviyesi üzerinde rolü olduğunu; MCH nöronlarının baskılanmasının anksiyolitik etki yaptığını, öte yandan MCH nöronlarının uyarımının ise anksiyete seviyesini arttırdığını saptadık. Elde ettiğimiz ilk sonuç, mevcut literatürün aksine, MCH nöronlarının akut iştah regülasyonu için gerekli olmadığı, iştahı tetiklemek veya var olan iştahı sürdürmede yetersiz kaldığı, bunun yanı sıra MCH nöronlarının inhibisyonunun anksiyolitik etki yaptığı yönündedir.

Lateral Hipotalamik Alan bölgesinin, merkezi sinir sisteminde bulunan kritik ödül mekanizmaları ile iletişim halinde olduğu bilinmektedir. Ancak, şimdiye kadar yapılan çalışmalar bu bölgenin tamamını elektriksel olarak uyarma veya lezyon yapmaya odaklanmış, dolayısıyla nöron alt gruplarının ödül algısına katkısını incelememiştir. MCH nöronlarının ödül algısı ve metabolizması üzerindeki etkisi tam olarak anlaşılmamıştır. MCH nöron aktivasyonunun striatumdaki dopamin seviyesini arttırdığı bilindiğinden, bu nöronların aktivasyonunun, besinlerin ödül değerine olan katkısını araştırmayı amaçladık. MCH nöron uyarımının ödül algısına olan etkisi, besin tüketimini foto-uyarım ile eşleştirerek test edildi. MCH nöron aktivasyonu akut iştahı arttırmadığı halde, foto-uyarım ile eşleştirilen besin tüketiminde önemli artış tespit edildi.

MCH nöronlarının akut iştahı arttırmadığı yaptığımız deneylerle gösterildiğinden, oluşan bu farkın MCH nöronlarının besine kattığı ödül değerinden kaynaklandığı

görüşü ortaya çıktı. Bu aşamada, besinin bu ödül algısına etkisini araştırmak üzere, bu denklemden besin ögesini çıkardık. Post-oral ipuçlarından bağımsız olarak, farelerin kendi kendini uyarabileceği düzenek kurduk. Farenin burnunu girintiyi sokarak veya basamak yardımıyla MCH nöronlarını kendi uyardığı bu deney düzenğinde, uyarım bulunan tarafta bulunmaya tarafa göre daha fazla etkinlik tespit ettik. Bu durum bize, MCH nöronunun uyarılmasının yalnız başına bile bir ödül algısı yarattığını, bu ödül algısının besin veya benzer cazip bir post-oral parametre ile ilintili olmadığını göstermiştir. Dolayısıyla, MCH nöronlarının uyarımı başlı başına bir ödül değerine sahiptir.

MCH nöronlarının sahip olduğu ödül algısının, merkezi sinir sisteminde hangi sinirsel ağlar tarafından kontrol edildiği veya hangi projeksiyonlar doğrultusunda işlevsellik kazandığı bilinmemektedir. MCH nöronlarının birçok önemli ödül merkezine projeksiyon yaptığı bilinse de, bu çalışmada gösterdiğimiz sonucun hangi ağlar tarafından regüle edildiğinin araştırılması gerekmektedir.

9. KAYNAKLAR

1. Jennings JH, Ung RL, Resendez SL, Stamatakis AM, Taylor JG, Huang J ve ark. Visualizing hypothalamic network dynamics for appetitive and consummatory behaviors. *Cell*. 2015;160(3):516-27.
2. Stuber GD, Wise RA. Lateral hypothalamic circuits for feeding and reward. *Nat Neurosci*. 2016;19(2):198-205.
3. Myers MG, Jr., Olson DP. Central nervous system control of metabolism. *Nature*. 2012;491(7424):357-63.
4. Timper K, Brüning JC. Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity. *Dis Model Mech*. 2017;10(6):679-89.
5. Rossi MA, Basiri ML, McHenry JA, Kosyk O, Otis JM, van den Munkhof HE ve ark. Obesity remodels activity and transcriptional state of a lateral hypothalamic brake on feeding. *Science*. 2019;364(6447):1271-4.
6. O'Connor EC, Kremer Y, Lefort S, Harada M, Pascoli V, Rohner C ve ark. Accumbal D1R Neurons Projecting to Lateral Hypothalamus Authorize Feeding. *Neuron*. 2015;88(3):553-64.
7. Qualls-Creekmore E, Münzberg H. Modulation of Feeding and Associated Behaviors by Lateral Hypothalamic Circuits. *Endocrinology*. 2018;159(11):3631-42.
8. Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, Piper M, Pelleymounter MA, Cullen MJ ve ark. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature*. 1996;380(6571):243-7.
9. Ludwig DS, Tritos NA, Mastaitis JW, Kulkarni R, Kokkotou E, Elmquist J ve ark. Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2001;107(3):379-86.
10. Gehlert DR, Rasmussen K, Shaw J, Li X, Ardayfio P, Craft L ve ark. Preclinical evaluation of melanin-concentrating hormone receptor 1 antagonism for the treatment of obesity and depression. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;329(2):429-38.
11. Gomori A, Ishihara A, Ito M, Mashiko S, Matsushita H, Yumoto M ve ark. Chronic intracerebroventricular infusion of MCH causes obesity in mice. Melanin-concentrating hormone. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;284(3):E583-8.

12. Marsh DJ, Weingarth DT, Novi DE, Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS ve ark. Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(5):3240-5.
13. Chen Y, Hu C, Hsu CK, Zhang Q, Bi C, Asnicar M ve ark. Targeted disruption of the melanin-concentrating hormone receptor-1 results in hyperphagia and resistance to diet-induced obesity. *Endocrinology*. 2002;143(7):2469-77.
14. Shimada M, Tritos NA, Lowell BB, Flier JS, Maratos-Flier E. Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature*. 1998;396(6712):670-4.
15. Alon T, Friedman JM. Late-onset leanness in mice with targeted ablation of melanin concentrating hormone neurons. *J Neurosci*. 2006;26(2):389-97.
16. Whiddon BB, Palmiter RD. Ablation of neurons expressing melanin-concentrating hormone (MCH) in adult mice improves glucose tolerance independent of MCH signaling. *J Neurosci*. 2013;33(5):2009-16.
17. Schneeberger M, Tan K, Nectow AR, Parolari L, Caglar C, Azevedo E ve ark. Functional analysis reveals differential effects of glutamate and MCH neuropeptide in MCH neurons. *Mol Metab*. 2018;13:83-9.
18. Sclafani A, Adamantidis A, Ackroff K. MCH receptor deletion does not impair glucose-conditioned flavor preferences in mice. *Physiol Behav*. 2016;163:239-44.
19. Sherwood A, Wosiski-Kuhn M, Nguyen T, Holland PC, Lakaye B, Adamantidis A ve ark. The role of melanin-concentrating hormone in conditioned reward learning. *Eur J Neurosci*. 2012;36(8):3126-33.
20. Sherwood A, Holland PC, Adamantidis A, Johnson AW. Deletion of Melanin Concentrating Hormone Receptor-1 disrupts overeating in the presence of food cues. *Physiol Behav*. 2015;152(Pt B):402-7.
21. Domingos AI, Sordillo A, Dietrich MO, Liu ZW, Tellez LA, Vaynshteyn J ve ark. Hypothalamic melanin concentrating hormone neurons communicate the nutrient value of sugar. *Elife*. 2013;2:e01462.

22. Burdakov D, Gerasimenko O, Verkhatsky A. Physiological changes in glucose differentially modulate the excitability of hypothalamic melanin-concentrating hormone and orexin neurons in situ. *J Neurosci*. 2005;25(9):2429-33.
23. Hausen AC, Ruud J, Jiang H, Hess S, Varbanov H, Kloppenburg P ve ark. Insulin-Dependent Activation of MCH Neurons Impairs Locomotor Activity and Insulin Sensitivity in Obesity. *Cell Rep*. 2016;17(10):2512-21.
24. Kong D, Vong L, Parton LE, Ye C, Tong Q, Hu X ve ark. Glucose stimulation of hypothalamic MCH neurons involves K(ATP) channels, is modulated by UCP2, and regulates peripheral glucose homeostasis. *Cell Metab*. 2010;12(5):545-52.
25. Noble EE, Hahn JD, Konanur VR, Hsu TM, Page SJ, Cortella AM ve ark. Control of Feeding Behavior by Cerebral Ventricular Volume Transmission of Melanin-Concentrating Hormone. *Cell Metab*. 2018;28(1):55-68.e7.
26. Berthoud HR. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci Biobehav Rev*. 2002;26(4):393-428.
27. Xu Y, Nedungadi TP, Zhu L, Sobhani N, Irani BG, Davis KE ve ark. Distinct hypothalamic neurons mediate estrogenic effects on energy homeostasis and reproduction. *Cell Metab*. 2011;14(4):453-65.
28. Nestor CC, Qiu J, Padilla SL, Zhang C, Bosch MA, Fan W ve ark. Optogenetic Stimulation of Arcuate Nucleus Kiss1 Neurons Reveals a Steroid-Dependent Glutamatergic Input to POMC and AgRP Neurons in Male Mice. *Mol Endocrinol*. 2016;30(6):630-44.
29. Yu S, Qualls-Creekmore E, Rezai-Zadeh K, Jiang Y, Berthoud H-R, Morrison CD ve ark. Glutamatergic Preoptic Area Neurons That Express Leptin Receptors Drive Temperature-Dependent Body Weight Homeostasis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2016;36(18):5034-46.
30. Hashikawa K, Hashikawa Y, Tremblay R, Zhang J, Feng JE, Sabol A ve ark. *Esr1(+)* cells in the ventromedial hypothalamus control female aggression. *Nat Neurosci*. 2017;20(11):1580-90.
31. Rodríguez EM, Blázquez JL, Guerra M. The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private

milieus: the former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. *Peptides*. 2010;31(4):757-76.

32. Milam KM, Stern JS, Storlien LH, Keeseey RE. Effect of lateral hypothalamic lesions on regulation of body weight and adiposity in rats. *Am J Physiol*. 1980;239(3):R337-43.

33. Leibowitz SF, Hammer NJ, Chang K. Hypothalamic paraventricular nucleus lesions produce overeating and obesity in the rat. *Physiol Behav*. 1981;27(6):1031-40.

34. Shimizu N, Oomura Y, Plata-Salamán CR, Morimoto M. Hyperphagia and obesity in rats with bilateral ibotenic acid-induced lesions of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Brain Res*. 1987;416(1):153-6.

35. Bellinger LL, Bernardis LL. The dorsomedial hypothalamic nucleus and its role in ingestive behavior and body weight regulation: lessons learned from lesioning studies. *Physiol Behav*. 2002;76(3):431-42.

36. Atasoy D, Betley JN, Su HH, Sternson SM. Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature*. 2012;488(7410):172-7.

37. Aponte Y, Atasoy D, Sternson SM. AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nat Neurosci*. 2011;14(3):351-5.

38. Krashes MJ, Koda S, Ye C, Rogan SC, Adams AC, Cusher DS ve ark. Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(4):1424-8.

39. Könnner AC, Janoschek R, Plum L, Jordan SD, Rother E, Ma X ve ark. Insulin action in AgRP-expressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production. *Cell Metab*. 2007;5(6):438-49.

40. Gantz I, Konda Y, Tashiro T, Shimoto Y, Miwa H, Munzert G ve ark. Molecular cloning of a novel melanocortin receptor. *J Biol Chem*. 1993;268(11):8246-50.

41. Liu H, Kishi T, Roseberry AG, Cai X, Lee CE, Montez JM ve ark. Transgenic mice expressing green fluorescent protein under the control of the melanocortin-4 receptor promoter. *J Neurosci*. 2003;23(18):7143-54.

42. Tao YX. The melanocortin-4 receptor: physiology, pharmacology, and pathophysiology. *Endocr Rev.* 2010;31(4):506-43.
43. Krashes MJ, Lowell BB, Garfield AS. Melanocortin-4 receptor-regulated energy homeostasis. *Nat Neurosci.* 2016;19(2):206-19.
44. Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR ve ark. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell.* 1997;88(1):131-41.
45. Balthasar N, Dalgaard LT, Lee CE, Yu J, Funahashi H, Williams T ve ark. Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell.* 2005;123(3):493-505.
46. Xu B, Goulding EH, Zang K, Cepoi D, Cone RD, Jones KR ve ark. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat Neurosci.* 2003;6(7):736-42.
47. Nicholson JR, Peter JC, Lecourt AC, Barde YA, Hofbauer KG. Melanocortin-4 receptor activation stimulates hypothalamic brain-derived neurotrophic factor release to regulate food intake, body temperature and cardiovascular function. *J Neuroendocrinol.* 2007;19(12):974-82.
48. Lu XY, Barsh GS, Akil H, Watson SJ. Interaction between alpha-melanocyte-stimulating hormone and corticotropin-releasing hormone in the regulation of feeding and hypothalamo-pituitary-adrenal responses. *J Neurosci.* 2003;23(21):7863-72.
49. Fekete C, Légrádi G, Mihály E, Huang QH, Tatro JB, Rand WM ve ark. alpha-Melanocyte-stimulating hormone is contained in nerve terminals innervating thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone gene expression. *J Neurosci.* 2000;20(4):1550-8.
50. Kim MS, Small CJ, Stanley SA, Morgan DG, Seal LJ, Kong WM ve ark. The central melanocortin system affects the hypothalamo-pituitary thyroid axis and may mediate the effect of leptin. *J Clin Invest.* 2000;105(7):1005-11.
51. Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hruby VJ, Cone RD. Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature.* 1997;385(6612):165-8.

52. Ste Marie L, Miura GI, Marsh DJ, Yagaloff K, Palmiter RD. A metabolic defect promotes obesity in mice lacking melanocortin-4 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(22):12339-44.
53. Voss-Andreae A, Murphy JG, Ellacott KL, Stuart RC, Nillni EA, Cone RD ve ark. Role of the central melanocortin circuitry in adaptive thermogenesis of brown adipose tissue. *Endocrinology*. 2007;148(4):1550-60.
54. Roh E, Song DK, Kim MS. Emerging role of the brain in the homeostatic regulation of energy and glucose metabolism. *Exp Mol Med*. 2016;48(3):e216.
55. Betley JN, Cao ZF, Ritola KD, Sternson SM. Parallel, redundant circuit organization for homeostatic control of feeding behavior. *Cell*. 2013;155(6):1337-50.
56. Yokosuka M, Kalra PS, Kalra SP. Inhibition of neuropeptide Y (NPY)-induced feeding and c-Fos response in magnocellular paraventricular nucleus by a NPY receptor antagonist: a site of NPY action. *Endocrinology*. 1999;140(10):4494-500.
57. Parker EM, Balasubramaniam A, Guzzi M, Mullins DE, Salisbury BG, Sheriff S ve ark. [D-Trp(34)] neuropeptide Y is a potent and selective neuropeptide Y Y(5) receptor agonist with dramatic effects on food intake. *Peptides*. 2000;21(3):393-9.
58. Cabrele C, Langer M, Bader R, Wieland HA, Doods HN, Zerbe O ve ark. The first selective agonist for the neuropeptide YY5 receptor increases food intake in rats. *J Biol Chem*. 2000;275(46):36043-8.
59. McCrea K, Wisialowski T, Cabrele C, Church B, Beck-Sickinger A, Kraegen E ve ark. 2-36[K4,RYYSA(19-23)]PP a novel Y5-receptor preferring ligand with strong stimulatory effect on food intake. *Regul Pept*. 2000;87(1-3):47-58.
60. Stanley BG, Leibowitz SF. Neuropeptide Y: stimulation of feeding and drinking by injection into the paraventricular nucleus. *Life Sci*. 1984;35(26):2635-42.
61. Clark JT, Kalra PS, Crowley WR, Kalra SP. Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology*. 1984;115(1):427-9.

62. Shi YC, Lau J, Lin Z, Zhang H, Zhai L, Sperk G ve ark. Arcuate NPY controls sympathetic output and BAT function via a relay of tyrosine hydroxylase neurons in the PVN. *Cell Metab.* 2013;17(2):236-48.
63. Kannan H, Hayashida Y, Yamashita H. Increase in sympathetic outflow by paraventricular nucleus stimulation in awake rats. *Am J Physiol.* 1989;256(6 Pt 2):R1325-30.
64. Roh E, Kim MS. Brain Regulation of Energy Metabolism. *Endocrinol Metab (Seoul).* 2016;31(4):519-24.
65. Waterson MJ, Horvath TL. Neuronal Regulation of Energy Homeostasis: Beyond the Hypothalamus and Feeding. *Cell Metab.* 2015;22(6):962-70.
66. Elias CF, Aschkenasi C, Lee C, Kelly J, Ahima RS, Bjorbaek C ve ark. Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron.* 1999;23(4):775-86.
67. Elmquist JK, Elias CF, Saper CB. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron.* 1999;22(2):221-32.
68. Berthoud HR, Münzberg H. The lateral hypothalamus as integrator of metabolic and environmental needs: from electrical self-stimulation to opto-genetics. *Physiol Behav.* 2011;104(1):29-39.
69. Anand BK, Brobeck JR. Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *Yale J Biol Med.* 1951;24(2):123-40.
70. Stricker EM, Swerdloff AF, Zigmond MJ. Intrahypothalamic injections of kainic acid produce feeding and drinking deficits in rats. *Brain Res.* 1978;158(2):470-3.
71. Delgado JM, Anand BK. Increase of food intake induced by electrical stimulation of the lateral hypothalamus. *Am J Physiol.* 1953;172(1):162-8.
72. Olds J, Milner P. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol.* 1954;47(6):419-27.
73. Hoebel BG, Teitelbaum P. Hypothalamic control of feeding and self-stimulation. *Science.* 1962;135(3501):375-7.
74. Margules DL, Olds J. Identical "feeding" and "rewarding" systems in the lateral hypothalamus of rats. *Science.* 1962;135(3501):374-5.

75. Grossman SP, Dacey D, Halaris AE, Collier T, Routtenberg A. Aphagia and adipsia after preferential destruction of nerve cell bodies in hypothalamus. *Science*. 1978;202(4367):537-9.
76. Grossman SP, Grossman L. Iontophoretic injections of kainic acid into the rat lateral hypothalamus: effects on ingestive behavior. *Physiol Behav*. 1982;29(3):553-9.
77. Jennings JH, Rizzi G, Stamatakis AM, Ung RL, Stuber GD. The inhibitory circuit architecture of the lateral hypothalamus orchestrates feeding. *Science*. 2013;341(6153):1517-21.
78. Sharf R, Sarhan M, Brayton CE, Guarnieri DJ, Taylor JR, DiLeone RJ. Orexin signaling via the orexin 1 receptor mediates operant responding for food reinforcement. *Biol Psychiatry*. 2010;67(8):753-60.
79. Stamatakis AM, Van Swieten M, Basiri ML, Blair GA, Katak P, Stuber GD. Lateral Hypothalamic Area Glutamatergic Neurons and Their Projections to the Lateral Habenula Regulate Feeding and Reward. *J Neurosci*. 2016;36(2):302-11.
80. Nieh EH, Vander Weele CM, Matthews GA, Presbrey KN, Wichmann R, Leppla CA ve ark. Inhibitory Input from the Lateral Hypothalamus to the Ventral Tegmental Area Disinhibits Dopamine Neurons and Promotes Behavioral Activation. *Neuron*. 2016;90(6):1286-98.
81. Leininger GM, Jo YH, Leshan RL, Louis GW, Yang H, Barrera JG ve ark. Leptin acts via leptin receptor-expressing lateral hypothalamic neurons to modulate the mesolimbic dopamine system and suppress feeding. *Cell Metab*. 2009;10(2):89-98.
82. Leininger GM, Opland DM, Jo YH, Faouzi M, Christensen L, Cappellucci LA ve ark. Leptin action via neurotensin neurons controls orexin, the mesolimbic dopamine system and energy balance. *Cell Metab*. 2011;14(3):313-23.
83. Qualls-Creekmore E, Yu S, Francois M, Hoang J, Huesing C, Bruce-Keller A ve ark. Galanin-Expressing GABA Neurons in the Lateral Hypothalamus Modulate Food Reward and Noncompulsive Locomotion. *J Neurosci*. 2017;37(25):6053-65.
84. Woodworth HL, Brown JA, Batchelor HM, Bugescu R, Leininger GM. Determination of neurotensin projections to the ventral tegmental area in mice. *Neuropeptides*. 2018;68:57-74.

85. Bittencourt JC, Presse F, Arias C, Peto C, Vaughan J, Nahon JL ve ark. The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol.* 1992;319(2):218-45.
86. Elias CF, Saper CB, Maratos-Flier E, Tritos NA, Lee C, Kelly J ve ark. Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol.* 1998;402(4):442-59.
87. Vaughan JM, Fischer WH, Hoeger C, Rivier J, Vale W. Characterization of melanin-concentrating hormone from rat hypothalamus. *Endocrinology.* 1989;125(3):1660-5.
88. Nahon JL, Presse F, Bittencourt JC, Sawchenko PE, Vale W. The rat melanin-concentrating hormone messenger ribonucleic acid encodes multiple putative neuropeptides coexpressed in the dorsolateral hypothalamus. *Endocrinology.* 1989;125(4):2056-65.
89. Gibson WT, Pissios P, Trombly DJ, Luan J, Keogh J, Wareham NJ ve ark. Melanin-concentrating hormone receptor mutations and human obesity: functional analysis. *Obes Res.* 2004;12(5):743-9.
90. González JA, Iordanidou P, Strom M, Adamantidis A, Burdakov D. Awake dynamics and brain-wide direct inputs of hypothalamic MCH and orexin networks. *Nat Commun.* 2016;7:11395.
91. Kosse C, Burdakov D. Fast and Slow Oscillations Recruit Molecularly-Distinct Subnetworks of Lateral Hypothalamic Neurons In Situ. *eNeuro.* 2018;5(1).
92. Torterolo P, Sampogna S, Chase MH. MCHergic projections to the nucleus pontis oralis participate in the control of active (REM) sleep. *Brain Res.* 2009;1268:76-87.
93. Kokkotou E, Moss AC, Torres D, Karagiannides I, Cheifetz A, Liu S ve ark. Melanin-concentrating hormone as a mediator of intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(30):10613-8.
94. Pissios P, Ozcan U, Kokkotou E, Okada T, Liew CW, Liu S ve ark. Melanin concentrating hormone is a novel regulator of islet function and growth. *Diabetes.* 2007;56(2):311-9.
95. Antal-Zimanyi I, Khawaja X. The role of melanin-concentrating hormone in energy homeostasis and mood disorders. *J Mol Neurosci.* 2009;39(1-2):86-98.

96. Johansson A. Recent progress in the discovery of melanin-concentrating hormone 1-receptor antagonists. *Expert Opin Ther Pat.* 2011;21(6):905-25.
97. Segal-Lieberman G, Bradley RL, Kokkotou E, Carlson M, Trombly DJ, Wang X ve ark. Melanin-concentrating hormone is a critical mediator of the leptin-deficient phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(17):10085-90.
98. Ludwig DS, Tritos NA, Mastaitis JW, Kulkarni R, Kokkotou E, Elmquist J ve ark. Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation.* 2001;107(3):379-86.
99. Atasoy D, Sternson SM. Chemogenetic Tools for Causal Cellular and Neuronal Biology. *Physiol Rev.* 2018;98(1):391-418.
100. Sternson SM, Roth BL. Chemogenetic tools to interrogate brain functions. *Annu Rev Neurosci.* 2014;37:387-407.
101. Manvich DF, Webster KA, Foster SL, Farrell MS, Ritchie JC, Porter JH ve ark. The DREADD agonist clozapine N-oxide (CNO) is reverse-metabolized to clozapine and produces clozapine-like interoceptive stimulus effects in rats and mice. *Sci Rep.* 2018;8(1):3840.
102. Deisseroth K. Optogenetics. *Nat Methods.* 2011;8(1):26-9.
103. Kim CK, Adhikari A, Deisseroth K. Integration of optogenetics with complementary methodologies in systems neuroscience. *Nat Rev Neurosci.* 2017;18(4):222-35.
104. Smith DG, Tzavara ET, Shaw J, Luecke S, Wade M, Davis R ve ark. Mesolimbic dopamine super-sensitivity in melanin-concentrating hormone-1 receptor-deficient mice. *J Neurosci.* 2005;25(4):914-22.
105. Shearman LP, Camacho RE, Sloan Stribling D, Zhou D, Bednarek MA, Hreniuk DL ve ark. Chronic MCH-1 receptor modulation alters appetite, body weight and adiposity in rats. *Eur J Pharmacol.* 2003;475(1-3):37-47.
106. Adamantidis A, Thomas E, Foidart A, Tyhon A, Coumans B, Minet A ve ark. Disrupting the melanin-concentrating hormone receptor 1 in mice leads to cognitive deficits and alterations of NMDA receptor function. *Eur J Neurosci.* 2005;21(10):2837-44.

107. Roy M, David NK, Danao JV, Baribault H, Tian H, Giorgetti M. Genetic inactivation of melanin-concentrating hormone receptor subtype 1 (MCHR1) in mice exerts anxiolytic-like behavioral effects. *Neuropsychopharmacology*. 2006;31(1):112-20.
108. Chee MJ, Pissios P, Maratos-Flier E. Neurochemical characterization of neurons expressing melanin-concentrating hormone receptor 1 in the mouse hypothalamus. *J Comp Neurol*. 2013;521(10):2208-34.
109. Karlsson C, Zook M, Ciccocioppo R, Gehlert DR, Thorsell A, Heilig M ve ark. Melanin-concentrating hormone receptor 1 (MCH1-R) antagonism: reduced appetite for calories and suppression of addictive-like behaviors. *Pharmacol Biochem Behav*. 2012;102(3):400-6.
110. Mul JD, la Fleur SE, Toonen PW, Afrasiab-Middelmann A, Binnekade R, Schetters D ve ark. Chronic loss of melanin-concentrating hormone affects motivational aspects of feeding in the rat. *PLoS One*. 2011;6(5):e19600.

10. ETİK KURUL ONAYI



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

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
05/10/2018	69		Doç. Dr. Deniz ATASOY

"Melanin konsantre eden hormon nöronlarının iştah ve ödül regülasyonundaki rolü" başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna "Oybirliği" ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 2 yıl

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