



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HEDONİK OBEZİTENİN SİNİR BİLİMSEL KÖKENLERİ

PELİN DİLSİZ

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. DENİZ ATASOY

İSTANBUL-2017



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HEDONİK OBEZİTENİN SİNİR BİLİMSEL KÖKENLERİ

PELİN DİLSİZ

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. DENİZ ATASOY

İSTANBUL-2017

TEŞEKKÜR

Bu tez alıŐması İstanbul Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Restoratif Araştırma Merkezi'nin bilimsel araŐtırmalara sağladığı olanak ve desteklerle yapılmıştır. Sağladığı standartların üstündeki imkanlar için REMER Müdürü ve Sinirbilim Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Gürkan Öztürk'e,

Yol göstericilikleri, sabırları tükenmeyen destekleri ve en önemlisi bana tanınmıŐ olan bu Őans için teŐekkürden daha fazlasını borçlu olduğum danıŐmanlarım Yrd. Doç. Dr. Deniz Atasoy ve Dr. Nilüfer Sayar Atasoy'a,

Bu çalıŐmayı sahipsiz bırakmayan, her adımında en az benim kadar emeği geçen ve maddi manevi çok Őey borçlu olduğum Fulya Köksalar ve Merve Öncül baŐta olmak üzere; ekibimizi rengarenk, bu yolu da aŐılabılır kılan İlknur oban, Muhammed İkbal Alp, Öykü Dinkol, Özge BaŐer, Özlem Mutlu ve Utku Soğukpınar'a,

ÇalıŐmam sırasında katlanarak artan destek ve yardımları için Hilmi Kaan Alkan, Bircan KolbaŐı, Burcu Kurt ve Esra Ekmekçioğlu baŐta olmak üzere tüm REMER ailesine,

KoŐulsuz desteklerinin ve inançlarının bitip tükenmeyeceğini bildiğim, en büyük dayanaklarımdan olan annem AyŐe Dilsiz, babam Yusuf Dilsiz ve kardeŐim İpek Dilsiz'e teŐekkürlerimi sunarım.

Pelin Dilsiz

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	Error! Bookmark not defined.
BEYAN.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	9
RESİMLER LİSTESİ.....	11
TABLolar LİSTESİ.....	12
1. ÖZET.....	13
2. ABSTRACT.....	14
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	15
4. GENEL BİLGİLER.....	17
4.1. Obezite.....	17
4.2. Nükleus Akkumbens.....	18
4.3. Lateral Hipotalamik Alan.....	20
4.4. Melanin Konsantre Eden Hormon Nöronları.....	22
4.5. Hücre Tipi Spesifik Transgen İfadesi ve Transgenik Fare Modeli.....	23
4.6. Kemogenetik Manipülasyon.....	24
5. METOT VE MATERYAL.....	27
5.1. Materyal.....	27
5.2. Metot.....	30
5.2.1. Deney hayvanları.....	30
5.2.2. Genotipleme.....	30
5.2.2.1. DNA eldesi.....	31
5.2.2.3. Agaroz jel elektroforezi ve görüntüleme.....	32
5.2.3. İntrakraniyal retrograd floresan boncuk enjeksiyonu.....	33
5.2.4. Doku fiksasyonu ve kesit alma.....	33
5.2.5. İmmünohistokimyasal antikor boyaması.....	34
5.2.6. Mikroskopik görüntüleme ve analiz.....	34
5.2.7. Elektrofizyoloji.....	35
5.2.8. Rekombinant adeno-asosiye virüs üretimi.....	35
5.2.8.1. Plazmit DNA çoğaltma.....	35
5.2.8.2. DNA izolasyonu.....	36
5.2.8.4. Pürifikasyon.....	36
5.2.9. İntrakraniyal rekombinant adeno-asosiye virüs enjeksiyonu.....	37
5.2.10. MCH Nöronlarının efferent sinyal haritası.....	38
5.2.11. Besin tüketimi ölçümü.....	38
5.2.11.1. MCH nöron aktivasyonu.....	38

5.2.11.2. MCH nöron inhibisyonu	39
5.2.12. Glikoz tolerans testi	40
5.2.13. İnsülin tolerans testi	40
5.2.14. MCH Nöronlarının Sinaptik İnhibisyonu	41
5.2.15. İstatistiksel analizler	41
6. BULGULAR	42
6.1. Deney Grupları ve Genotipleme	42
6.2. Nacc Afferent Yolaklarının Belirlenmesi	42
6.3. MCH Nöronlarının Efferent Yolaklarının Belirlenmesi	45
6.4. MCH Nöronlarının Aktivasyonu	46
6.4.1. Besin tüketimi ölçümü	46
6.4.2. Glikoz Tolerans Testi	48
6.4.3. İnsülin Tolerans Testi	49
6.5. MCH Nöronlarının İnhibisyonu	50
6.5.1. Besin tüketimi ölçümü	50
6.5.2. Glikoz tolerans testi	52
6.5.3. İnsülin tolerans testi	52
6.6. MCH Nöronlarının Sinaptik İnhibisyonu	53
7. TARTIŞMA	56
8. SONUÇ	61
9. KAYNAKLAR	62
10. ETİK KURUL ONAYI	65
11. ÖZGEÇMİŞ	66

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

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

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.2.1. Fare beyinde Nükleus Akkumbens bölgesinin koronal gösterimi (11)	19
Şekil 4.2.2. Nükleus Akkumbens bölgesinin bilinen bağlantıları (15)	20
Şekil 4.3.1 Fare beyinde Lateral Hipotalamik Alan bölgesinin koronal gösterimi (10, 11)	21
Şekil 4.3.2 LHA nöron alt grupları dağılımı (21)	22
Şekil 4.5.1. Cre-Lox Sistemi (27)	24
Şekil 4.5.2 Hücre tipi spesifik transgen ifadesi (27)	24
Şekil 4.6.1. DREADD metodu ile kemogenetik manipülasyon (27)	25
Şekil 6.2.1. Tokluk ve açlık durumunda LHA, amigdala ve medial habenula nöronlarından ölçülen elektriksel spontan aktivite	44
Şekil 6.4.1.1. MCH nöron aktivasyonu gündüz döngüsü besin tüketimi Plasebo ve CNO verilen günlerde FLEX-hM3D grubu besin tüketimi 4 saatlik besin tüketimi değişiminin FLEX-GFP Plasebo grubuna normalizasyonu	47
Şekil 6.4.1.2. MCH nöron aktivasyonu gece döngüsü besin tüketimi a) Plasebo ve CNO verilen günlerde FLEX-hM3D grubu besin tüketimi b) 4 saatlik besin tüketimi değişiminin FLEX-GFP Plasebo grubuna normalizasyonu	48
Şekil 6.4.2.1. MCH nöronlarının aktivasyonu durumunda glikoz tolerans testine bağlı kan şekeri değerleri	49
Şekil 6.4.3.1. MCH nöronlarının aktivasyonu durumunda insülin tolerans testine bağlı kan şekeri yüzdeleri	49
Şekil 6.5.1.1. MCH nöron inhibisyonu gündüz döngüsü besin tüketimi a) Plasebo ve CNO verilen günlerde FLEX-hM4D grubu besin tüketimi b) 4 saatlik besin tüketimi değişiminin FLEX-GFP Plasebo grubuna normalizasyonu	51
Şekil 6.5.1.2. MCH nöron inhibisyonu gece döngüsü besin tüketimi a) Plasebo ve CNO verilen günlerde FLEX-hM4D grubu besin tüketimi b) 4 saatlik besin tüketimi değişiminin FLEX-GFP Plasebo grubuna normalizasyonu	52
Şekil 6.5.2.1. MCH nöronlarının inhibisyonu durumunda glikoz tolerans testine bağlı kan şekeri değerleri	52
Şekil 6.5.3.1. MCH nöronlarının aktivasyonu durumunda insülin tolerans testine bağlı kan şekeri yüzdeleri	53

Şekil 6.6.1. MCH nöronlarının sinaptik bağlantılarının kalıcı olarak inhibe edildiği grupta ve kontrol grubunda a) besin tüketimi, b) vücut ağırlığı değişimi.....	54
Şekil 6.6.2. MCH nöronlarının sinaptik bağlantılarının kalıcı olarak inhibe edildiği grupta ve kontrol grubunda hedonik diyet sonrası (kesik çizgiler) a) besin tüketimi, b) vücut ağırlığı değişimi	54
Şekil 6.6.3. MCH nöronlarının sinaptik bağlantılarının kalıcı olarak inhibe edildiği grubun ve kontrol grubunun yağ kütesinin vücut kütesine oranı.....	55



RESİMLER LİSTESİ

Resim 4.2.1. Fare beyninde Nükleus Akkumbens bölgesinin sagittal gösterimi.....	19
Resim 4.3.1. Fare beyninde Lateral Hipotalamik Alan bölgesinin sagittal gösterimi	21
Resim 6.1.1. C57BL/6 ve Pmch-cre farelerinin genotipleme sonucu.....	42
Resim 6.2.1. Nacc bölgesine yapılan retrograd floresan boncuk enjeksiyonu.....	43
Resim 6.2.2. LHA nöronlarında floresan boncuk birikimi	43
Resim 6.2.3 Amigdala nöronlarında floresan boncuk birikimi.....	43
Resim 6.2.4. Medial Habenula nöronlarında floresan boncuk birikimi.....	43
Resim 6.2.5. Ventral Tegmental Alan nöronlarında floresan boncuk birikimi.....	44
Resim 6.2.6. Nacc retrograd floresan boncuk ve anti-MCH antikor boyaması	45
Resim 6.3.1. MCH nöronlarına yapılan rAAV-FLEX-GFP enjeksiyonu.....	45
Resim 6.3.2. MCH nöronlarının Nacc bölgesine projeksiyonu	46
Resim 6.4.1.1. Lateral hipotalamus bölgesine yapılan a) rAAV-hSyn-FLEX-hM3D(Gq)-mCherry b) rAAV-FLEX-GFP enjeksiyonu.....	47
Resim 6.5.1.1. Lateral hipotalamus bölgesine yapılan a) rAAV-hSyn-FLEX-hM4D(Gi)-mCherry b) rAAV-FLEX-GFP enjeksiyonu	50

TABLolar LİSTESİ

Tablo 4.1.1. Türkiye İstatistik Kurumu Obezite Verileri.....	17
Tablo 5.1.1. DeneYlerde Kullanılan Biyolojik Materyaller ve Kimyasallar	27
Tablo 5.1.2. DeneYlerde Kullanılan Gereçler	28
Tablo 5.2.2.2.1. Kontrol PCR karışımı	31
Tablo 5.2.2.2.2. Transgenik PCR karışımı.....	31
Tablo 5.2.2.2.3. Kullanılan Primer Dizileri	31
Tablo 5.2.2.2.4. PCR Protokolü	32
Tablo 5.2.9.1. İntrakraniyal enjekte edilen rAAV	37
Tablo 5.2.11.1.1. Aktivasyon için gündüz döngüsü intraperitoneal enjeksiyonları	38
Tablo 5.2.11.1.2. Aktivasyon için gece döngüsü intraperitoneal enjeksiyonları.....	39
Tablo 5.2.11.1.3. İnhibisyon için gündüz döngüsü intraperitoneal enjeksiyonları.....	39
Tablo 5.2.11.1.4. İnhibisyon için gece döngüsü intraperitoneal enjeksiyonları	39

1. ÖZET

HEDONİK OBEZİTENİN SINIR BİLİMSEL KÖKENLERİ

Dünyada 600 milyondan fazla insanda görülen obezite, beraberinde mortalite riski yüksek birçok hastalığı da tetikleyen global bir sağlık sorunudur. Mevcut tedavi yöntemlerinin yetersiz kalması, obezite tedavisinde yeni hedefler belirlenmesine duyulan ihtiyacı da arttırmaktadır. Beyinde çeşitli bölgelerin fizyolojik açlık - tokluk ile hedonik ve homeostatik beslenmeyi kontrol ettiği bilinmektedir. Ancak bu kontrolün hangi sinir ağları üzerinden gerçekleştiği açığa çıkarılamamıştır. Yapılan bu çalışmada, hedonik beslenmeyi kontrol ettiği bilinen nükleus akkumbens bölgesinin, beslenmeyi düzenleyen hipotalamus bölgesiyle olan ilişkisi incelenmiştir. Nükleus akkumbens bölgesinin, lateral hipotalamus bölgesinde bulunan melanin konsantre eden hormon nöronlarından yoğun afferent sinyaller aldığı bulunmuştur. Pmch-cre transgenik fare ile yapılan deneylerle, melanin konsantre eden hormon nöronlarının beslenme mekanizmasını ve buna bağlı fizyolojik durumları etkilediği anlaşılmıştır. Yaptığımız kemogenetik deneyler ile melanin konsantre eden hormon nöronlarının inhibisyon durumunda besin tüketimini baskıladığı ve kan şekeri seviyesini düzenlediği belirlenmiştir. Melanin konsantre eden hormon nöronlarının sinaptik aktivitelerinin kalıcı olarak engellenmesinin, anoreksik faza sebebiyet verdiği gözlenmiş ve hedonik beslenmenin bu durumu dengeleyebildiği tespit edilmiştir. Dolayısıyla, nükleus akkumbens bölgesinin hedonik beslenme kontrolünü, lateral hipotalamus bölgesinde bulunan melanin konsantre eden hormon nöronları üzerinden yaptığına dair önemli bulgular elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Hedonik obezite, kemogenetik, nükleus akkumbens, melanin konsantre eden hormon nöronları

2. ABSTRACT

NEUROSCIENTIFIC ORIGINS OF HEDONIC OBESITY

Affecting over 600 millions of people worldwide, obesity is a global health problem which triggers many high mortality risk diseases. As current therapeutic methods remain ineffective, urge to determine novel targets for obesity treatment increases significantly. Certain brain regions are known to control physiological fed and fasted states along with hedonic and homeostatic feeding. Yet, the neural circuits involved in this control remain unidentified. In this study, the connection between nucleus accumbens that is known to control hedonic feeding and lateral hypothalamus that regulates physiological feeding is investigated. We demonstrated that nucleus accumbens receives strong afferent signals from melanin concentrating hormone neurons found in lateral hypothalamus. In experiments conducted with *Pmch-cre* transgenic mice, we showed that melanin concentrating hormone neurons affect feeding mechanism and associated physiological states. Chemogenetic manipulations demonstrated that in case of inhibition, melanin concentrating hormone neurons suppress food intake and regulate blood glucose levels. Synaptic silencing of melanin concentrating hormone neurons results in anorexia, whereas hedonic diet compensates the regulation of the physiological state. These findings suggest that nucleus accumbens controls of hedonic feeding through melanin concentrating hormone neurons of lateral hypothalamus.

Key words: Chemogenetics, hedonic obesity, nucleus accumbens, melanin concentrating hormone neurons

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünyada milyonlarca kişiyi etkileyen ve hastaların yaşam kalitelerini düşüren obezite, kardiyovasküler rahatsızlıklar ve diyabet gibi mortalite riski yüksek hastalıklara da sebebiyet veren ve gittikçe daha da yaygınlaşan toplumsal bir sorundur. Obezitenin başlıca nedeni alınan ve harcanan kalori miktarlarındaki dengesizliklerdir. Alınan enerji miktarı vücudun metabolize edebileceği miktardan daha fazla olması durumunda bu sorun ortaya çıkmaya başlar. Her ne kadar sorunun kaynağı alınan enerjinin, harcanan enerjiden fazla olması durumu olsa da, sorunun çözümü alınan enerjiyi azaltmak veya harcanan enerjiyi arttırmak kadar kolay değildir. Modern toplumlarda enerji ve yağ bakımından yoğun diyetlerin tercih edilmesi ve yaşam tarzındaki değişim, obeziteyi daha da epidemik bir hale getirmiştir (1).

Beyinde Nükleus Akkumbens (Nacc) bölgesinin ödül mekanizmasını kontrol ettiği bilinmektedir. Alınan besinler, bu bölgede dopamin salınımını tetiklemektedir. Besinlerin hedonik değerlerinin artmasıyla, örneğin daha şekerli veya yağlı besin tüketilmesiyle bu bölgedeki dopamin miktarı da artmakta, dolayısıyla ödül mekanizması daha da aktifleşmektedir (2).

Beslenme, beyinde hipotalamus bölgesi tarafından yönetilmektedir. Hipotalamus bölgesinde bulunan çekirdekler ve alanlar beslenmeyi arttırmakta ve azaltmaktadır (3). Hipotalamusta bulunan Lateral Hipotalamik Alan (LHA) elektriksel olarak uyarıldığında beslenmeyi arttırdığı gözlenmiştir. LHA bölgesinin hipotalamusun önemli hiperfaji alanlarından olduğu belirlenmiştir (4). Bu bölgeye yapılan lezyonlar ise besin tüketiminin azalmasına ve anoreksiye, dolayısıyla ölümlere sebebiyet vermektedir (5). Yapılan bu deneyler bütün lateral hipotalamus bölgesini kapsamaktadır. Bu bölgede bulunan nöron alt gruplarının fonksiyonları henüz karakterize edilmemiştir.

Günümüzde obeziteyle mücadelede sıklıkla başvurulan ilaç tedavisi, diyet, egzersiz gibi mevcut tedavi yöntemlerinin yetersiz kalması, obezite ile mücadelede yeni

mekanizmaların tespit edilmesine ve metotların geliştirilmesine duyulan ihtiyacı da arttırmaktadır. Dolayısıyla, obeziteye neden olabilecek hedonik ve homeostatik beslenme ile açlık ve tokluk mekanizmalarının ve buna bağlı fizyolojik olayların beyinde nasıl kontrol edildiğinin tayin edilmesi, bu hastalıkla mücadelede önemli rol oynayacaktır. Nükleus akkumbens bölgesinin hedonik beslenmede rol oynadığı ve alınan besinlerin bu bölgede dopamin salınımını arttırdığının bilinmesine karşın, ilgili aşamalarda görevli olan sinir ağları henüz tam olarak belirlenmemiştir. Dolayısıyla hedonik beslenmeyi düzenleyen nükleus akkumbens bölgesinin, beslenmeyi kontrol eden hipotalamus bölgesiyle olası ilişkisinin ortaya çıkarılması, obeziteye sebebiyet verebilecek beyin ağlarının tanımlanmasında oldukça etkili olacaktır. Bu sebeple, yapılan bu çalışmada, öncelikle nükleus akkumbens bölgesinin beyinde hangi bölgelerle iletişim halinde olduğu incelenmiş ve bu hedef bölgeler arasından beslenmeyi kontrol ettiği düşünülen lateral hipotalamus bölgesindeki melanin konsantre eden hormon nöronlarının beslenmeye olan etkileri araştırılmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Obezite

Türkiye’de ve dünyada milyonlarca kişiyi etkileyen obezite, görülme sıklığı her geçen yıl artmakta olan toplumsal bir sağlık sorunudur. Dünya Sağlık Örgütü’nün verilerine göre 15 yaş üstü yetişkinlerin %35’i fazla kilolu kategorisindedir ve dünya nüfusunun %65’i obezite ölümlerinin zayıflık ölümlerinden daha fazla görüldüğü ülkelerde yaşamaktadır (6). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK), ülkemizde her iki kişiden birinin fazla kilolu olduğunu tespit etmiştir. Türkiye’de 2008 yılı verilerine göre obezite oranı %15,2 iken, bu oran 2014 yılında %31,1 artarak %19,9’a ulaşmıştır (Tablo 4.1.1) (7).

Tablo 4.1.1. Türkiye İstatistik Kurumu Obezite Verileri (7)

Yıl	Cinsiyet	Toplam	Düşük kilolu	Normal kilolu	Fazla kilolu	Obez
2008	Toplam	%100,0	%4,2	%48,2	%32,4	%15,2
	Erkek	%100,0	%2,7	%48,1	%36,9	%12,3
	Kadın	%100,0	%5,9	%48,2	%27,4	%18,5
2010	Toplam	%100,0	%4,7	%45,5	%33,0	%16,9
	Erkek	%100,0	%3,5	%46,1	%37,3	%13,2
	Kadın	%100,0	%5,9	%44,7	%28,4	%21,0
2012	Toplam	%100,0	%3,9	%44,2	%34,8	%17,2
	Erkek	%100,0	%2,7	%44,7	%39,0	%13,7
	Kadın	%100,0	%5,1	%43,6	%30,4	%20,9
2014	Toplam	%100,0	%4,2	%42,2	%33,7	%19,9
	Erkek	%100,0	%2,8	%43,7	%38,2	%15,3
	Kadın	%100,0	%5,5	%40,7	%29,3	%24,5

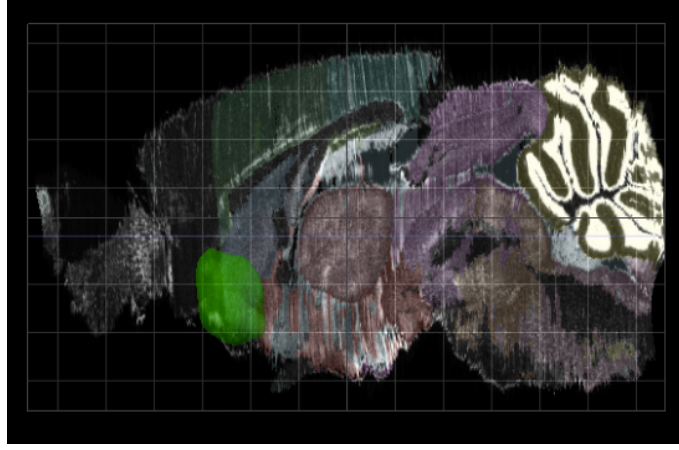
Obezite alınan enerji miktarının, başka bir deyişle tüketilen besinin, harcanan enerji miktarını aşmasından kaynaklanmaktadır. Globalleşen dünyada, insanların besin tüketimi ve yaşam tarzları, geçmişe göre büyük farklılıklar göstermektedir. Kolay erişilebilen hazır besinler ve günlük hayatta azalan fiziksel aktivite toplumların obezite oranlarını da arttırmaktadır (6).

Önlem alınmaması durumunda, 1980 verilerine göre görülme sıklığı ikiye katlanan obezitenin her geçen yıl daha da artacağı tahmin edilmektedir. Obezite, hastaların hayat kalitesini düşürmekle kalmayıp, kardiyovasküler rahatsızlıklar, hipertansiyon, kanser ve diyabet gibi mortalite riski ve ekonomik maliyeti yüksek hastalıklara da sebebiyet vermektedir. Mevcut tedavi yöntemleri ilaç, diyet ve egzersiz üzerinde yoğunlaşmakta ve etkisiz kalmaktadır. Bunun en kritik sebebi ise obezite patojenezinin tam olarak anlaşılmağı olmasıdır (1). Günümüzde obeziteyle mücadelede tam anlamıyla etkili ve güvenli farmakolojik seçeneklerin bulunmaması, bu sağlık sorunun önüne geçilmesini imkânsız kılmaktadır. Bunun yanı sıra, obezite tedavisinde sürdürülmekte olan araştırma ve geliştirme çabaları çoğunlukla başarısızlıkla sonlanmaktadır. Mevcut ilaçların önlenemez yan etkilerinin bulunması, obeziteyle mücadeleyi daha da zorlaştırmaktadır (8).

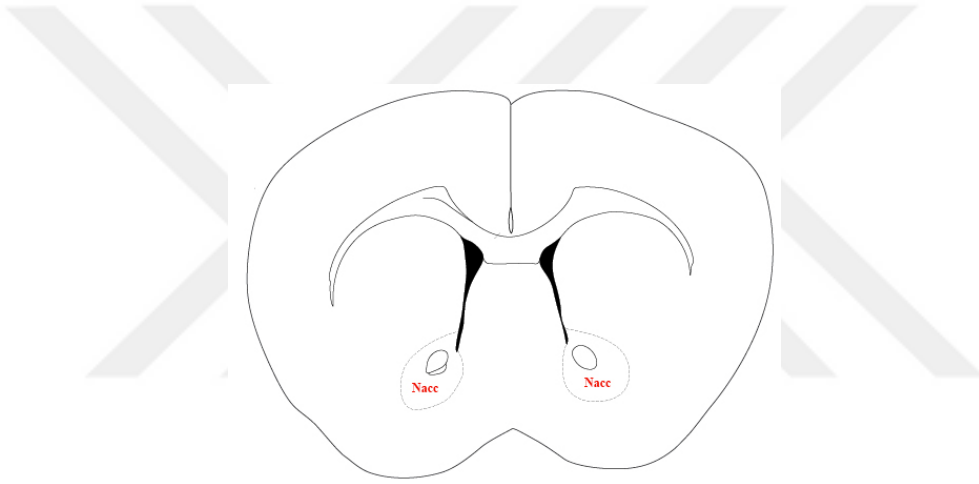
Obezite tedavisindeki imkânsızlıklar, çalışmaların farklı alanlara yönelmesine sebebiyet vermektedir. Yeni mekanizmaların tespit edilmesine ve metotların geliştirilmesine olan gereksinim artmaktadır. Beyinde bazı bölgelerin iştah kontrolünden sorumlu olduğu ve beslenme mekanizmalarını yönettiğı bilinmektedir. Obeziteye neden olabilecek açlık tokluk mekanizmalarının ve buna bağı fizyolojik olayların nasıl kontrol edildiğinin tayin edilmesi, bu hastalıkla mücadelede önemli rol oynayacaktır.

4.2. Nükleus Akkumbens

Nükleus Akkumbens bölgesi, beyinde Pars basalis telencefali bölgesinde bulunur. Basal forebrain olarak da adlandırılan bu bölgede üst sınırı oluşturur (Resim 4.2.1). Kabuk ve çekirdek olmak üzere 2 bölüme ayrılır (Şekil 4.2.2) (9).



Resim 4.2.1. Fare beyinde Nükleus Akkumbens bölgesinin sagittal gösterimi (yeşil) (10)

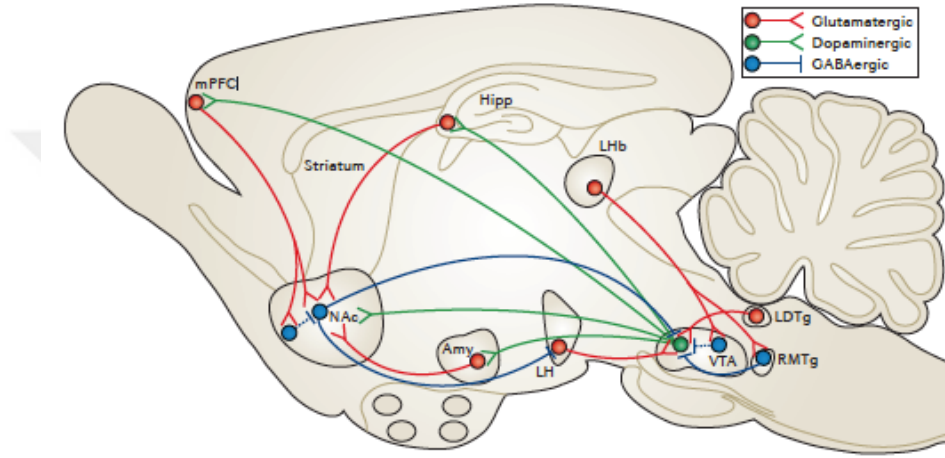


Şekil 4.2.1. Fare beyinde Nükleus Akkumbens bölgesinin koronal gösterimi (11)

Nükleus akkumbens bölgesi beyindeki ödül mekanizmasını deşifre edebilmek için oldukça sık çalışılmıştır. Bu alanda yapılan ilk çalışmalar, Nacc bölgesinin fonksiyonunu engellemek üzerine yoğunlaşmıştır. Nacc bölgesinde oluşturulan lezyon ve kimyasallarla yapılan inaktivasyon işlemleri, bu bölgedeki dopamin salınımını etkileyerek davranışlarda değişikliklere neden olmuştur (12, 13). Besinlerin yüksek hedonik ve motivasyonel değeri, Nacc bölgesinde nörotransmitter dopamin salınımına neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda, hedonik değeri yüksek besinlerin tüketimi ile Nacc bölgesinden salınan dopamin miktarının doğru orantılı olduğu gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, beklenmeyen anda sunulan yüksek hedonik değeri olan besin, daha fazla dopamin salınımına sebebiyet vermiştir (2). Aynı fikirden yola çıkarak yapılan çalışmalarda, besinlerin ödül değeri artırıldığında,

örneğin bir öncekinden daha şekerli besin sunulduğunda, farelerin Nacc bölgesinde bir önceki besinden daha yüksek dopamin salınımı gerçekleştiği gözlenmiştir (14).

Nükleus akkumbens bölgesindeki ödül mekanizmasının daha iyi anlaşılabilmesi için bu bölgenin beyinde hangi bölgelerle iletişim halinde olduğu bilinmelidir. Nacc bölgesinin iletişim halinde olduğu birçok bölge tayin edilmiştir (Şekil 4.2.2) (15).



Şekil 4.2.2. Nükleus Akkumbens bölgesinin bilinen bağlantıları (15)

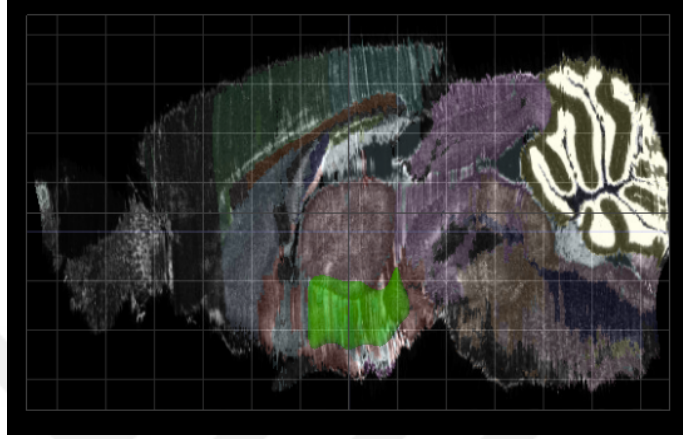
Nacc afferent ve efferentleri hakkında yapılan çalışmalar çoğunlukla beyinde Ventral Tegmental Alan adı verilen bir bölgeye yoğunlaşmıştır. Diğer bağlantılarla yapılan çalışmaların yetersiz kaldığı gözlenmiştir. Ayrıca hangi bağlantıların daha fazla çalışmaya değer olduğu, hangi bağlantıların nispeten zayıf kaldığı da henüz tam olarak anlaşılammıştır (15). Bu bağlantılar arasında en ilgi çekici olanlarından biri de iştah kontrolü üzerinde kritik rolü olduğu bilinen lateral hipotalamik alandır.

4.3. Lateral Hipotalamik Alan

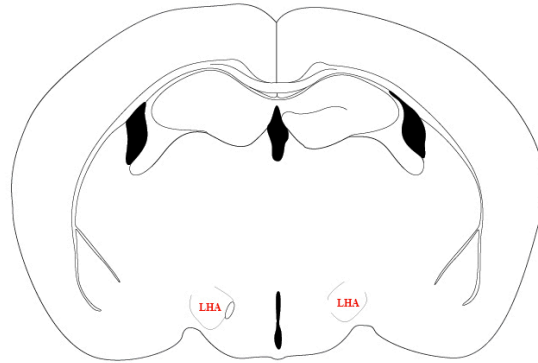
Hipotalamus, talamusun altında yer alır. Konum olarak 3. ventrikülün taban ve yan duvarlarına konuşlanmıştır. Birçok çekirdek ve alandan oluşur. Kritik fizyolojik fonksiyonlara sahip olması, bu bölgenin evrimsel açıdan korunmasını sağlamıştır. Başlıca görevleri arasında nöroendokrin, beslenme, susama, termoregülasyon ve sirkadyen ritim kontrolü bulunmaktadır (16). Hipotalamus beyinde iştah kontrolü

sağlayan ve beslenme mekanizmalarını düzenleyen en önemli bölgedir. Oreksinerjik ve anoreksinerjik bölgeler bir arada bulunur (3).

Hipotalamus birçok çekirdeğin yanı sıra, lateral hipotalamik alan (LHA) adı verilen oldukça geniş ve önemli bir bölgeyi de barındırır (Resim 4.3.1) (Şekil 4.3.1).



Resim 4.3.1. Fare beyninde Lateral Hipotalamik Alan bölgesinin sagittal gösterimi (yeşil) (10)

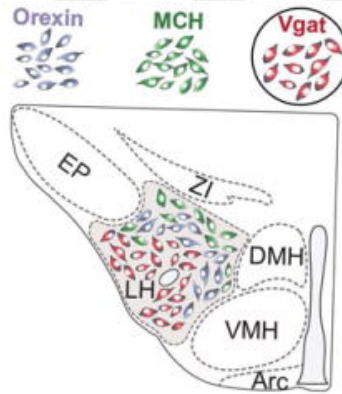


Şekil 4.3.1 Fare beyninde Lateral Hipotalamik Alan bölgesinin koronal gösterimi (11)

Lateral hipotalamus bölgesi beynin diğer bölgeleriyle yoğun iletişim halinde olduğundan sıkça çalışılmış bir bölgedir. LHA bölgesinin fonksiyonlarını tayin etmek amacıyla yapılan ilk çalışmalar, bölgenin aktivitesini arttırarak veya azaltarak karakterize etmeye yoğunlaşmıştır. Yapılan bir çalışmada, LHA bölgesinin elektrik uyarımının tok hayvanlarda durdurulamaz besin tüketimine sebep olduğu

gösterilmiştir (4). Ayrıca, elektrik uyarımının farelerin kontrolüne verilmesi durumunda, farelerin sürekli LHA bölgesini uyardıkları gözlenmiştir. Bu durum LHA bölgesinin besin tüketim miktarını yükselttiğinin yanı sıra, besin alımı için gereken motivasyonu da arttırdığını göstermiştir (17). Aksi deneylerde ise, lateral hipotalamus bölgesinin aktivitesi kimyasal veya elektriksel lezyonlarla susturulmuştur. LHA bölgesinin inaktivasyonu besin ve sıvı tüketimini engellemiş, fareleri anoreksik duruma sokmuştur (18).

Lateral hipotalamus bölgesinde Melanin Konsantre Eden Hormon (MCH) nöronları, Orexin nöronları ve Vgat nöronları adı verilen 3 farklı nöron alt grubu bulunmaktadır (Şekil 4.3.2). MCH ve orexin nöronları hakkında birçok çalışma bulunmaktadır. Ancak, Vgat nöronları yeni keşfedildiğinden henüz karakterizasyonu tamamlanamamıştır (19, 20).



Şekil 4.3.2 LHA nöron alt grupları dağılımı (21)

4.4. Melanin Konsantre Eden Hormon Nöronları

Melanin konsantre eden hormon (MCH) nöronları LHA bölgesinde bulunur. Bazı MCH nöronları glutamaterjik, bazıları ise gabaerjik belirteçler ifade eder. Hem inhibitör hem eksitator alt grupları bulunmaktadır (19).

Beslenme ve enerji harcanmasında rol oynayan yolların hipotalamik peptidler tarafından uyarıldığı veya inhibe edildiği bilinmektedir. Bu noktadan yola çıkarak yapılan bir çalışmada, MCH peptidinin intraserebroventriküler enjeksiyonlarının

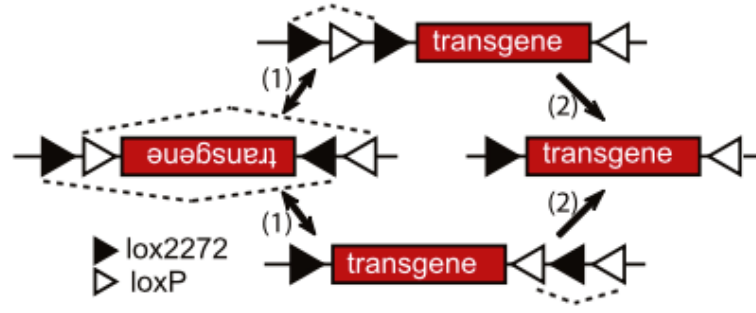
beslenmeyi ve vücut ağırlığını arttırdığı gösterilmiştir (22). MCH peptidinin aşırı ifade edildiği transgenik fareler, normal farelere göre %10 oranında daha fazla besin tüketmiş ve %12 oranında kilo artışı deneyimlemiştir. Bunun yanı sıra, glikoz enjeksiyonu sonrasında kan şekerlerinde önemli bir artış gözlenmiştir (23). MCH geninin silindiği transgenik farelerde ise durum tam tersidir. Bu farelerde besin tüketimi azalmış ve fareler hipofajik faza geçmiştir (24).

MCH nöronları, beynin lateral hipotalamus bölgesinde glikoz hassasiyetinden de sorumludur. Ekstrasellüler glikoz seviyesi arttığında MCH aktivitesinin de arttığı bilinmektedir. Bu durumda depolarizasyon tetiklenmekte ve membran rezistansını arttırmaktadır (25). MCH nöronlarının striatumda bulunan ödül merkezlerine ve orta beyinde bulunan dopaminerjik nöronlara bağlantısı olduğu düşünülmektedir. MCH nöronlarının optogenetik aktivasyonu, farelerin kalorik değeri yüksek şeker olan eğilimini arttırmıştır. MCH nöronları susturulmuş farelerde şeker tercihi kalmamıştır (26). MCH nöronları ve ödül merkezleri arasında bulunan bu güçlü anatomik bağlantı ve MCH nöronlarının glikoz seviyesine olan hassasiyeti, bu nöronların şeker ödül mekanizmasında çok önemli rol oynadığına işaret etmektedir.

4.5. Hücre Tipi Spesifik Transgen İfadesi ve Transgenik Fare Modeli

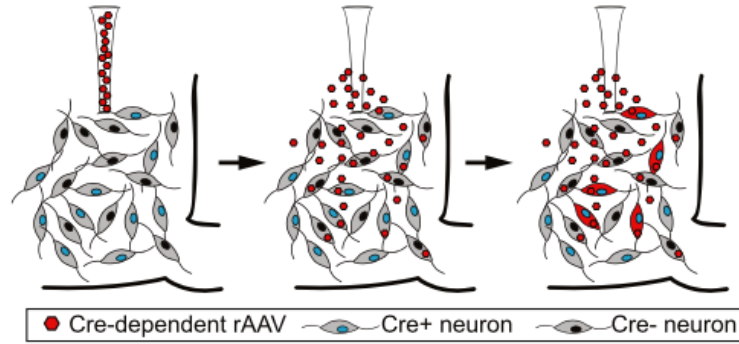
Nöron alt gruplarının fonksiyonlarını belirleyebilmek için hücre tipi spesifik manipülasyon gerekmektedir. Örneğin, sadece MCH nöronlarını işaretleyecek, diğer hücreleri geri planda bırakacak metotlara ihtiyaç duyulmaktadır. Aksi takdirde, birçok farklı nöron işaretlenecek ve o davranışın sebep olduğu nöronların hangileri olduğu belirlenemeyecektir. Bu durumun önüne geçebilmek için hücre tipi spesifik transgen ifadesi metodundan faydalanılmaktadır (27).

Cre (causes of recombination) enzimi bölge spesifik rekombinasyon sağlamaktadır. LoxP (locus of crossing) ise 34 baz çiftlik bir DNA tanıma bölgesidir. Cre rekombinaz enzimi LoxP bölgesini tanır. Eğer LoxP bölgeleri aynı DNA dizisi üzerinde ve zıt yönlerde ise, rekombinasyon sonucu ters çevirme gerçekleşir. İki LoxP dizisi arasındaki DNA ters çevrilir (Şekil 4.5.1) (27).



Şekil 4.5.1. Cre-Lox Sistemi (27)

Hücre tipi spesifik transgen ifadesi sağlayabilmek için ilgili hücrelerde cre enzimi ifade eden transgenik fareler üretilmektedir. Farelere enjekte edilen rekombinant adeno-asosiyasyon virüsü (rAAV) ise Lox dizisi içermektedir. Stereotaksik olarak rAAV enjeksiyonu yapılan cre ifade edilen transgenik farelerde hücre tipi spesifik ifade gerçekleşmektedir. Sadece cre enzimi bulunan hücreler rAAV ile verilen geni ifade edecek, diğerleri işaretlenmeyecektir (Şekil 4.5.2) (28).



Şekil 4.5.2 Hücre tipi spesifik transgen ifadesi (27)

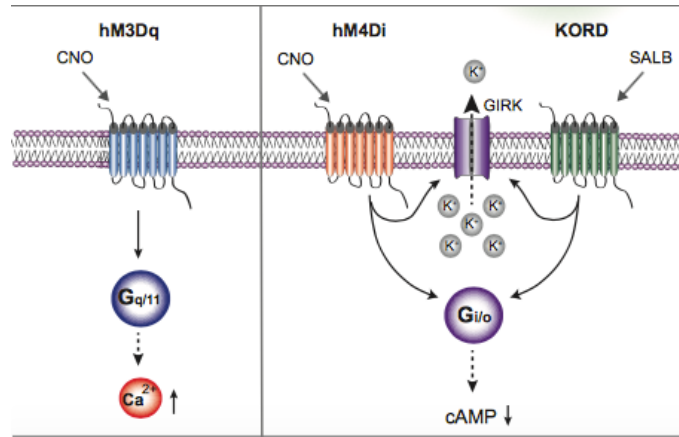
Bu çalışmada MCH nöronlarının fonksiyonunun belirlenebilmesi için bu nöronlarında cre enzim ifadesi bulunan Tg(Pmch-cre)¹Lowl/J fareler kullanılmıştır. LoxP dizileri ise rAAV ile intrakraniyal olarak enjekte edilmiştir.

4.6. Kemogenetik Manipülasyon

MCH nöronlarının fonksiyonlarını belirleyebilmek için günümüze kadar birçok çalışma yapılmıştır. Ancak mevcut çalışmalar nöronları çeşitli yollarla lezyon

yaratarak ve nöronları öldürerek görevlerini anlama veya aşırı ifade ettirerek sonuçları gözlemlemeye dayalıdır. Bu metotlar oldukça invazivdir. Lezyon yaparak veya nöronları öldürerek verilen hasar telafi edilememektedir. Farelerin ölümü ile sonuçlanmaktadır. Aşırı ifade yöntemleri de ciddi hasarlar vermektedir. Bu sebeple daha az invaziv metotlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Dizayn Edilmiş İlaçları Aktive Eden Dizayn Edilmiş Reseptörler (DREADD) kemogenetik manipülasyon sağlamakta ve bu soruna çözüm olmaktadır. Hücre tipi transgen ifadesi ile ilgili hücelere tasarlanmış G-protein bağlı reseptörler verilmektedir. Bu reseptörler o hücelerde ifade edilir ve uzaktan manipülasyon mümkün hale gelir. hM3Dq, aktivatör Gq protein bağlı reseptör, hM4Di ise inhibitör Gi protein bağlı reseptördür. hM3Dq reseptörü aktive edildiğinde hücrelerin ateşlemesini sağlarken, hM4Di reseptörü hücreleri susturmakla görevlidir. Bu reseptörler hücreye verildiğinde inaktiftir. Aktif duruma geçmeleri için Clozapine-N-Oxide (CNO) adı verilen bir liganda ihtiyaç duyarlar. Farelere intraperitoneal (i.p.) olarak CNO verilmesi durumunda hM3Dq veya hM4Di reseptörleri aktif faza geçer (Şekil 4.6.1). Bu manipülasyon kısa sürelidir. CNO'nun yıkımıyla reseptörler yine inaktif duruma dönerler. Dolayısıyla bu kemogenetik manipülasyonlar daha az invaziv, uzaktan kontrollü ve geri dönüşlüdür (27).



Şekil 4.6.1. DREADD metodu ile kemogenetik manipülasyon (27)

MCH n6ronlarının iştah kontrol6 ve hedonik beslenme 6zerindeki rol6n6 tayin edebilmek i7in, bu 7alışmada ilgili n6ronlar hM3Dq ile aktive, hM4Di ile inhibe edilmiştir.



5. METOT VE MATERYAL

5.1. Materyal

Tablo 5.1.1. DeneYlerde Kullanılan Biyolojik Materyaller ve Kimyasallar

Biyolojik Materyaller ve Kimyasallar	Marka	Ürün Kodu
anti-MCH primer antikoru	Phoenix Pharmaceuticals	H-070-47
Humulin® R İnsülin	Eli Lilly	A10AC01
Keçi anti-Tavşan Immunoglobulin G Alexa-Fluor 488 ikincil antikor	Life Technologies	A11008
Keçi Serumu	Sigma-Aldrich	G9023
LB Agar	Biomatik	A8523-500G
LB Broth	Biomatik	A8523-500G
OneShot Stbl-3 Kompetant <i>E.coli</i> hücre hattı	Life Technologies	C737303
Primerler	Sentegen	
AAV plazmitleri	Addgene	
293AAV hücre hattı	Cell BioLabs	AAV-100
Sodyum Pirüvat ($C_3H_3NaO_3$)	Sigma-Aldrich	P5280
Ethanol	Sigma-Aldrich	46139
Glasiyal Asetik Asit	Sigma-Aldrich	537020
Agaroz	Sigma-Aldrich	A9539
Glutamax-I	Gibco	35050-061
Paraformaldehit	Sigma-Aldrich	15127
Sodyum Klorür (NaCl)	Sigma-Aldrich	S7653
Potasyum Klorür (KCl)	Sigma-Aldrich	P9541
Sodyum Fosfat (NaH_2PO_4)	Sigma-Aldrich	S8282
Sodyum Bikarbonat ($NaHCO_3$)	Sigma-Aldrich	S6014
Magnezyum Klorür ($MgCl_2$)	Sigma-Aldrich	208337
Kalsiyum Klorür ($CaCl_2$)	Sigma-Aldrich	C1016
Fosfat Tamponlu Tuz (PBS)	Multicell	311-010-CL
Fenol Kırmızısı	Capricorn	600-070-IG
OptiPrep™ Density Gradient Medium	Sigma-Aldrich	D1556
Benzonase	Sigma-Aldrich	E8263
Trypsin (0,25%) in DPBS	Capricorn	CPTRY2B
DMEM High Glucose	Multicell	WS319005CL

Polyethylenimine Branched	Sigma-Aldrich	SG408727
EndoFree Plasmid maxi kit	Qiagen	12362
D-Sorbitol High Purity	Sigma-Aldrich	BMA2450
SafeView	Alfagen	G108
Gel Loading Dye Purple (6X)	NEB	B7024 S
Taq PCR Kit	NEB	E5000 S
Fluoromount Mountin Medium	Sigma-Aldrich	F4680
LMA Agaroz	Reducta	8060
Red Retrobeads™	Lumafluor	R180
Triton X-100	Sigma-Aldrich	X100
Trizma® HCl	Sigma-Aldrich	T3253
Clozapine N-Oxide	Enzo LifeSciences	BML-NS105
Sükroz	Sigma-Aldrich	0389
Dekstroz	Sigma-Aldrich	D9434
Sodyum Askorbat (C ₆ H ₇ NaO ₆)	Sigma-Aldrich	PHR1279
Opti-MEM Reduced Serum Medium	Life Technologies	51985-034
Ensure® TwoCal Strawberry	Abbott	S16630

Tablo 5.1.2. Deneyleerde Kullanılan Gereçler

Kullanılan Gereçler	Marka	Ürün Kodu
Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter	Millipore	UFC910024
OptiSeal Santrifüj Şişeleri	Thermo Scientific	7600302
MicroPunch	Harvard Apparatus	340140
Portatif Anestezi Cihazı	Beyza Medikal	
Micromotor	Istanbul Dis Deposu	
One-axis Oil Hydraulic Micromanipulator	Narishige	MO-10
Drummond Wiretrol™ II Kalibre Mikropipet	Minstar	
Peristaltik Pompa	Fisher Scientific	21-176-2A
0,2 mL PCR tüp	Isolab	123.01.002
ChemiDoc™ MP System	BioRAD	
Çalkalayıcı	Benchmark Scientific	BR2000
dH ₂ O Cihazı	Millipore	ZRQSV8W
Ear Tag	Harvard Apparatus	52-4717
Eppendorf® LoBind Microcentrifuge Tube	Sigma-Aldrich	Z666505

Manyetik Karıştırıcı	Benchmark Scientific	H400HSB
Multi-Therm Shaker	Benchmark Scientific	H5000-HC
pH metre	Isolab	pH7110
PowerPac™ Universal Power Supply	BioRAD	1645070
Santrifüj	Orto Alsera	Biocen 22R
Spectrometre cihaz	BioRAD	
T100™ Thermal Cycler	BioRAD	1861096
Tartı	Ohaus Explorer	EX124-US
Ultrasonikator	Bandelin Sonarex	
Vorteks	Benchmark Scientific	BV1000
Konfokal Mikroskop	Zeiss	LSM-780
Vibratom	Leica	VT1000S
Mikropipet Çekici	Sutter Instruments	P-1000
Ozmometre	Advance Instruments	3250
SliceScope Pro3000	Scientifica	Pro300
PatchStar Micromanipulator	Scientifica	
Motorised Moveable Top Plate	Scientifica	
PatchPad	Scientifica	
Programmable Perfusion System	Scientifica	
Monokrom Kamera	Watec Cameras	WAT-902H
Hava Kompresörü	Stanley	DN200/8/6
Axon Digidata Digitizer	Molecular Devices	Model 1550
Multiclamp Amplifier	Molecular Devices	Model 700B
Programmable Pulse Stimulator	A.M.P.I	Master 9
pE Excitation System Main Unit	CoolLED	244-1400
pE Excitation System Remote POD	CoolLED	244-1500
Digital Storage Osiloskop	Tektronix	TDS2001C
Stereo Mikroskop	Zeiss	Discovery V8

5.2. Metot

Genotipleri PCR tekniği ile teyit edilen Pmch-cre transgenik farelere intrakraniyal olarak retrograd floresan boncuk enjeksiyonu yapıldı. Akson uçları ile alınan boncuklar Nacc bölgesine sinaptik bağlantılar gönderen bölgelerdeki somalarda birikti. Bu sayede, Nacc bölgesinin afferent bağlantıları belirlendi. Belirlenen aday bölgelerin elektriksel spontan aktiviteleri kaydedildi ve LHA bölgesinin açlık ve tokluk durumuna en duyarlı bölge olduğu tespit edildi. LHA bölgesinden giden sinaptik bağlantıların hangi hücre alt grubundan olduğunu anlayabilmek için bu bölgeye antikor boyaması yapıldı. Pmch-cre transgenik farelere yapılan intrakraniyal rAAV enjeksiyonu ile Nacc bölgesinde akson gönderdiği belirlendi. Ardından, Pmch-cre farelere enjekte edilen virüsler ile bu nöronlar aktive ve inhibe edilerek besin tüketimi, glikoz toleransı ve insülin toleransındaki değişimler gözlemlendi. Farelerin besin tüketimi ve vücut ağırlığındaki değişimler sinaptik aktivitenin engellendiği durumda da incelendi.

5.2.1. Deney hayvanları

Jackson Laboratuvarı'ndan hemizigot olarak satın alınan Tg(Pmch-cre)¹Lowl/J veya kısa adıyla Pmch-cre erkek transgenik fare, dişi C57BL/6 yabanıl tip fareler veya dişi Pmch-cre fareler ile çaprazlanarak üretildi. Yavrular 21 ila 28 günlüğe ulaştıklarında, anestezi altında yavruların kulaklarından doku örnekleri alınarak genotipleri belirlendi. Genotipleme sonucuna göre dişi ve erkek transgenik fareler ayrıldı. Toplam 35 adet erkek Pmch-cre transgenik fare ile deney grupları oluşturuldu. Transgenik farelerin bakımı ve üretimi İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırma Merkezi tarafından (MEDİTAM) gerçekleştirilmiştir. Hayvan deneyleri, İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İMÜ-HADYEK) tarafından onaylanmıştır.

5.2.2. Genotipleme

Doğumdan itibaren anneleriyle beraber yaşayan yavru farelere, 21-28 günlüğe eriştiklerinde genotipleme yapıldı. Yapılan deneyler için yalnızca transgenik erkek fareler kullanıldı.

5.2.2.1. DNA eldesi

Yavru fareler doku alımı için kısa süreli anestezi altına alındı. Anestezi altında yavruların bir kulağına numaralı kulak küpesi takıldı. Diğer kulağından da kulak delme pensi ile doku örneği alındı. Alınan dokular 75 µL 25mM NaOH/EDTA içeren 0,2 mL PCR tüplerine koyuldu. Tüpler 1 saat 98°C sıcaklıkta T100™ Thermal Cycler PCR cihazında ısıtıldı. Ardından, tüplere 75 µL 40 mM Tris/HCl eklendi ve 3 dakika 4000 rpm hızında santrifüj edilip, DNA içeren süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı.

5.2.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Elde edilen DNA ile aşağıdaki malzemeler belirtilen oranlarda karıştırılıp PCR karışımı elde edildi. Her bir DNA örneği için ayrı ayrı kontrol ve transgenik PCR karışımı hazırlandı. Son tüp, negatif kontrol olması için DNA konulmadan bırakıldı. Tüm tüplerde son hacim, ddH₂O ile 12 µL'ye tamamlandı.

Tablo 5.2.2.2.1. Kontrol PCR karışımı

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

Tablo 5.2.2.2.2. Transgenik PCR karışımı

Gereç	Son Konsantrasyon
-------	-------------------

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

Tablo 5.2.2.2.3. Kullanılan Primer Dizileri

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

hazırlanan PCR karışımı aşağıdaki PCR protokolü ile birlikte T100™ Thermal Cycler cihazına koyuldu.

Tablo 5.2.2.2.4. 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

100 μ L 1X TAE tampon çözeltisine (40 mM Tris, 20mM Glasiyal asetik asit, 1Mm pH:7,6 EDTA) 3 g agaroz eklendi ve çözelti şeffaflaşana kadar 200°C'de kaynatıldı. Berrak çözeltiye 5 μ L Safeview eklendi ve yükleme tarakları takılarak elektroforez kasetine döküldü. Jel kıvamına geldikten sonra 1X TAE tampon çözeltisi ile dolu elektroforez tankına yerleştirildi. Birinci kuyuya 5 μ L belirteç yüklendi. Diğer

kuyulara ise 9 µL PCR ürünü, 1 µL yükleme boyası ile karıştırılıp yüklendi. 20 dakika 100V'da yürütüldü. Yeteri kadar yürüyen jel BioRAD ChemiDoc cihazında görüntülendi. 200 ve 306 baz çiftinin beraber görüldüğü örneklerin alındığı fareler transgenik olarak belirlendi.

5.2.3. İntrakraniyal retrograd floresan boncuk enjeksiyonu

30 günlük erkek fareler stabil anestezi altında stereotaksik çerçeveye sabitlendi. Kafanın düz ve sabit olduğundan emin olunmasıyla, kafa derisi Betadin ile temizlendi ve bisturi ile kesildi. Kafatasına uygulanan hidrojen peroksit ile kemikler belirgin hale getirildi. Kafatası hidrojen peroksitten arındırıldı ve SteREO Discovery V8 mikroskop altında kraniyal koordinatlar belirlendi. Narishige mikromanipulator yardımıyla Bregma noktasında tüm koordinat değerleri sıfırlandı ve Nükleus Akkumbens (Nacc) bölgesi için koordinat düzleminde Anterior/Posterior (A/P): 1,3 mm ve Medial/Lateral (M/L): 0,9 mm olacak şekilde ilerlendi. Kafatası bu noktada freze yardımıyla delindi. Sutter P-1000 Mikropipet çekici ile cam mikropipetler ısı yardımıyla inceltirilerek hazırlandı. İçine mineral yağ doldurulan cam mikropipetler Narishige enjektöre takıldı. 1:50 oranında fosfat tampon çözeltisi ile seyreltilmiş kırmızı LumaFluor retrograd floresan boncuk cam mikropipetlere dolduruldu. Belirtilen A/P ve M/L koordinatlarında beyin yüzeyi Dorsal/Ventral (D/V) olarak sıfır alındı ve D/V: -3,7 mm olacak şekilde beyin içinde ilerlendi. Narishige enjektör ile 80 nL enjeksiyon yapıldı. 10 dakika beklemenin ardından cam mikropipet beyinden çıkarıldı, kafa derisi dikildi ve fareler operasyon sonrası bakıma alındı. Boncukların retrograd olarak ilerleyebilmesi için fareler 7 gün operasyon sonrası bakımda bekletildi. Bir grup fare fikse edilip immünohistokimyasal boyama için, diğer bir grup fare ise canlı kesitlerle elektrofizyolojik kayıt alınmak üzere ayrıldı.

5.2.4. Doku fiksasyonu ve kesit alma

7 günün sonunda farelere, sırasıyla fosfat tamponlu tuz çözeltisi ve %4 paraformaldehit fiksatifi (PFA) ile kardiyak perfüzyon yapıldı. Sakrifiye edilen farelerin beyinleri çıkarıldı. Beyinler önce 4°C'de 4 saat %4'lük PFA içinde, sonra

4°C’de 24 saat %30’luk sükröz çözeltisi içinde bekletildi. 10 mL H₂O içine 0,4 g düşük donma sıcaklığına sahip agaroz katıldı ve çözelti berraklaşana kadar kaynatıldı. Beyinler fosfat tamponlu tuz çözeltisi ile yıkandıktan sonra bu çözelti içine gömüldü ve jel kıvamına gelene kadar beklendi. VT1000S vibratom ile 50 µm kalınlığında kesitler alındı.

5.2.5. Immünohistokimyasal antikor boyaması

Lateral hipotalamus bölgesini içeren beyin kesitleri 30 dakikalık fosfat tamponlu tuz çözeltisi yıkamasının ardından, 2 saat oda sıcaklığında 1x PBS’te 0,1% Triton-X-100 ve %15 keçi serumu içeren bloklama çözeltisinde bekletildi. Anti-melanin concentrating hormone antikoruna (H-070-047, Phoenix Pharmaceuticals) 1:500 oranında 1x PBS, %0,1 Triton-X-100 ve %5 keçi serumu içeren çözelti ile seyreltilti. Bu karışım beyin kesitlerine eklendi ve gece boyunca 4°C’de çalkalayıcıda bekletildi. Belirli beyin kesitleri negatif kontrol olması açısından antikor içermeyen karışım ile bekletildi. Kesitler 3 defa 20’şer dakika boyunca PBS ile yıkandı. Sekonder antikor boyaması için 1:1000 oranında Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor® 488 (A-11008, Thermo Scientific) sekonder antikoruna içeren 1x PBS, %0,1 Triton-X-100 ve %5 keçi serumu içeren çözelti ile seyreltilti. Kesitler 3 defa 20’şer dakika boyunca PBS ile yıkandı ve lamlara aktarıldı. Kesitlerin kurumasının ardından mounting medium eklendi ve lameller ile üstleri kapatıldı.

5.2.6. Mikroskopik görüntüleme ve analiz

Immünohistokimya boyamasının ardından floresan görüntüleme Zeiss LSM 780 Konfokal Mikroskop ile yapıldı. Kırmızı LumaFluor retrograd floresan boncukları görüntülemek için 610 nm, yeşil anti-MCH antikorunu görüntüleyebilmek için 488 nm dalga boyu kullanıldı. Konfokal mikroskop ile alınan görüntüler hücre sayımı yapmak için ImageJ programına aktarıldı.

5.2.7. Elektrofizyoloji

Elektrofizyolojik kayıt alınacak fareler, aç ve tok olmak üzere 2 gruba ayrıldı. Aç farelerin besine erişimi deneyin başlangıcından 24 saat önce kesildi. Tok fareler *ad libitum* beslendi. Fareler fikse edilmeden sakrifiye edildi. 234 g/mM sükröz, 28 g/mM NaHCO₃, 7 g/mM dekstroz, 7 g/mM MgCl₂, 0,5 g/mM CaCl₂, 1 g/mM sodyum askorbat, 3 g/mM sodyum pürivat ve 1,25 mM NaH₂PO₄ içeren, kesme solüsyonu önceden hazırlandı ve soğutuldu. Canlı beyin dokusundan, %95 O₂ ve %5 CO₂ ile havalandırılan kesme solüsyonu içinde vibratom ile 300 µm kalınlığında kesitler alındı. Ardından bu kesitler 119 g/mM NaCl, 25 g/mM NaHCO₃, 7 g/mM dekstroz, 2,5 g/mM KCl, 7 g/mM MgCl₂, 0,5 g/mM CaCl₂, 1 g/mM sodyum askorbat, 3 g/mM sodyum pürivat ve 1,25 mM NaH₂PO₄ içeren, %95 O₂ ve %5 CO₂ ile havalandırılan yapay beyin omurilik sıvısı (aCSF) içerisine konuldu. Hazırlanan cam pipete aCSF eklendi ve ilgili bölgelerdeki nöronlardan kayıt alınmaya başlandı. Elektrotların ucundaki rezistans 3-6 MΩ, potansiyel -60V olarak belirlendi.

5.2.8. Rekombinant adeno-asosiye virüs üretimi

Rekombinant adeno-asosiye virüs üretimi için gereken Plazmitler Addgene firmasından satın alındı. Kompetant Stb13 *E. Coli* transformasyonu ile gelen Plazmitler, bakteriyel sürüntü halinde temin edildi.

5.2.8.1. Plazmit DNA çoğaltma

35 g/L oranında H₂O ile karıştırılmış LB agar çözeltisi otoklavlanarak sterilize edildi. Soğuduktan sonra bu karışıma 100 µg/mL ampisilin eklenerek antibiyotik direnci sağlandı. LB agar, 2/3'ünü dolduracak şekilde 10 cm polistiren petri kaplarına döküldü ve donmaya bırakıldı. Plazmitler katılaştıran agara yaydırıldı ve petriler gece boyu 37°C'de bekletildi. Ertesi gün petrilerin üstünde bakteri kolonileri oluştuğu görüldü. Bu koloniler öze yardımıyla toplandı ve önceden hazırlanıp otoklav ile sterilize edilen 20 g/L LB sıvı besi yerine aktarıldı. Bakteriler sıvı besi yerinde 37°C, 250 rpm koşullarında logaritmik olarak çoğalmaya bırakıldı. Yaklaşık 18 saatin sonunda yeterli sayıya ulaşan bakteriler 4°C 6000 rpm'de 15 dakika boyunca

santrifüj edildi, süpernatant atıldı ve bakterileri içeren çökeltiler -80°C'de donduruldu. Bu işlemler ana vektör, yardımcı vektör 2/1 ve yardımcı vektör helper için tekrar edildi.

5.2.8.2. DNA izolasyonu

Ana vektör, yardımcı vektör 2/1 ve yardımcı vektör helper plazmitleri içeren çökeltiler çözdürüldü. DNA'lar Qiagen Endofree Plasmid Kit (Qiagen, 12362) ile izole edildi. Elde edilen DNA'ların konsantrasyonları SpektraMax cihazı ile tayin edildi. Bu işlemler ana vektör, yardımcı vektör 2/1 ve yardımcı vektör helper için tekrar edildi.

5.2.8.3. 293AAV Hücre transfeksiyonu

Rekombinant adeno-asosiyasyon virüsü üretimi için özelleşmiş 293AAV hücre hattı Cell BioLabs firmasından temin edildi (Cell BioLabs, AAV-100). 106 293AAV hücresi 10x10 cm petri kaplarına ekildi ve 37°C, %5 CO₂, %20 O₂ koşullarındaki inkübatörde büyütüldü. Hücreler %70-80 doluluk oranına ulaştığında pasajlanarak çoğaltıldı. Hücreler yeterli miktara ulaştığında transfeksiyon için hazırlandı. Steril bir tüp içinde 24 µg yardımcı vektör helper, 20 µg yardımcı vektör 2/1, 12 µg ana vektör, Opti-MEM transfeksiyon medyumunu ve polietilenimin transfeksiyon ajanı karıştırıldı. Bu karışım hücrelerin üzerine eklendi ve 72 saat boyunca 37°C, %5 CO₂, %20 O₂ koşullarındaki inkübatörde bekletildi. 72 saat sonunda hücreler toplandı ve 5 dakika boyunca 4°C 1100 rpm'de santrifüj edildi. Hücrelerin bulunduğu çökelti -80°C'de donduruldu.

5.2.8.4 Pürifikasyon

Hücre çökeltisi 9 mL steril liziz çözeltisi (150mM NaCl, 20mM Tris pH 8,0) ile karıştırıldı. Hücreler önce kuru buz - %70 EtOH karışımında, sonra 37°C su banyosunda 2'şer dakika bekletildi. Bu işlem 3 defa tekrarlandı. Bu işlemin ardından hücreler 3 dakika boyunca sonikatörde tutuldu. Böylece hücrelerin içinde bulunan

virüsler açığa çıkartıldı. Ardından pürifikasyon işlemi için 1mM MgCl₂ ve 250 U/mL Benzonase (Sigma E8263-25K) eklendi. 20 dakika boyunca 4°C 4000 rpm'de santrifüj edildi. 17%'lik çözelti (5 mL 10x PBS, 0,05 mL 1M MgCl₂, 0,125 mL 1M KCl, 10 mL 5M NaCl, 12,5 mL Iodixanol ve 50 mL'ye kadar H₂O), 25%'lik çözelti (5 mL 10x PBS, 0,05 mL 1M MgCl₂, 0,125 mL 1M KCl, 20 mL Iodixanol, 0,1 mL 0,5% fenol kırmızısı ve 50 mL'ye kadar H₂O), 40%'lik çözelti (5mL 10x PBS, 0,05 mL 1 M MgCl₂, 0,125 mL 1 M KCl, 10 mL 5 M NaCl, 33,3 mL Iodixanol ve 50 mL'ye kadar H₂O) ve 60%'lik çözelti (0,05 mL 1 M MgCl₂, 0,125ml 1 M KCl, 50 mL Iodixanol, 0,025 mL 0,5% fenol kırmızısı) hazırlandı. Sırasıyla 3 mL %60'lık çözelti, 5 mL %40'lık çözelti, 6 mL %25'lik çözelti, 6 mL %17'lik çözelti ve hücre lizati Optiseal ultrasantrifüj tüplerine (Beckman 361625) şırınga yardımıyla yavaşça damlatıldı. 18°C'de 90 dakika 60000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj işleminin sonunda virüsler %40'lik çözeltinin bulunduğu katmanda birikti. Şırınga yardımıyla bu katman toplandı. Önceden 1x saklama tampon çözeltisi (1 L: 100 mL 10x PBS, 50 g D-Sorbitol, 42,4 mL %5 NaCl) ile ıslatılan Amicon 100K filtreli kolonlara (Millipore, UFC910024) %40'lık çözelti içeren katman eklendi ve 1x saklama tampon çözeltisi ile 15 mL'ye tamamlandı. 30 dakika boyunca 4°C 3500 rpm'de santrifüj edildi. 1x saklama tampon çözeltisi eklenerek, bu işlem 2 defa daha yapıldı. Filtrenin üstünde kalan virüsler toplandı ve -80°C'de donduruldu.

5.2.9. İntrakraniyal rekombinant adeno-asosiyel virüs enjeksiyonu

İstanbul Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi'nde üretilen rekombinant adeno-asosiyel virüsler 30 günlük erkek Pmch-cre transgenik farelerin lateral hipotalamus bölgelerine, bölüm 5.2.3.'te belirtilen metotla intrakraniyal olarak enjekte edildi. Virüs enjeksiyonları A/P: 1,55 mm, M/L: 1,0 mm, D/V: 4,90 mm koordinatlarına, yaklaşık 500 nL hacminde yapıldı. Enjekte edilen virüslerin beynin lateral hipotalamus bölgesindeki MCH nöronlarını enfekte edebilmesi için fareler 14 gün süreyle operasyon sonrası bakımda bekletildi.

Tablo 5.2.9.1. İntrakraniyal enjekte edilen rAAV

Rekombinant adeno-asosiye virüsler

rAAV-FLEX-GFP

rAAV-hSyn-FLEX-hM3D(Gq)-mCherry

rAAV-hSyn-FLEX-hM4D(Gi)-mCherry

rAAV-FLEX-TetTox-GFP

5.2.10. MCH Nöronlarının efferent sinyal haritası

Lateral hipotalamus bölgesine unilaterale olarak rAAV-FLEX- GFP virüsü enjekte edildi ve virüsün enfekte olması için 14 gün beklendi. Fareler bölüm 5.2.4'te belirtildiği şekilde sakrifiye edildi, beyinleri çıkarıldı, fikse edildi ve tüm beyin 75 µm'lik kesitlere bölündü. Anteriordan posteriora doğru tüm beyin kesitleri konfokal mikroskobu ile görüntüledi. Bölgelere göre değişen akson yoğunlukları tayin edildi.

5.2.11. Besin tüketimi ölçümü

5.2.11.1. MCH nöron aktivasyonu

30 günlük erkek Pmch-cre transgenik farelere intrakraniyal olarak enjekte edilen rAAV-hSyn-FLEX-hM3D(Gq)-mCherry virüsü ile 14 gün süreyle lateral hipotalamus bölgesindeki MCH nöronları enfekte edildi. Kontrol grubuna ise rAAV-FLEX-GFP virüsü enjekte edildi. Operasyon sonrası bakım süresi sonunda fareler davranış deneyleri için tekli kafeslere alındı. Farelerin bu kafeslere alışması için 2 gün süre tanındı. Ardından, günlük besin tüketimi gözlenmeye başlandı. Besin tüketimi stabil hale geldiğinde *ad libitum* olarak davranış deneyleri başlatıldı. Sabah saat 07:00'de başlayan gündüz döngüsü ile 30 dakika aralıklarla 2 saat boyunca farelerin besin tüketimi kaydedildi. Ardından 300µL hacminde Tablo 5.2.11.1.1'de belirtilen intraperitoneal (i.p.) enjeksiyonlar gerçekleştirildi:

Tablo 5.2.11.1.1. Aktivasyon için gündüz döngüsü intraperitoneal enjeksiyonları

Gün	Saat	i.p. enjeksiyon
1	09:00	%0,9 NaCl + 5 mg/kg EtOH
3	09:00	%0,9 NaCl + 5 mg/kg CNO
5	09:00	%0,9 NaCl + 5 mg/kg CNO

Plasebo günü %0,9 NaCl + 5 mg/kg EtOH, deney günü ise CNO enjekte edildi. İntraperitoneal enjeksiyonlar sonrasında 30 dakika arayla 2 saat boyunca besin tüketimi gözlemlendi.

Aynı deneyler saat 19:00'da başlayan gece döngüsü için de tekrarlandı. Saat 17:00'de başlayan besin tüketimi monitorizasyonunun ardından saat 19:00'da Tablo 5.2.11.1.2'de belirtilen intraperitoneal enjeksiyonlar yapıldı ve besin tüketimi saat 21:00'e kadar izlendi.

Tablo 5.2.11.1.2. Aktivasyon için gece döngüsü intraperitoneal enjeksiyonları

Gün	Saat	i.p. enjeksiyon
1	19:00	%0,9 NaCl + 5 mg/kg EtOH
3	19:00	%0,9 NaCl + 5 mg/kg CNO
5	19:00	%0,9 NaCl + 5 mg/kg CNO

5.2.11.2. MCH nöron inhibisyonu

MCH nöronlarını inhibe edebilmek için deney grubuna bilateral olarak 500 nL rAAV-hSyn-FLEX-hM4D(Gi)-mCherry virüsü, kontrol grubuna ise rAAV-FLEX-GFP virüsü enjekte edildi. İnhibisyonun etkisini gözlemleyebilmek için fareler 16 saat boyunca açlığa maruz bırakıldı. Gündüz döngüsüne geçildiğinde farelere intraperitoneal enjeksiyon yapıldı. Plasebo günü %0,9 NaCl + 5 mg/kg EtOH, deney günü ise CNO enjekte edildi ve 30 dakika sonra besin sunuldu. 2 saat boyunca besin tüketimi gözlemlendi (Tablo 5.2.11.1.3).

Tablo 5.2.11.1.3. İnhibisyon için gündüz döngüsü intraperitoneal enjeksiyonları

Gün	Saat	i.p. enjeksiyon
1	07:00	%0,9 NaCl + 5 mg/kg EtOH
3	07:00	%0,9 NaCl + 5 mg/kg CNO
5	07:00	%0,9 NaCl + 5 mg/kg CNO

Gece döngüsü besin tüketimini gözlemlemek için *ad libitum* beslenmekte olan farelere, bölüm 5.2.9'da gece döngüsü için belirtilen deney düzeneği uygulandı (Tablo 5.2.11.1.4).

Tablo 5.2.11.1.4. İnhibisyon için gece döngüsü intraperitoneal enjeksiyonları

Gün	Saat	i.p. enjeksiyon
1	19:00	%0,9 NaCl + 5 mg/kg EtOH
3	19:00	%0,9 NaCl + 5 mg/kg CNO
5	19:00	%0,9 NaCl + 5 mg/kg CNO

5.2.12. Glikoz tolerans testi

Glikoz tolerans testi için rAAV-hSyn-FLEX-hM3D(Gq)-mCherry veya rAAV-hSyn-FLEX-hM4D(Gi)-mCherry virüsü enjekte edilmiş ve virüs enfeksiyonu için en az 14 gün beklenmiş fareler kullanıldı. Glikoz tolerans testine başlamadan 16 saat önce farelerin besine erişimi engellendi. 16 saatlik açlığın sonunda farenin kuyruğuna bisturi yardımıyla kesik atıldı. Venöz kan, şeker ölçüm çubuğuna konuldu ve şeker ölçüm cihazı ile ölçüldü. 30 dakika sonra farelere intraperitoneal olarak %0,9 NaCl + 5 mg/kg EtOH (plasebo günü) veya %0,9 NaCl + 5 mg/kg CNO (deney günü) enjekte edildi ve kan şekerleri ölçüldü. Bu enjeksiyondan 30 dakika sonra intraperitoneal olarak 2 g/kg D-Glikoz (dekstroz) enjekte edildi ve kan şekeri ölçüldü. Kan şekeri ölçümü, 90, 120 ve 150. dakikalarda tekrarlandı. Deneyin sonunda fareler tekrar *ad libitum* beslenmeye başlandı.

5.2.13. İnsülin tolerans testi

İnsülin tolerans testi için rAAV-hSyn-FLEX-hM3D(Gq)-mCherry veya rAAV-hSyn-FLEX-hM4D(Gi)-mCherry virüsü enjekte edilmiş ve virüs enfeksiyonu için en az 14 gün beklenmiş fareler kullanıldı. *Ad libitum* olarak beslenmekte olan farelerin besine erişimi deney süresince engellendi. Besinin alınmasından 30 dakika sonra İlk kan şekeri ölçümü gerçekleştirildi. 30 dakika sonra farelere intraperitoneal olarak %0,9 NaCl + 5 mg/kg EtOH (plasebo günü) veya %0,9 NaCl + 5 mg/kg CNO (deney günü) enjekte edildi ve kan şekerleri ölçüldü. Bu enjeksiyondan 30 dakika sonra intraperitoneal olarak 0,75 iU/kg Humulin® R İnsülin enjekte edildi ve kan şekeri ölçüldü. Kan şekeri ölçümü, 90, 120 ve 150. dakikalarda tekrarlandı. Deneyin sonunda fareler tekrar *ad libitum* beslenmeye başladı.

5.2.14. MCH Nöronlarının Sinaptik İnhibisyonu

MCH nöronlarının sinaptik bağlantılarını susturabilmek için, beynin lateral hipotalamus bölgesine bilateral olarak 500 nL rAAV-FLEX-TetTox-GFP virüsü enjekte edildi ve virüsün enfekte olması için 15 gün beklendi. İntrakraniyal enjeksiyondan önce farelerin İlk vücut ağırlıkları ölçüldü. 15 günlük sürenin sonunda farelerin besin tüketimi ve vücut ağırlıkları her gün aynı saatte ölçüldü. Bu ölçümler 5 hafta sürdürüldü. Ardından farelere yüksek yağlı bir besin olan Ensure® 2 Cal Çilekli (%40 yağ içeriği) verilmeye başlandı. Besin tüketimi ve vücut ağırlıkları 3 hafta süreyle ölçüldü. Bu sürenin sonunda farelere kardiyak perfüzyon uygulandı ve peritoneal adipoz dokuları toplandı.

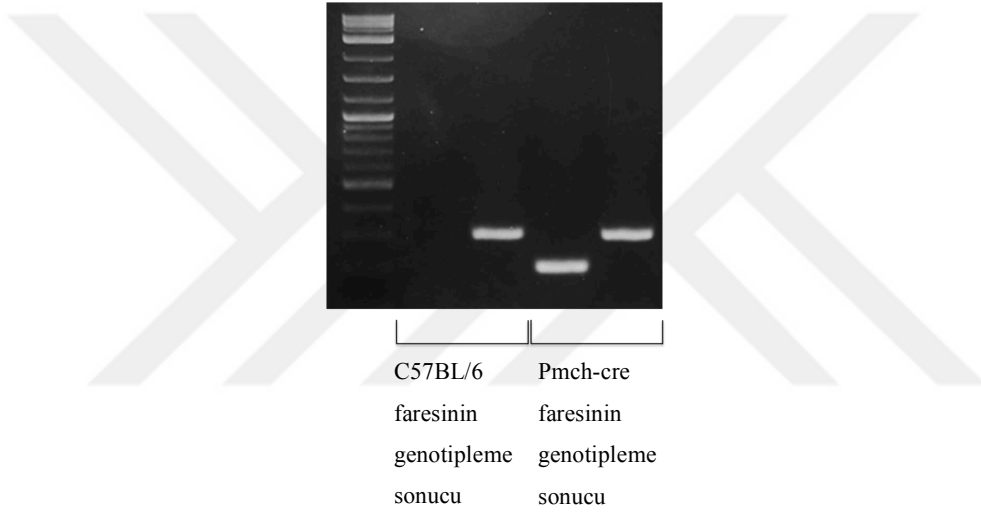
5.2.15. İstatistiksel analizler

İstatistiksel analizler için GraphPad Prism (RRID:SCR_002798, GraphPad, San Diego, CA) programı kullanıldı. Sonuçlar, Student's t-test ile değerlendirildi. Tüm değerler \pm standart hata olarak gösterildi. $p > 0,05$; istatistiksel olarak anlamsız kabul edildi. $p < 0,05$; *, $p < 0,01$; **, $p < 0,001$; *** olarak gösterildi.

6. BULGULAR

6.1. Deney Grupları ve Genotipleme

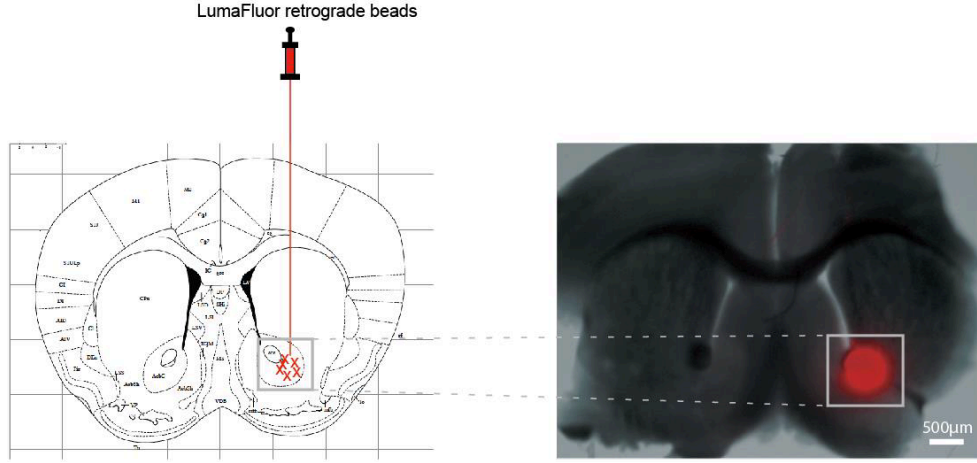
Yapılan deneylerde yalnızca 30 günlük Pmch-cre transgenik erkek fare kullanıldı. Genotipleme sonucuna göre aynı batından doğan transgenik erkek fareler aynı deneyler için kullanıldı. rAAV-FLEX-GFP enjeksiyonu yapılan 30 günlük Pmch-cre transgenik erkek fareler kontrol grubu olarak kullanıldı. Transgenik olmayan fareler deneylere dahil edilmedi (Resim 6.1.1).



Resim 6.1.1. C57BL/6 ve Pmch-cre farelerinin genotipleme sonucu

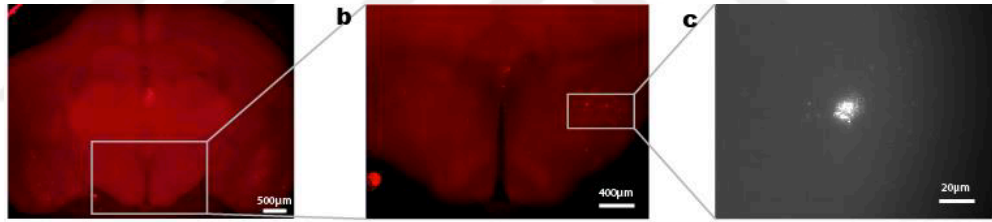
6.2. Nacc Afferent Yolaklarının Belirlenmesi

Nacc bölgesine gelen bağlantıların belirlenebilmesi için bu bölgeye Resim 6.2.1’de gösterildiği gibi retrograd floresan boncuklar enjekte edildi.

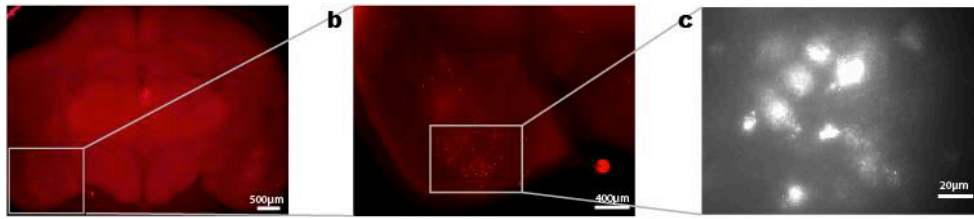


Resim 6.2.1. Nacc bölgesine yapılan retrograd floresan boncuk enjeksiyonu

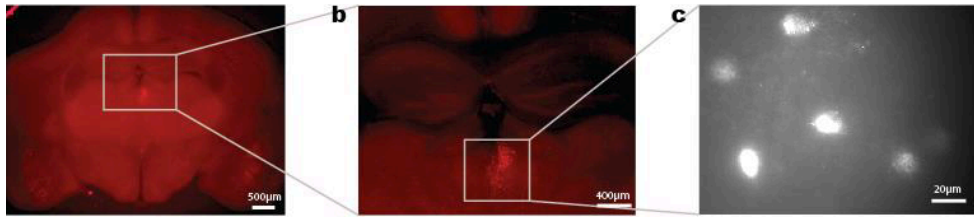
Nacc bölgesine yapılan retrograd işaretleme ile lateral hipotalamus, medial habenula, amigdala ve ventral tegmental alan bölgelerinde bulunan nöronların somalarında yoğun floresan boncuk birikimi gözlemlendi (Resim 6.2.2, Resim 6.2.3, Resim 6.2.4, Resim 6.2.5).



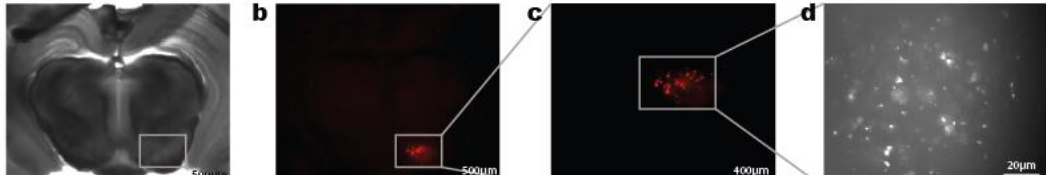
Resim 6.2.2. LHA nöronlarında floresan boncuk birikimi



Resim 6.2.3. Amigdala nöronlarında floresan boncuk birikimi

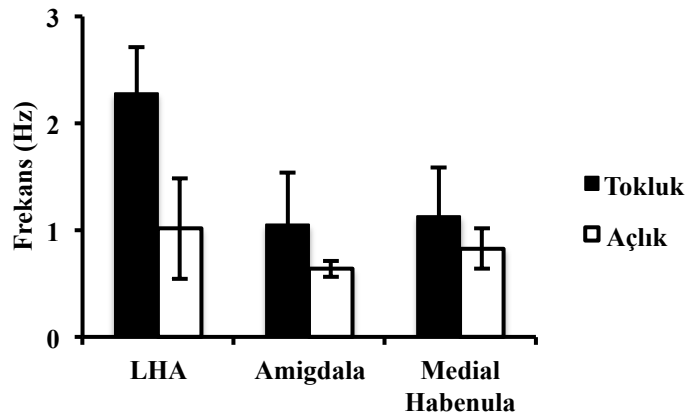


Resim 6.2.4. Medial Habenula nöronlarında floresan boncuk birikimi



Resim 6.2.5. Ventral Tegmental Alan nöronlarında floresan boncuk birikimi

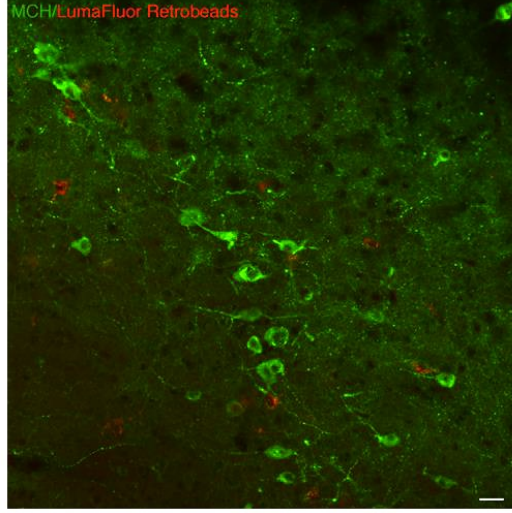
Lateral hipotalamus, amigdala ve medial habenula bölgelerindeki floresan işaretli nöronların elektriksel spontan aktivitesi yama kıskacı ile kayıt edildi (Şekil 6.2.1). Lateral hipotalamus bölgesinde spontan aktivite tokluk durumunda 2,28 Hz (\pm 0,44 Hz), açlık durumunda ise 1,1 Hz (\pm 0,47 Hz) olarak bulunmuştur. Amigdala ve medial habenula bölgelerindeki spontan aktivitenin tokluk ve açlık durumunda daha az farklılık gösterdiği görüldü. Amigdala bölgesinin tokluk durumunda 1,05 Hz (\pm 0,49 Hz), açlık durumunda ise 0,64 Hz (\pm 0,07 Hz) frekans verdiği tespit edildi. Medial habenula bölgesindeki spontan aktivite ise tokluk durumunda 1,05 Hz (\pm 0,49 Hz), açlık durumunda ise 0,64 Hz (\pm 0,07 Hz) olarak ölçüldü. 3 bölgede de tokluk ve açlık spontan aktivitesinde anlamlı bir farklılığa rastlanmadı. Ventral tegmental alan bölgesindeki akson yoğunluğu sebebiyle elektrofizyolojik kayıt alınamadı. Elektrofizyolojik kayıtlara göre, aç ve tok farelerdeki elektriksel spontan aktivite farkının en çok LHA bölgesinde olduğu gözlemlendi.



Şekil 6.2.1. Tokluk ve açlık durumunda LHA, amigdala ve medial habenula nöronlarından ölçülen elektriksel spontan aktivite

Lateral hipotalamustan Nacc bölgesine giden bağlantıların hangi nöron alt gruplarından geldiğini belirleyebilmek için retrograd kırmızı floresan boncuk işaretli

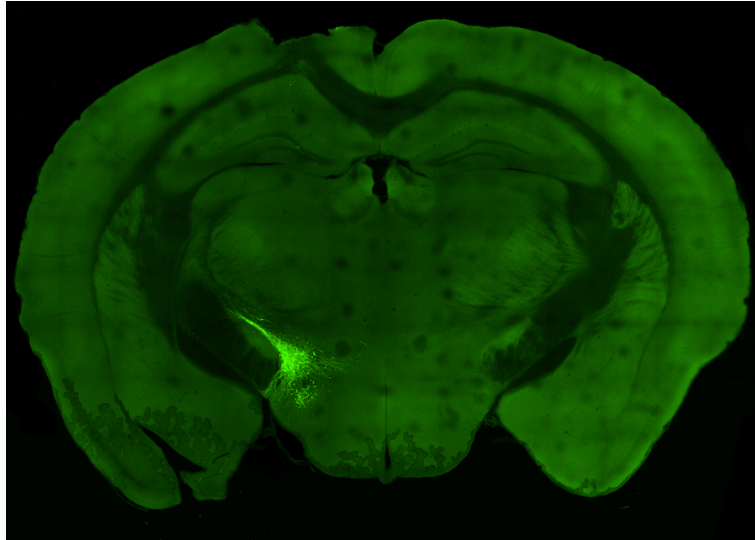
bölgeler Immünohistokimya yöntemi ile anti-MCH antikoru ile işaretlendi (Resim 6.2.6). MCH nöronlarında kırmızı floresan boncuk birikimi olduğu gözlemlendi.



Resim 6.2.6. Nacc retrograd floresan boncuk (kırmızı) ve anti-MCH antikor boyaması (yeşil)

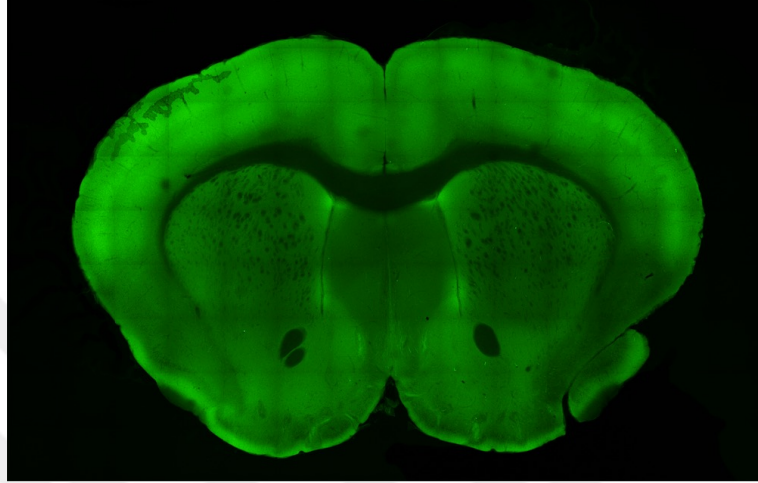
6.3. MCH Nöronlarının Efferent Yolaklarının Belirlenmesi

MCH nöronlarının efferent bağlantılarının belirlenebilmesi için, LHA bölgesine unilateral olarak rAAV-FLEX-GFP enjeksiyonu yapıldı (Resim 6.3.1).



Resim 6.3.1. MCH nöronlarına yapılan rAAV-FLEX-GFP enjeksiyonu

14 gün operasyon sonrası bakım süresince yeşil floresan protein (GFP) molekülü MCH nöronlarının somalarından akson uçlarına kadar ilerledi. Tüm beyin boyunca MCH projeksiyonuna bakıldı ve birçok bölgede yoğun akson gözlemlendi. MCH nöronlarının Nacc bölgesine projeksiyon gönderdiği belirlendi (Resim 6.3.2).

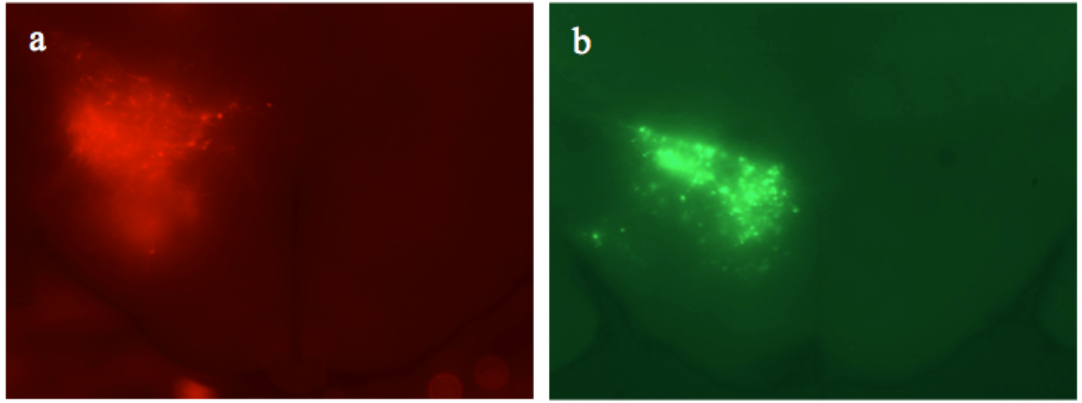


Resim 6.3.2. MCH nöronlarının Nacc bölgesine projeksiyonu

6.4. MCH Nöronlarının Aktivasyonu

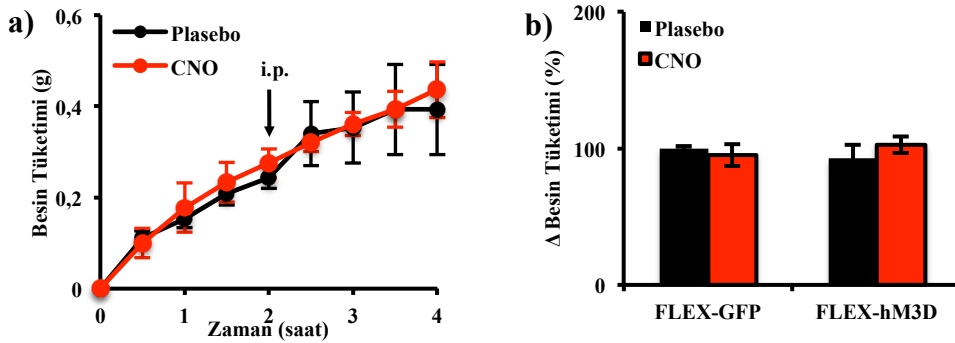
6.4.1. Besin tüketimi ölçümü

MCH nöronlarının kemogenetik aktivasyonu durumunda besin tüketimindeki değişimi gözlemleyebilmek için gündüz ve gece döngülerinde intrakraniyal olarak unilaterale rAAV-hSyn-FLEX-hM3D(Gq)-mCherry (n=6) ve rAAV-FLEX-GFP (n=4) enjekte edilmiş Pmch-cre transgenik fareler (Resim 6.4.1.1) davranış deneylerine alındı.



Resim 6.4.1.1. Lateral hipotalamus bölgesine yapılan a) rAAV-hSyn-FLEX-hM3D(Gq)-mCherry b) rAAV-FLEX-GFP enjeksiyonu

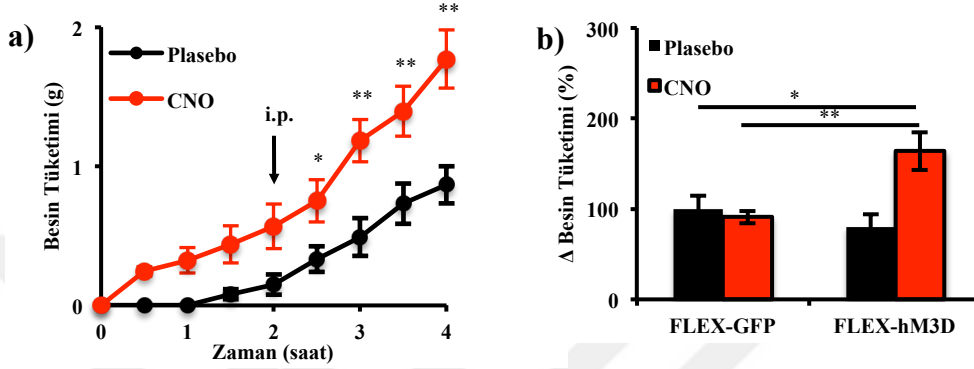
Yapılan analizler sonucunda gündüz döngüsünde MCH nöron aktivasyonunun besin tüketimi üzerine bir etkisi olmadığı gözlemlendi. FLEX-hM3D grubuna plasebo verilen gün besin tüketimi 0,40 g (\pm 0,01 g) iken, CNO verilen 2 günün ortalamasındaki besin tüketimi 0,44 g (\pm 0,06 g) olarak ölçüldü (Şekil 6.4.1.1, a). FLEX-GFP kontrol grubu fareleri ise plasebo gününde 0,43 g (\pm 0,02 g), CNO gününde 0,40 g (\pm 0,08 g) besin tüketti. Tüm deney gruplarındaki 4 saatlik besin tüketimi değişimi FLEX-GFP kontrol grubunun plasebo gününe normalize edildi (Şekil 6.4.1.1, b). Bu gruplar arasında anlamlı bir farklılığa rastlanmadı ($p > 0,05$).



Şekil 6.4.1.1. MCH nöron aktivasyonu gündüz döngüsü besin tüketimi Plasebo ve CNO verilen günlerde FLEX-hM3D grubu besin tüketimi 4 saatlik besin tüketimi değişiminin FLEX-GFP Plasebo grubuna normalizasyonu

Gece döngüsünde MCH nöronlarının aktivasyonu, besin tüketimini CNO verilen günlerin ortalamasında 1,77 g (\pm 0,20 g) artırırken, bu değer plasebo verilen günde 0,87 g (\pm 0,16 g)'da kaldı. Ölçümlerin başlangıcından 150 dakika, intraperitoneal CNO enjeksiyonundan ise 30 dakika sonra gruplar arasında anlamlı farklılıklar

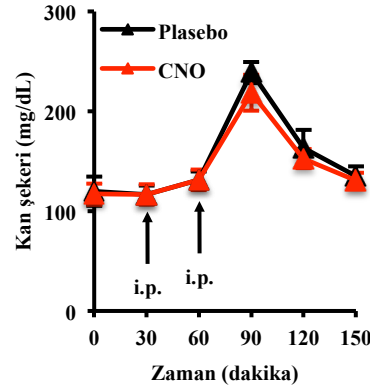
gözlenmeye başlandı (Şekil 6.4.1.2, a). Ardından, besin tüketimindeki 4 saatlik değişim, FLEX-GFP kontrol grubunun plasebo gününe normalize edildi. Buna göre, FLEX-hM3D grubunun CNO verilen gününde besin tüketimi %163 oranında artış gösterdi (Şekil 6.4.1.2, b). İstatistiksel analizler sonucunda gruplar arasında anlamlı farklılıklar tespit edildi ($p < 0,05$).



Şekil 6.4.1.2. MCH nöron aktivasyonu gece döngüsü besin tüketimi a) Plasebo ve CNO verilen günlerde FLEX-hM3D grubu besin tüketimi b) 4 saatlik besin tüketimi değişiminin FLEX-GFP Plasebo grubuna normalizasyonu

6.4.2. Glikoz Tolerans Testi

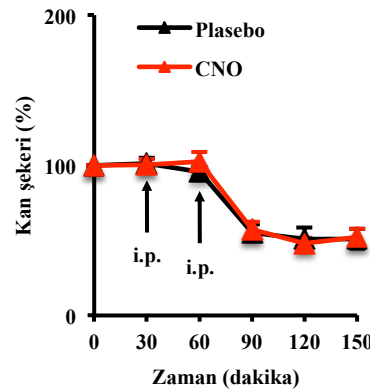
rAAV-hSyn-FLEX-hM3D(Gq)-mCherry enjekte edilmiş fareler 16 saat açlığa maruz bırakıldı. Deney süresince besine erişimleri engelledi. Farelerin kuyruklarından bisturi yardımıyla oluşturulan kesikten 30 dakika arayla venöz kan alınmaya başlandı. İlk 30 dakikanın başında kan şekeri ölçümü yapılmadan hemen önce, farelere intraperitoneal olarak plasebo veya CNO enjekte edildi. İkinci 30 dakikanın başında ise yine kan şekeri ölçümü yapılmadan hemen önce 2 g/kg konsantrasyonunda dekstroz enjekte edildi. Kan şekeri ölçümüne 150. dakikaya kadar devam edildi. Buna göre, dekstroz enjeksiyonundan sonra kan şekeri plasebo verilen günde 238,85 mg/dL ($\pm 10,90$ mg/dL), CNO verilen günde 218,5 mg/dL ($\pm 17,98$ mg/dL) seviyesine ulaştı. 120. dakikada her iki grubun kan şekeri orantılı olarak azalmaya başladı (Şekil 6.4.2.1). MCH nöron aktivasyonu glikoz tolerans testinde plasebo ve CNO grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa rastlanmadı ($p > 0,05$).



Şekil 6.4.2.1. MCH nöronlarının aktivasyonu durumunda glikoz tolerans testine bağlı kan şekeri değerleri

6.4.3. İnsülin Tolerans Testi

İnsülin tolerans testine başlamadan 30 dakika önce aç bırakılmaya başlanmış ve deney süresince besine erişimi engellenmiş farelerin kuyrukları, venöz kan alımı için bisturi yardımıyla kesildi. İlk 30 dakikanın başında kan şekeri ölçümü yapılmadan hemen önce, farelere intraperitoneal olarak plasebo veya CNO enjekte edildi. İkinci 30 dakikanın başında ise yine kan şekeri ölçümü yapılmadan hemen önce 0,75 iU/kg konsantrasyonunda Humulin® R İnsülin enjekte edildi. Kan şekeri ölçümüne 150. dakikaya kadar devam edildi. Intraperitoneal insülin enjeksiyonundan 30 dakika sonra farelerin kan şekeri plasebo gününde %55 (\pm %5,48), CNO gününde %57 (\pm %5,29) seviyesine indiği gözlemlendi. Devam eden ölçümlerde, iki grup arasındaki azalmanın paralel devam ettiği tespit edildi (Şekil 6.4.3.1).

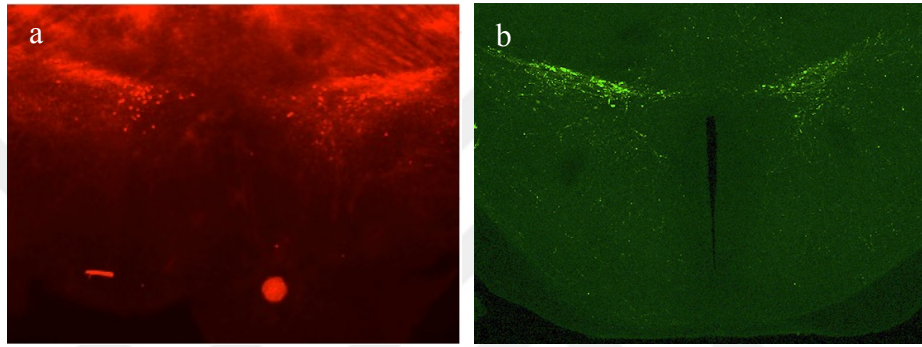


Şekil 6.4.3.1. MCH nöronlarının aktivasyonu durumunda insülin tolerans testine bağlı kan şekeri yüzdeleri

6.5. MCH Nöronlarının İnhibisyonu

6.5.1. Besin tüketimi ölçümü

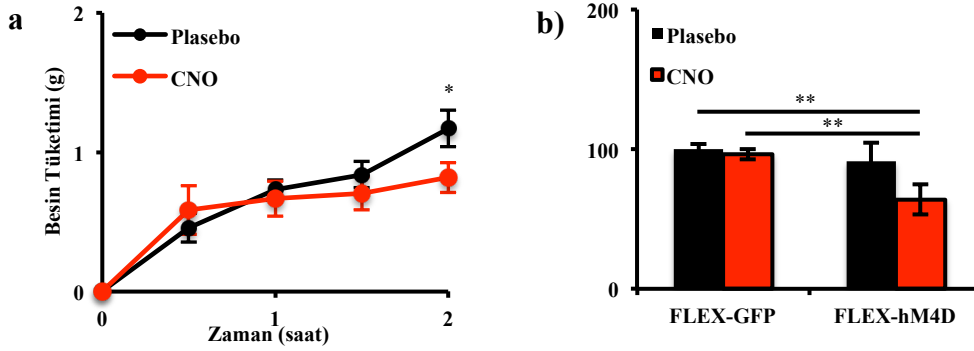
MCH nöronlarının DREADD yöntemi ile kemogenetik inhibisyonu durumunda besin tüketimindeki değişimi gözlemleyebilmek için gündüz ve gece döngülerinde intrakraniyal olarak bilateral rAAV-hSyn-FLEX-hM4D(Gi)-mCherry (n=6) ve rAAV-FLEX-GFP (n=4) enjekte edilmiş Pmch-cre transgenik fareler (Resim 6.5.1.1) davranış deneylerine alındı.



Resim 6.5.1.1. Lateral hipotalamus bölgesine yapılan a) rAAV-hSyn-FLEX-hM4D(Gi)-mCherry b) rAAV-FLEX-GFP enjeksiyonu

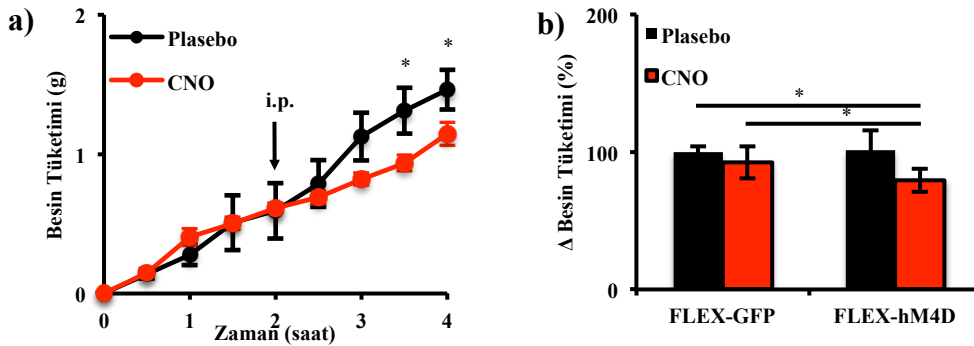
İnhibisyon durumunda oluşacak davranış farklılıklarını gözlemleyebilmek için gece ve gündüz döngülerinde farklı deney düzenekleri oluşturuldu. Gündüz döngüsü besin tüketimi ölçümüne başlamadan fareler 16 saatlik açlığa maruz bırakıldı ve deney süresince besine erişimleri engellendi. İntraperitoneal enjeksiyondan 30 dakika sonra besin sunulmasıyla, gündüz döngüsü besin ölçümleri başlatıldı. Bu ölçümlere göre, gündüz döngüsünde FLEX-hM4D grubuna plasebo verilen gün besin tüketimi 1,17 g (\pm 0,82 g) olarak ölçülürken, CNO verilen 2 günün ortalamasındaki besin tüketimi büyük azalma göstererek 0,82 g (\pm 0,11 g) olarak belirlendi (Şekil 6.5.1.1, a). CNO verilen günlerdeki bu azalmanın, plasebo grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu hesaplandı ($p < 0,05$). FLEX-GFP kontrol grubu fareleri ise plasebo gününde 1,28 g (\pm 0,04 g), CNO gününde 1,23 g (\pm 0,04 g) besin tüketti. Tüm deney gruplarındaki 4 saatlik besin tüketimi değişimi, FLEX-GFP kontrol grubunun plasebo gününe normalize edildiğinde, inhibisyonu durumunda besin tüketiminin %64 seviyesine azaldığı analiz edildi (Şekil 6.5.1.1, b). Gündüz döngüsü FLEX-hM4D CNO günü besin tüketiminde bu azalma, FLEX-hM4D plasebo, FLEX-GFP

plasebo ve FLEX-GFP CNO gruplarına göre anlamlı bir farklılık teşkil etmektedir ($p<001$).



Şekil 6.5.1.1. MCH nöron inhibisyonu gündüz döngüsü besin tüketimi a) Plasebo ve CNO verilen günlerde FLEX-hM4D grubu besin tüketimi b) 4 saatlik besin tüketimi değişiminin FLEX-GFP Plasebo grubuna normalizasyonu

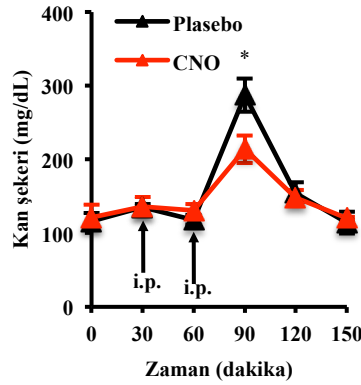
Gece döngüsünde MCH nöronlarının inhibisyonu, besin tüketimini CNO verilen günlerin ortalamasında 1.15 g ($\pm 0,08$ g) seviyesine azalmasına sebebiyet verirken, plasebo verilen günde besin tüketimi 1,46 g ($\pm 0,14$ g) olarak ölçüldü. Ölçümlerin başlangıcından 210 dakika, intraperitoneal CNO enjeksiyonundan ise 60 dakika sonra gruplar arasında anlamlı farklılıklar gözlenmeye başlandı (Şekil 6.5.1.2, a). FLEX-GFP enjekte edilmiş hayvanlarda besin tüketiminin plasebo verilen günde 1,44 g ($\pm 0,04$ g), CNO verilen günde ise 1,33 g ($\pm 0,11$ g) olduğu gözlemlendi. Besin tüketimindeki 4 saatlik değişim, FLEX-GFP kontrol grubunun plasebo gününe normalize edildi. Buna göre, FLEX-hM4D grubunun CNO verilen gününde besin tüketimi %79 seviyesine azaldı (Şekil 6.5.1.2, b). İstatistiksel analizler sonucunda gruplar arasındaki anlamlı farklılıklar tespit edildi ($p<0,05$).



Şekil 6.5.1.2. MCH nöron inhibisyonu gece döngüsü besin tüketimi a) Plasebo ve CNO verilen günlerde FLEX-hM4D grubu besin tüketimi b) 4 saatlik besin tüketimi değişiminin FLEX-GFP Plasebo grubuna normalizasyonu

6.5.2. Glikoz tolerans testi

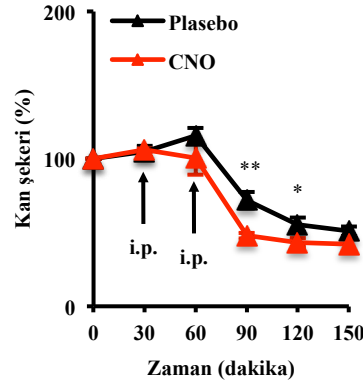
rAAV-hSyn-FLEX-hM4D(Gi)-mCherry enjekte edilmiş fareler 16 saat açlığa maruz kalarak glikoz tolerans testine tabi tutuldu. İlk 30 dakikanın sonunda plasebo veya CNO, ikinci 30 dakikanın sonunda 2 g/kg dekstrozu enjekte edildi. Dekstroz enjeksiyonunu takip eden ölçümde plasebo günü kan şekeri 287,5 mg/dL (\pm 22,68 mg/dL) olarak tayin edilirken, bu değer CNO verilen günde ciddi bir düşüş göstererek 214 mg/dL (\pm 18,77 mg/dL) seviyesinde olduğu belirlendi. MCH nöronlarının inhibe olması durumunda görülen bu düşük kan şekerinin, normal ölçümlere göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark yarattığı analiz edildi ($p < 0,05$) (Şekil 6.5.2.1).



Şekil 6.5.2.1. MCH nöronlarının inhibisyonu durumunda glikoz tolerans testine bağlı kan şekeri değerleri

6.5.3. İnsülin tolerans testi

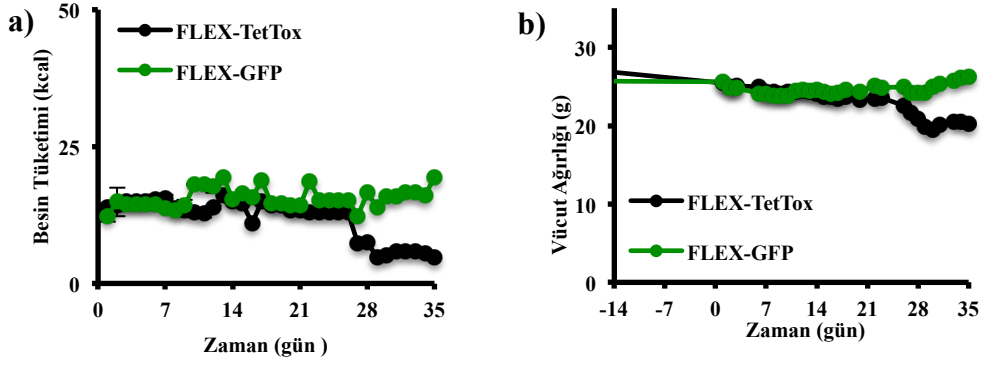
MCH nöronlarının inhibe olması durumunda insülin tolerans testine bağlı kan şekerinde oluşan olası değişimi gözlemleyebilmek için, FLEX-hM4D enjeksiyonlu farelere 30. ve 60. dakikalarda sırasıyla plasebo veya CNO ve Humulin® R İnsülin intraperitoneal enjeksiyonu yapıldı. Yapılan ölçümler sonucunda, CNO verilerek MCH nöronlarının inhibe edilmesinin, kan şekerini %47,89 (\pm %1,85) seviyesine düşürdüğü tespit edildi. Bu değer plasebo verilen günde %71,91 (\pm %5,50) civarında kaldı. Gruplar arasındaki en belirgin farklılıklar 90. Dakikada ($p < 0,01$) ve 120. dakikada ($p < 0,05$) ölçüldü Şekil (6.5.3.1).



Şekil 6.5.3.1. MCH nöronlarının aktivasyonu durumunda insülin tolerans testine bağlı kan şekeri yüzdeleri

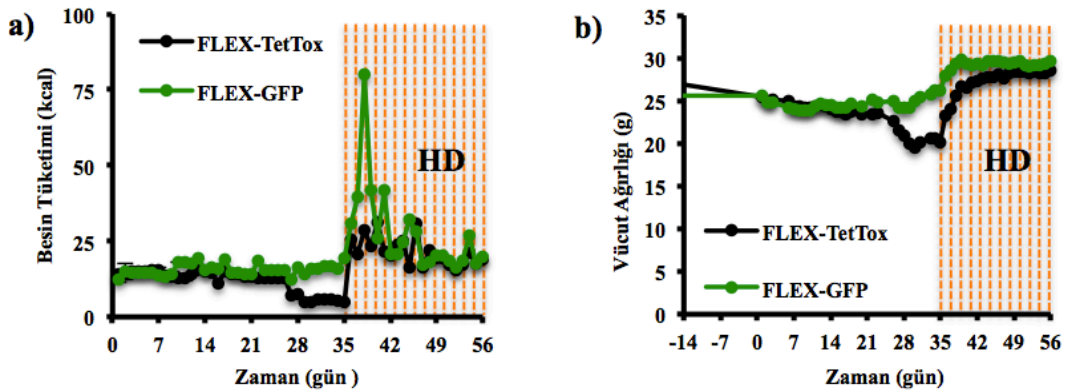
6.6. MCH Nöronlarının Sinaptik İnhibisyonu

MCH nöronlarının sinaptik bağlantılarının kalıcı olarak inhibe edildiğinde oluşacak etkileri gözlemleyebilmek için, kiloları birbirinin aynı ve aynı batından doğan 15 adet erkek Pmch-cre fareye rAAV-FLEX-TetTox-GFP (n=10) ve rAAV-FLEX-GFP (n=5) virüsleri bilateral olarak enjekte edildi. Farelerin enjeksiyon günü vücut ağırlıkları ölçüldü ve 14 gün operasyon sonrası bakıma alındı. Bakım süresinin sonunda farelerin besin tüketimi ve vücut ağırlıkları her gün, günün aynı saatinde ölçüldü. Bu ölçümler 5 hafta boyunca sürdürüldü. Ölçümler boyunca tetanoz toksin ile MCH nöronlarının sinaptik bağlantılarının kesildiği grupta ciddi besin tüketimi ve vücut ağırlığı düşüşü gözlemlendi. Farelerin fizyolojik durumlarının gerilediği kaydedildi. FLEX-GFP enjekte edilmiş kontrol grubunda besin tüketimi ve vücut ağırlığının olağan seyrettiği gözlemlendi. 35. günün sonunda FLEX-TetTox grubunun besin tüketimi 4,79 kcal (\pm 0,63 kcal), FLEX-GFP grubunun besin tüketimi 19,40 kcal (\pm 1,53 kcal) olarak ölçüldü (Şekil 6.6.1, a). FLEX-TetTox grubunun vücut ağırlığı 20,20 g (\pm 0,83 g) seviyesine düşerken, FLEX-GFP grubunun vücut ağırlığı geçirdiği operasyona rağmen bazal seviyesini koruyarak 26,22 g (\pm 0,68 g) değerinde kaldı (Şekil 6.6.1, b). Besin tüketimi ve vücut ağırlığındaki farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı bir fark yarattığı belirlendi ($p < 0,001$). Grafiklerde -14. gün operasyonun yapıldığı, 0. gün ise operasyon sonrası bakımın bitip ölçümlerin başladığı günü göstermektedir.



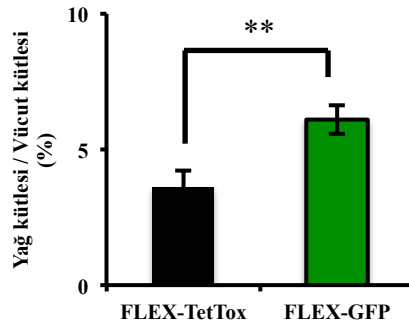
Şekil 6.6.1. MCH nöronlarının sinaptik bağlantılarının kalıcı olarak inhibe edildiği grupta ve kontrol grubunda a) besin tüketimi, b) vücut ağırlığı değişimi

35. günün sonunda farelere enerjinin %40'ini yağdan sağlayan Ensure® 2 Cal Çilekli yüksek yağlı, hedonik besin verilmeye başlandı. Her iki grup da 21 gün boyunca sadece bu besinle beslendi. Besinin verilmeye başlandığı İlk gün, gruplarda önemli bir kilo ve besin tüketimi artışı gözlemlendi. FLEX-TetTox grubunun fizyolojik durumunda iyileşme görüldü. 21 günün sonunda FLEX-TetTox grubunun besin tüketimi 18,86 kcal ($\pm 0,86$ kcal), FLEX-GFP grubunun besin tüketimi 19,78 kcal ($\pm 3,56$ kcal) olarak ölçüldü (Şekil 6.6.2, a). Gruplar vücut ağırlıkları bakımından karşılaştırıldığında, FLEX-TetTox grubunun bağıl vücut artışının, FLEX-GFP grubunun vücut artışına göre çok daha önemli olduğu anlaşıldı. 21 günün sonunda FLEX-TetTox grubunun vücut ağırlığı ortalama 8.35 g artarak 28,55 g ($\pm 0,64$ g)'a yükseldi. FLEX-GFP grubundaki vücut ağırlığı artışı ise ortalama 3.45 g'da kalarak 29,65 g ($\pm 1,34$ g)'a yükseldi (Şekil 6.6.2, b).



Şekil 6.6.2. MCH nöronlarının sinaptik bağlantılarının kalıcı olarak inhibe edildiği grupta ve kontrol grubunda hedonik diyet sonrası (kesik çizgiler) a) besin tüketimi, b) vücut ağırlığı değişimi

8 haftalık ölçümlerin sonunda fareler sakrifiye edildi ve vücutlarında biriken yağ kütleleri cerrahi diseksiyon ile alındı. Toplanan adipoz dokular tartıldı ve toplam vücut ağırlıklarına oranları hesaplandı. FLEX-TetTox grubunun vücut ağırlığı 8 haftalık deneyin sonunda 8.35 g artış gösterdiği halde, yağ kütlelerinin toplam vücut kütlelerine oranı %3,62 (\pm %0,60) seviyesinde kalırken, FLEX-GFP grubunun vücut ağırlık artışı 3.45 g olduğu halde, yağ kütlelerinin toplam vücut kütlelerine oranı %6,10 (\pm %0,52) olarak ölçüldü (Şekil 6.6.3). Gruplar arasındaki bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0,001$).



Şekil 6.6.3. MCH nöronlarının sinaptik bağlantılarının kalıcı olarak inhibe edildiği grubun ve kontrol grubunun yağ kütlelerinin vücut kütlelerine oranı

7. TARTIŞMA

Obezite milyonlarca kişiyi etkileyen ve her geçen yıl, bir öncekine göre daha ciddi oranlara ulasan global bir sağlık sorunudur. Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre, dünya nüfusunun %65'i obezite ölümlerinin, zayıflık ölümlerinden daha çok görüldüğü bölgelerde yaşamaktadır. Bu durum, obezitenin görülme sıklığını her geçen yıl daha da arttırmaktadır (6). Obezitenin kardiyovasküler rahatsızlıklar, kanser, diyabet, hipertansiyon, çoklu organ yetmezlikleri gibi birçok hastalığa sebebiyet vermesi ve dolaylı mortalite riskinin yüksek olması sebebiyle, özellikle modern toplumlarda bir an önce çözüme kavuşmasının hayati önem taşıdığı bilinmektedir. Mevcut tedavi yöntemleri arasında ilaç tedavileri, diyetler, egzersiz programları ve cerrahi müdahaleler olduğu bilinmektedir. Ancak bu tedaviler çoğunlukla yetersiz kalmakta ve yan etkiler sebebiyle hayati tehlike taşımaktadır. Obezitenin bu denli önemli bir sağlık sorunu olması, farklı tedavi yöntemlerinin araştırılmasına ve geliştirilmesine duyulan ihtiyacı da arttırmaktadır (1).

Obezitenin başlıca sebeplerinden biri besin tüketimindeki dengesizliktir. Alınan kalorinin harcanan kalorigen fazla olması kilo alımına sebebiyet vermektedir. Bunun yanı sıra, yanlış besin tüketimi de obezitenin çıkış noktalarından biridir (29). Besin tüketimi, her ne kadar fizyolojik temelli bir durum olsa da, yalnızca homeostatik dengeyi korumaya katkıda bulunmamaktadır. Hedonik beslenme, yani zevk için beslenme durumu, vücudun ihtiyacı olmadığı halde tükettiği, genellikle yağ, şeker gibi cezbedici içerikler bakımından zengin besinlere duyulan ilgiyi arttırmakta ve obezitenin ana nedenlerinden birini oluşturmaktadır (30). Beyinde hedonik beslenmeyi regüle ettiği bölgelerin varlığı bilinmektedir. Mevcut çalışmalar, tüketilen cazip besinlerin beyinde nükleus akkumbens bölgesinde dopamin salınımını arttırdığını ortaya koymuştur (31). Dahası, bir besinin hedonik değeri ne kadar çoksa, nükleus akkumbens bölgesinde salınan dopamin miktarının da o denli çok olduğu tespit edilmiştir (14). Ancak bu bölgenin hangi bağlantılar üzerinden hedonik beslenmeyi kontrol ettiği henüz tam olarak anlaşılamamıştır.

Hipotalamusun, beyinde beslenme kontrolü sağladığı uzun yıllardır bilinmektedir. Hipotalamusta bulunan çekirdekler ve alanlar açlık tokluk mekanizmasını regüle etmekte ve iştah kontrolünü sağlamaktadır (32). Lateral hipotalamus bölgesinde yapılan elektriksel uyarım ile aktivasyon ve çeşitli yollarla yapılan lezyon ile inhibisyon çalışmaları, bu bölgenin oreksinerjik olduğuna işaret etmektedir. Lateral hipotalamus bölgesinin aktivasyonun besin tüketimini ve kilo alımını arttırdığını, inhibisyonunun ise iştahı kestiği, besin alımını durduğu ve anoreksiye sebebiyet verdiği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (17, 18). Ancak bu çalışmalar tüm lateral hipotalamus bölgesini kapsamakta ve bu bölgede bulunan farklı genetik altyapılara sahip nöron alt gruplarını göz ardı etmektedir.

Nükleus akkumbens bölgesinin hedonik beslenmeyi hangi bağlantılar aracılığıyla kontrol ettiği henüz anlaşılamamış olsa da, en güçlü hipotezlerden biri bu bölgenin beslenme mekanizmasını regüle eden hipotalamus bölgesiyle bağlantı halinde olduğudur. Dolayısıyla bu tez çalışmasının amacı, nükleus akkumbens ve hipotalamus arasındaki olası bağlantıları ortaya çıkarmak ve bu bağlantıların iştah kontrolü ve hedonik beslenme üzerindeki etkilerini tayin edebilmektir.

Nükleus akkumbens bölgesinin afferent bağlantılarını ortaya çıkarabilmek için yaptığımız retrograd floresan boncuk enjeksiyonlarında bu bölgenin lateral hipotalamus, amigdala, medial habenula ve ventral tegmental alan bölgelerinden afferent sinyal aldığını belirledik. Yama kıskacı ile bu bölgelerde bulunan nöronlardan açlık ve tokluk durumlarında aldığımız elektriksel spontan aktivite, bu iki grup arasında en anlamlı farklılığın lateral hipotalamus bölgesinde olduğunu ortaya çıkardı. Bu durum, bu iki bölge arasındaki bağlantının önemini vurgulamakta ve hipotezimize katkıda bulunmaktadır.

Lateral hipotalamusta farklı genetik altyapılara sahip, melanin konsantre eden hormon nöronları, orexin nöronları ve yeni keşfedilmiş Vgat nöronları olmak üzere 3 nöron popülasyonu bulunmaktadır. Nacc bölgesine giden bağlantıların lateral hipotalamus bölgesinde hangi nöron alt grubu tarafından gönderildiğini anlayabilmek için kırmızı floresan boncuk işaretli beyin kesitlerine immünohistokimya boyaması

yapıldı. Nacc bölgesinin afferent bağlantılarının MCH nöronlarından geldiği gözlemlendi. Bu bağlantıyı teyit edebilmek için Pmch-cre transgenik faresine intrakraniyal olarak yaptığımız rAAV-FLEX-GFP virüs enjeksiyonu, MCH nöronlarından Nacc bölgesine efferent bağlantıların olduğunu doğruladı. Literatür çalışmaları, MCH nöronlarının glikoz hassasiyetine sahip olduğu ve aktivasyon durumunda bu nöronların şeker tüketimini arttırdığını göstermiştir (25, 26). Mevcut bilgi birikimi ve Nacc ile MCH nöronları arasında tespit ettiğimiz bağlantı, bu nöronların hedonik beslenmede rol oynayabileceğine işaret etmektedir.

MCH nöronlarının hedonik beslenme ağlarındaki rolünü belirleyebilmek için öncelikle bu nöronların iştah kontrolü üzerindeki etkisi bilinmelidir. MCH nöronlarının akut beslenme mekanizmasını nasıl etkilediği henüz anlaşılamamıştır. Bu sebeple öncelikle MCH nöronlarının akut aktivasyon ve inhibisyon durumlarında oluşan beslenme davranışı değişiminin analiz edilmesi gerekmektedir.

Hipotalamusun farklı çekirdekleri üzerinde uzun yıllardır yürütülen deneyler, lezyon yaratarak, kalıcı hasar vererek ya da elektrik gibi çeşitli uyarılarda bulunarak o bölgelerin fonksiyonlarını tayin etmeyi hedeflemekteydi (4, 17, 18). Her ne kadar bu çalışmalar güncel bilgi birikimimizin temelini oluştursa ve hipotalamus hakkında en genel bilgiyi sunsa da, tekniklerin oldukça invaziv oluşu, kalıcı hasar vermesi ve spesifik bilgi sağlayamaması bu çalışmaları günümüze taşıyamamıştır. Dolayısıyla modern yöntemlere duyulan ihtiyaç da artmıştır. Kemogenetik manipülasyonlar, geri dönüşlü, mesafeli, akut, invaziv olmayan ve en önemlisi spesifik aktivasyon ve inhibisyon sağlayarak, bu konudaki açığı kapatmıştır (27).

MCH nöronlarının fonksiyonlarını karakterize edebilmek için en modern tekniklerden olan kemogenetikten faydalandık. Intrakraniyal olarak enjekte edilen rAAV-hSyn-FLEX-hM3D(Gq)-mCherry virüsü ile gündüz ve gece döngülerinde, MCH nöron aktivasyonuna bağlı besin tüketimi değişimini gözlemledik. Genel kanının aksine, MCH nöronlarının aktive olmasının beslenme üzerinde bir etkisi olmadığı gösterdik. MCH nöronlarının aktive olduğu günlerle, aktivasyonun gerçekleşmediği günlerde besin tüketiminin aynı olduğunu tespit ettik.

Bu nöronların kan şekeri üzerindeki fizyolojik etkisini belirleyebilmek için yaptığımız glikoz tolerans testi ve insülin tolerans testinde de, aktivasyonun kan şekerini etkilemediğini ortaya koyduk. Bu bulgu, 2001 yılında yapılan ve MCH peptidinin aşırı ifade edildiğinde insülin toleransına sebebiyet verdiğini gösteren çalışma ile tezat oluşturmaktadır (23).

MCH nöronlarını inhibe ettiğimizde ise daha farklı bir davranış profili ile karşılaştık. 16 saatlik açlığın ardından MCH nöronlarının inhibe edilmesinin, uzun süreli açlık durumuna rağmen besin alımını baskıladığını tespit ettik. Bu veriyi gece döngüsünde *ad libitum* beslenme durumunda da test ettik ve besin alımının azaldığını her iki durumda da gösterdik. MCH nöronlarının akut inhibisyonunun beslenme davranışını baskılaması özgün nitelik taşımaktadır. Mevcut çalışmalar, MCH nöronlarını çeşitli yollarla öldürerek fonksiyonlarını tespit etmişlerdir (33). Ancak, akut beslenme üzerine yapılmış nöronlara zarar vermeden ve geri dönüşlü bir çalışma bulunmamaktadır.

MCH nöronlarının inhibisyonunun kan şekeri üzerindeki etkisini glikoz tolerans testi ve insülin tolerans testine bağlı olarak inceledik. İnhibisyon durumunda bu nöronların her iki testte de kan şekerinde önemli ölçüde düşüşe sebebiyet verdiğini gözlemledik.

MCH nöronlarının etkisini belirleyebilmek için bu nöronların sinaptik bağlantılarını intrakraniyal olarak yaptığımız rAAV-FLEX-TetTox-GFP virüsü ile inhibe ettik. Tetanoz toksin virüsü verilen grubu, kontrol grubu ile birlikte toplam 5 hafta besin tüketimi ve vücut ağırlığı bakımından test ettik. MCH nöronlarının sinaptik bağlantılarının inhibe edildiği durumda ciddi kilo kaybı ve besin tüketiminde azalma kaydettik. Bunların beraber fizyolojik durumlarında gerileme ve hastalık durumu gözlemledik. Bu durumun tesirini belirleyebilmek için, gruplar 3 hafta süre ile yağ bakımından zengin hedonik besin ile beslendi. MCH nöronlarında sinaptik inhibisyonu yapılan grupta kontrol grubuna önemli ölçüde kilo alımı tespit edildi. 3 haftanın sonunda her iki grubun vücut ağırlıkları denkleşti. Grupların yağ kütle

yüzdeleri karşılaştırıldığında, kontrol grubunun yağ kütlesinin, hızla kilo alan inhibisyon grubunun yaklaşık iki kati olduğu belirlendi. MCH nöronlarının sinaptik aktiviteleri engellendiğinde, hedonik beslenme sırasında ivmeli kilo alımına karşın, daha az adipozite olduğu görüldü. Bu bulgular oldukça özgün değer taşımaktadır.

Yapılan analizler ve kaydettiğimiz bulgular Nacc bölgesi ve en yoğun elektriksel spontan aktivite veren lateral hipotalamus bölgesinin hedonik beslenmeyi regüle etmede bağlantılı olabileceğini işaret etmektedir. Lateral hipotalamus bölgesinde bulunan farklı genetik altyapılara sahip nöron popülasyonları arasından melanin konsantre eden hormon nöronları direkt olarak Nacc bölgesine efferent bağlantı yapmaktadır. MCH nöronlarının fonksiyonları araştırıldığında, inhibisyonunun beslenme mekanizması ve iştah kontrolü üzerinde etkisi olduğu anlaşılmıştır. Bu nöronlar inhibisyonu durumunda şeker metabolizmasında düzenleyici roldedir. Sinaptik bağlantılarının kesilmesi durumunda ise ölüme sebebiyet verebilecek anoreksik faza geçişe yol açmıştır. Hedonik diyet ise kilo alımını arttırmış, ancak yağ kütlesi oluşumunu baskılamıştır.

8. SONUÇ

Lateral Hipotalamik Alan bölgesinde bulunan Melanin Konsantre Eden Hormon nöronları aktive edildiğinde, gündüz döngüsü besin tüketiminin değişmediği belirlenmiştir. Bu nöronların besin tüketimi üzerindeki etkisini araştıran bazı çalışmaların aksine, manipülasyon yapılmayan günlerle ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında herhangi bir artış gözlenmemiştir. Gece döngüsünde ise durum daha farklıdır. MCH nöronlarının aktivasyonu, besin tüketiminin yoğun olduğu gece döngüsü başlangıcında yapıldığında, zaten yüksek olan besin tüketiminin daha da arttığı tespit edilmiştir.

Melanin konsantre eden hormon nöronlarının aktive olması durumunda, glikoz ve insülin tolerans testlerine verdiği yanıtlar incelenmiştir. Kemogenetik aktivasyonun, her iki testte de kan şekerinde değişime yol açmadığı bulunmuştur. Beklenenin aksine, MCH nöronları kemogenetik yöntemlerle aktive edildiğinde glikoz hassasiyeti oluşmamıştır.

MCH nöronlarının kemogenetik inhibisyonu, lezyon ve ablasyon çalışmalarıyla uyumlu sonuçlar ortaya koymuştur. Gündüz ve gece döngülerinde bu nöronların inhibisyonu, besin tüketiminde azalmaya sebebiyet verdiği gözlenmiştir. İnhibisyon grubu, gece ve gündüz döngülerinde manipülasyon yapılmayan günler ve kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır.

Glikoz ve insülin tolerans testleri, MCH nöronlarının inhibe edildiği durumlarda daha farklı sonuçlar vermiştir. MCH nöronları kemogenetik yöntemlerle akut olarak inhibe edildiğinde, glikoz ve insülin tolerans testleri sonucunda insülin hassasiyeti gözlenmiştir.

Akut inhibisyonun yanı sıra, MCH nöronlarının sinaptik salınımının engellendiği durum da incelenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda, sinaptik salınımı engellenen Pmch-cre transgenik farelerin, kontrol grubu farelerine göre besin tüketimi ve vücut ağırlığının önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir.

9. KAYNAKLAR

1. Dietrich MO, Horvath TL. Limitations in anti-obesity drug development: the critical role of hunger-promoting neurons. *Nat Rev Drug Discov.* 2012;11(9):675-91.
2. Bassareo V, Di Chiara G. Differential responsiveness of dopamine transmission to food-stimuli in nucleus accumbens shell/core compartments. *Neuroscience.* 1999;89(3):637-41.
3. Anand BK, Brobeck JR. Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1951;77(2):323-4.
4. Delgado JM, Anand BK. Increase of food intake induced by electrical stimulation of the lateral hypothalamus. *Am J Physiol.* 1953;172(1):162-8.
5. Bernardis LL, Bellinger LL. The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behavior. *Neurosci Biobehav Rev.* 1996;20(2):189-287.
6. World Health Organization. Obesity : preventing and managing the global epidemic : report of a WHO consultation. Geneva: World Health Organization; 2016. xii, 253 p. p.
7. Türkiye Sağlık Araştırması, Türkiye İstatistik Kurumu 2015;18854.
8. Ioannides-Demos LL, Piccenna L, McNeil JJ. Pharmacotherapies for obesity: past, current, and future therapies. *J Obes.* 2011;2011:179674.
9. Meredith GE, Pennartz CM, Groenewegen HJ. The cellular framework for chemical signalling in the nucleus accumbens. *Prog Brain Res.* 1993;99:3-24.
10. Dong HW. Allen reference atlas : a digital color brain atlas of the C57Black/6J male mouse. Hoboken, N.J.: Wiley; 2008. ix, 366 p. p.
11. Paxinos G, Franklin KBJ, Franklin KBJ. The mouse brain in stereotaxic coordinates. 2001; 2nd ed. San Diego: Academic Press.
12. Hori Y, Fujita A, Koike K, Hirose K. Comparison of inhibitory effects of substituted benzamides and classical neuroleptics on operant behavior in rats and squirrel monkeys. *Eur J Pharmacol.* 1983;88(1):37-46.
13. Robbins TW, Cador M, Taylor JR, Everitt BJ. Limbic-striatal interactions in reward-related processes. *Neurosci Biobehav Rev.* 1989;13(2-3):155-62.
14. Hajnal A, Smith GP, Norgren R. Oral sucrose stimulation increases accumbens dopamine in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;286(1):R31-7.

15. Russo SJ, Nestler EJ. The brain reward circuitry in mood disorders. *Nat Rev Neurosci.* 2013;14(9):609-25.
16. Hofman MA, Swaab DF. The human hypothalamus: comparative morphometry and photoperiodic influences. *Prog Brain Res.* 1992;93:133-47; discussion 48-9.
17. 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.
18. 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.
19. Harthoorn LF, Sane A, Nethe M, Van Heerikhuizen JJ. Multi-transcriptional profiling of melanin-concentrating hormone and orexin-containing neurons. *Cell Mol Neurobiol.* 2005;25(8):1209-23.
20. Karnani MM, Szabo G, Erdelyi F, Burdakov D. Lateral hypothalamic GAD65 neurons are spontaneously firing and distinct from orexin- and melanin-concentrating hormone neurons. *J Physiol.* 2013;591(4):933-53.
21. Stuber GD, Wise RA. Lateral hypothalamic circuits for feeding and reward. *Nat Neurosci.* 2016;19(2):198-205.
22. Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, Piper M, Pellemounter MA, Cullen MJ, et al. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature.* 1996;380(6571):243-7.
23. Ludwig DS, Tritos NA, Mastaitis JW, Kulkarni R, Kokkotou E, Elmquist J, et al. Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2001;107(3):379-86.
24. 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.
25. 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.
26. Domingos AI, Sordillo A, Dietrich MO, Liu ZW, Tellez LA, Vaynshteyn J, et al. Hypothalamic melanin concentrating hormone neurons communicate the nutrient value of sugar. *Elife.* 2013;2:e01462.

27. Sternson SM, Atasoy D, Betley JN, Henry FE, Xu S. An Emerging Technology Framework for the Neurobiology of Appetite. *Cell Metab.* 2016;23(2):234-53.
28. Atasoy D, Aponte Y, Su HH, Sternson SM. A FLEX switch targets Channelrhodopsin-2 to multiple cell types for imaging and long-range circuit mapping. *J Neurosci.* 2008;28(28):7025-30.
29. Mayer J, Thomas DW. Regulation of food intake and obesity. *Science.* 1967;156(3773):328-37.
30. Behary P, Miras AD. Brain responses to food and weight loss. *Exp Physiol.* 2014;99(9):1121-7.
31. Murray S, Tulloch A, Gold MS, Avena NM. Hormonal and neural mechanisms of food reward, eating behaviour and obesity. *Nat Rev Endocrinol.* 2014;10(9):540-52.
32. Bell FR. Hypothalamic control of food intake. *Proc Nutr Soc.* 1971;30(2):103-9.
33. Alon T, Friedman JM. Late-onset leanness in mice with targeted ablation of melanin concentrating hormone neurons. *J Neurosci.* 2006;26(2):389-97.

10. ETİK KURUL ONAYI



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ,
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (İMÜ-HADYEK)
ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
04/09/2014	43		Deniz ATASOY

"Hedonik obezitenin sinir bilimsel kökenleri" başlıklı bilimsel araştırma Etik Kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna "oybirliği" ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 36 ay

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Başkan Yardımcısı	Prof. Dr. Dr. Ertuğrul KILIÇ	
Üye	Doç. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	
Üye	Yrd. Doç. Dr. H. Emir YÜZBAŞIOĞLU	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Sine Özmen TOĞAY	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Mehmet Yalçın GÜNAL	
Üye	Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Ekrem Musa ÖZDEMİR	

11. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Pelin	Soyadı	Dilsiz
------------	-------	---------------	--------

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji Ve Genetik	2009
Lise	Ankara Üniversitesi Geliştirme Vakfı Özel Lisesi	2004

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl – Yıl)
Araştırma Görevlisi	New York Üniversitesi Nöroloji	2010-2014

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

	Sayısal	Eşit ağırlık	Sözel
ALES Puanı	85,87	70,91	85,24
TOEFL IBT Puanı	98		