

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AÇLIK KURAMINA YENİ BİR BAKIŞ:
ARKUAT ÇEKİRDEĞİN OPTOGENETİK OLARAK UYARILMASININ
KOGNİTİF DAVRANIŞ ÜZERİNE ETKİSİ**

Muhammed İkbâl ALP

DOKTORA TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman:
Prof. Dr. Abdülkerim Kasım BALTACI
Yrd. Doç. Dr. Deniz ATASOY

KONYA-2017

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AÇLIK KURAMINA YENİ BİR BAKIŞ:
ARKUAT ÇEKİRDEĞİN OPTOGENETİK OLARAK UYARILMASININ
KOGNİTİF DAVRANIŞ ÜZERİNE ETKİSİ**

Muhammed İkbal ALP

DOKTORA TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman:
Prof. Dr. Abdulkerim Kasım BALTACI
Yrd. Doç. Dr. Deniz ATASOY

KONYA-2017

ONAY SAYFASI

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Muhammed İkbal ALP tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Fiziyojji Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı (Danışman): Prof. Dr. Abdülkerim Kasım BALTACI
Selçuk Üniversitesi

İmza 

Üye: Prof. Dr. Nilsel OKUDAN
Selçuk Üniversitesi

İmza 

Üye: Prof. Dr. Ender ERDOĞAN
Selçuk Üniversitesi

İmza 

Üye: Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK
Medipol Üniversitesi

İmza 

Üye: Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ
Medipol Üniversitesi

İmza 

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmenliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ender ERDOĞAN
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Fizyolojiyi bana sevdiren, bu alanda kendimi geliştirmemde desteklerini her zaman yanımda hissettiğim Prof. Dr. Abdulkerim Kasım Baltacı şahsında tüm Selçuk Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı ailesine,

Yol göstericilikleri için Yrd. Doç. Dr. Enver Ahmet Demir ve Yrd. Doç. Dr. Mehmet Öz'e

Tez çalışmamda sağladığı imkan ve destekler için Prof. Dr. Gürkan Öztürk'e ve İstanbul Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Restoratif Araştırma Merkezi (REMER) çalışanlarına,

Sabırları tükenmeyen destekleri ve en önemlisi bana tanınmış oldukları bu şans için teşekkürden daha fazlasını borçlu olduğum ikinci danışmanım Yrd. Doç. Dr. Deniz Atasoy'a ve Dr. Nilüfer Sayar Atasoy'a,

Bu çalışmanın her adımında emeği olan ve maddi manevi çok şey borçlu olduğum Öykü Dinçkol, Özlem Mutlu, Pelin Dilsiz, başta olmak üzere ekibimizin kıymetli üyeleri Fulya Köksalar, Merve Öncül, İlknur Çoban, Özge Başer, Can Kiren ve Utku Soğukpınar'a,

Destek ve yardımları için Hatice Kübra Işıldar, Esra Ekmekçioğlu, Fazlı Kemal Bayat, Dr. Mehmet şerif Aydın, Emre Vatandaşlar'a,

Koşulsuz desteklerinin ve inançlarının bitip tükenmeyeceğini bildiğim, en büyük dayanaklarım annem Sema ve babam Faruk Alp'e

Uzun deneyler ve çalışmalar boyunca sabırla desteklerini eksik etmeyen muhterem eşim Dr. Hamide Alp ve kızlarım şifa ve Hüma Sultana teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER	Sayfa
SİMGELER ve KISALTMALAR	vi
ÖZET	viii
1. GİRİŞ	1
1.1 Açlık Kuramları	2
1.2 Gıda Alımının Kontrolünde Sinirsel Devreler	4
1.3 Açlık Uygulamaları	11
1.4. Nörostimülasyon ve Optogenetik	13
2. GEREÇ ve YÖNTEM	21
2.1 Gereç	21
2.2 Yöntem	24
2.2.1 Denekler	25
2.2.2 Genotipleme	25
2.2.3 Rekombinant Adeno-asosiyе Virüs Üretimi	28
2.2.4 İntrakraniyal Enjeksiyon	30
2.2.5 Fiber Fotometre ve Lazer Kaynağı	33
2.2.6 Davranış Testleri	34
2.2.7 Mikroskopik Görüntüleme	36
2.2.8 İstatistiksel Analizler	37
3. BULGULAR	38
3.1 Genotipleme	38
3.2 Yeme Davranışı	38
3.3 Spatial (Mekansal) Öğrenme ve Bellek Davranışı	39
3.3.1 Platforma Ulaşmak İçin Geçen Zaman	39
3.3.2 Ölçüm Günü Katedilen Mesafe	40
3.3.3 Ölçüm Günü Hedef Kadrandaki Geçirilen Süre	40
3.4 İleri Mikroskopik Görüntüleme	41
4. TARTIŞMA	42
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	46
6. KAYNAKLAR	47
7. EKLER	
EK A: Etik Kurul Kararı	
8. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELELER ve KISALTMALAR

A/P: Anterior/Posterior

AAV: Adeno-Asosiye Virüs

AgRP: Agouti-related Peptide

Cre: Causes of Recombination

ChR2: Kanalorodopsin

D/V: Dorsal/V entral

DREADD: Dizayn Edilmiş İlaçları Aktive Eden Dizayn Edilmiş Reseptörler

ddH₂O: Arıtılmış su

EDTA: Etilendiamintetraasetik asit

EtOH: Etil Alkol

FLEX: Flip-Excision

GFP: Yeşil Floresan Protein

H₂O: Su

HCl: Hidroklorik Asit

KCl: Potasyum Klorür

LB: Lysogeny broth

LHA: Lateral Hipotalamik Alan

Lox: Locus of Crossing

M/L: Medial/Lateral

MCH: Melanin Konsantre Eden Hormon

MgCl₂: Magnezyum Klorür

NAC: Nucleus Arcuatus

NaCl: Sodyum Klorür

NaOH: Sodyum Hidroksit

PBS: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PFA: Paraformaldehit

POMC: Pro-opiomelanokortin

rAAV: Rekombinant Adeno-Asosiy Virüs

TAE: Tris-Asetat-EDTA

i.p.: Intraperitoneal

aCSF: Yapay Beyin Omurilik Sıvısı

NaHCO₃: Sodyum Bikarbonat

NaHPO₄: Sodyum Fosfat

ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Açlık Kuramına Yeni Bir Bakış:
Arkuat Çekirdeğin Optogenetik Olarak Uyarılmasının
Kognitif Davranış Üzerine Etkisi**

Muhammed İkbal ALP
Fizyoloji (Tıp) Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2017

Açlığın ileri beyin fonksiyonları üzerine olan etkisini konu alan çalışmalar açlığın kognitif fonksiyonları geliştirici etkisini göstermektedir. Bu çalışmada açlığın ileri kognitif fonksiyonlara olan katkı mekanizması hücresel düzeyde incelenmiştir. Bu amaçla açlık - tokluk ve besin alımında önemli bir merkez olan hipotalamusun arkuat çekirdeğindeki AgRP nöronları optogenetik metotla uyarılarak öğrenme bellek üzerine davranışsal etkileri kayıt altına alınmıştır.

AgRP'ere transgenik denekler ağırlık ortalamaları eşit olacak şekilde Kontrol (n=12), Açlık (n=12) ve Optogenetik Uyarı (n=12) olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Optogenetik Uyarı grubuna intrakraniyal enjeksiyon tekniği ile rAAV – ChR2 virüsü enjekte edilmiş ve AgRP hücreleri ışığa duyarlı protein kanallar içeren denekler elde edilmiştir. Bu deneklere yerleştirilen fiberoptik kanül ile yapay olarak aç hissetmeleri sağlanmıştır. Kontrol ve açlık grubuna ise rAAV – GFP virüsü enjekte edilmiştir. Optogenetik Uyarı grubu ve Kontrol grubuna serbest beslenme rejimi uygulanmış, Açlık grubuna ise 18 saatlik açlık uygulaması yapılmıştır. Gruplar Morris su labirentinde öğrenme kapasiteleri ve hafıza performansları açısından karşılaştırılmıştır.

Optogenetik Uyarı grubunun platforma ulaşma zamanının Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı gözlemlenmiş AgRP hücrelerinin spesifik uyarılmasının öğrenme kapasitesini geliştirdiği ortaya konulmuştur. Ayrıca ölçüm gününde hedef kadrandan geçirilen sürenin kontrol grubuna göre anlamlı artmış olması AgRP aktivasyonunun hafıza performansını iyileştirici etkisini göstermiştir.

Anahtar Sözcükler: AgRP, Bellek, Optogenetik, Öğrenme

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELCUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

A NEW PERSPECTIVE ON FASTING THEORY: THE EFFECT OF OPTOGENETICALLY INDUCED ARCUATE NUCLEUS ON COGNITIVE BEHAVIOR

Muhammed İkbâl ALP
Department of Physiology (Medicine)

DOCTORATE THESIS / KONYA-2017

Recent studies show that fasting has positive effects on cognitive behavior. In this study we aim to understand the cellular circuits and mechanism under effects of fasting on cognition. We optogenetically stimulate targeted AgRP neurons in arcuate nucleus of hypothalamus that is important for feeding behavior and metabolism. And we record the effects on behavioral tests.

We share AgRP^{cre} transgenic mice into 3 different groups, Control (n=12), Starvation (n=12) and Optogenetic Stimulation (n=12). We use intracranial infusion technique for taking rAAV into the arcuate nucleus of hypothalamus to have AgRP specific light dependent activation. And we make the mice hungry by stimulating with a fiberoptic canula. We injected rAAV – GFP virus into Control and Starvation groups. Optogenetic Stimulation and Control groups have ad libitum feeding diet and the Starvation group has 18 hour starvation. We compare these groups learning and memory performance by using Morris water maze task.

We found that the Optogenetic Stimulation group has statistically mean better latency performance to hidden platform than Control group. And we show that in probe day Optogenetic Stimulation group had longer time in target quadrant. It means specific stimulation of AgRP neurons improves learning capacity and memory performance.

Key Words: AgRP, Learning, Memory, Optogenetic

1. GİRİŞ

Açlık ve tokluğun besin alımını nasıl düzenlediği konusunda bir çok fizyolojik model ortaya konulmuştur. Bu çalışmalar, besin alımını düzenleyen ana merkezin hipotalamusta yerleşmiş bir grup sinir hücresi olduğunu göstermektedir. Ancak, bu hücre toplulukları çok farklı beyin bölgeleriyle anatomik ve fizyolojik yoğun bağlantılar halindedir ve bu bağlantıların fizyolojik anlamı çok iyi aydınlatılamamıştır.

Uzun yıllar, gerek hayvan çalışmalarında gerekse insan çalışmalarında çeşitli açlık uygulamalarının metabolik hastalıklardan kansere, nörolojik hastalıklardan genel sağlık durumuna etkilerini araştıran bir çok çalışma yapılmıştır. Ancak bu çalışmalar, genellikle deneklere belli bir diyet rejimini uygulayarak ortaya çıkan metabolik değişiklikleri kayıt altına almaktan ibaret olup, açlığın vücutta ortaya koyduğu etkilerin hangi sinirsel devrelerle ya da fizyolojik yollarla gerçekleştirildiği bilinmemektedir. Bu çalışmaların bazılarında açlığın kognitif performansı geliştirici etkisi tanımlanmış olmasına karşın, bu etkinin de nasıl gerçekleştiği tam olarak anlaşılammıştır. Bu belirsizliğin temel sebeplerinden biri; açlıkla ortaya çıkan etkilerin kompleks düzenleme mekanizmalarının bir sonucu olması ve bu çalışmaların yapıldığı yıllarda, bu süreçleri spesifik olarak analiz edebilecek deneysel araçların henüz mevcut olmamasıdır.

Son yıllarda yeni geliştirilen bir nörostimülasyon tekniği olan optogenetik klasik nörostimülasyon tekniklerinden daha üstün olarak sinir sistemindeki belirli hücre gruplarının spesifik stimülasyonunu mümkün kılan bir metottur. İlk uygulamaya başlandığı günden günümüze farklı sinir hücresi gruplarının fizyolojik görevi konusunda yapılan çalışmalarda giderek artan bir kullanım alanı bulmuştur. Bu teknik sayesinde belli bir sinir hücresi grubunun bir sinir döngüsünde nasıl bir etki oluşturduğu tespit edilebilmektedir.

Yapılan diyet çalışmaları, farklı açlık uygulamalarının başta obezite, diyabet, hipertansiyon gibi toplumda ciddi bir nüfusu ilgilendiren hastalıklar olmak üzere, Alzheimer ve Parkinson gibi hastalıklarda da potansiyel bir tedavi olduğu düşündürmektedir. Açlık uygulamalarının vücuttaki etkilerini hangi sinirsel ağlar

üzerinden nasıl gerçekleştirdiğinin anlaşılması, hastalıkların tedavisinde bir çok potansiyel hedefin belirlenmesini sağlayabilir. Bu çalışma, daha önce yapılmış çalışmalarda açlık uygulamalarının öğrenme ve bellek performansını geliştirdiğine dair bulguların fizyolojik arka planını anlamayı amaçlamaktadır.

1.1. Açlık Kuramları

Geçtiğimiz yüzyılda açlığın fizyolojik anlamı ve besin alımına olan etkisini tartışan farklı modeller ortaya konulmuştur. Albrecht von Haller, Johannes Müller ve Ernst Heinrich Weber gibi bazı erken dönem teorisyenler gıda alımının kontrolünde başta mide olmak üzere sindirim sistemi organlardaki duyarlı mekanizmaların etkili olduğunu savunan “periferik düzenleme kuramı”nın temellerini atmışlardır (Carlson 1916). Besin alımının nasıl düzenlendiği üzerine düşünen bu bilim insanları açlık esnasında mide ve barsaklarda meydana gelen kasılmaların besin alımına teşvik eden esas faktör olduğuna inanmaktaydılar. Uzun bir süre bu periferik düzenleme teorisi geçerliliğini korumuştur. 18. yüzyılın ikinci yarısına gelindiğinde dahi bir çok bilim insanı besin alımının düzenlenmesinde mide ve barsakların merkezi bir rol üstlendiğini düşünüyorlardı. Walter Cannon gibi fizyologların kandaki glukoz düşüşünün mide dokusunda kontraksiyonlara sebep olduğunu gösterdiği çalışmaları da bu teoriyi destekler mahiyetteydi (Cannon ve Washburn, 1993).

Bununla beraber; Magendi, Tidewald ve Milne-Edwards gibi bir grup araştırmacı besin alımını düzenlenmesinden sorumlu esas unsurların merkezi sinir sisteminde yerleştiğini gösteren çalışmalarıyla “merkezi düzenleme teorisi”ni ortaya attılar. İlk total gastrektomi operasyonunu gerçekleştiren ünlü cerrah Charles Sherrington midenin bütün sinirsel unsurları ile birlikte çıkarıldığı operasyonlardan sonra açlık ve tokluk hissinin devam ettiğini ve besin alımı düzeninin değişmediğini gözlemlemiştir. Benzer şekilde Wangensteen ve Carlson’ın total gastrektomi yapılmış hastalarda açlık hissini değerlendirdikleri çalışmaları da beslenme davranışında ciddi bir değişiklik olmadığını göstermiştir (Wangensteen, 1931). Bu bulgular periferik düzenleme teorisi üzerinde şüphelerin oluşmasına sebep olmuştur. Bununla birlikte, yine aynı dönemde yapılan hipotalamus tümörü bulunan adiposogenital sendromlu bir grup klinik vaka örneği (Elmqvist ve ark., 1999),

deneysel olarak uygulanan lezyon çalışmaları (Lytle ve Campbell 1975, Beninger, Jhamandas ve ark., 1986, Gropp ve ark., 2005) ve hipotalamusa enjekte edilen bir takım kimyasalların etkilerini tartışan çalışmalar (Clark ve ark., 1984) özellikle hipotalamusun besin alımında önemini tesbit etmiş ve merkezi düzenleme teorisini güçlendirmiştir (Woods ve ark., 1998, Marsh ve ark., 1998). 19. yüzyılın ortalarına gelindiğinde hipotalamusta yerleşmiş glukoz duyarlı bir bölgenin açlık ve tokluğun düzenlenmesinde belirleyici olduğunu gösteren çalışmalar ile merkezi açlık kuramı besin alımın regülasyonunda esas mekanizma olarak kabul edilmeyi başardı (Mayer 1953).

Roux ve Michel Foster gibi başka bazı yazarlar merkezi ya da periferik bütün vücut hücrelerini kapsayan bir genel duyarlılık durumunun besin alımını düzenlediğini öngören genel duyarlılık tezini savunmaktaydılar. Bu hipotezle ilgili erken bulgular yağ dokusunun besin alımının düzenlenmesinde etkin bir rol üstlendiğini öne süren adipostatik model çalışmalarıdır (Kennedy, 1953). Deneysel olarak obezleştirilmiş bir fare ile normal bir farenin kan dolaşımının birleştirilerek obez farenin kan değişkenlerinin normal farede oluşturduğu etkileri inceleyen parabiyozis deneyleri de adiposit dokuların besin alımında baskın bir etkisi olduğunu göstermiştir (Hervey, 1959). Günümüzde büyük oranda geçerliliğini korumakta olan merkezi düzenleme teorisi güncel bilgilerin ışığında bazı modifikasyonlara uğrayarak genel duyarlılık teorisini destekler mahiyette bulgular ortaya çıkmaktadır. Önceleri glukostatik düzenleme kuramına göre başta glukoz olmak üzere kandaki temel besin parçalarına duyarlı olduğu gösterilen hipotalamustaki bu merkezin aslında temel güdüleyici mekanizmasının mideden salınan bir hormon olan Ghrelin olduğu sonraki araştırmalarda anlaşılmıştır (Gao ve Horvath, 2007) ve temel düzenleyici sistemin her ne kadar merkezi yerleşimli olduğu kabul edilsede periferik unsurlarla ilişki içinde çalıştığı gösterilmiştir (Cowley ve ark., 2003). Yine sadece açlığın değil tokluk duygusunun da hipotalamustaki bu merkez tarafından yönetildiği ve bu merkezin de adipositlerden salınan leptin hormonu ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Cowley ve ark., 2001). Beslenmeyi düzenleyen sistemleri açıklığa kavuşturmak için çalışmalar devam ederken açlık durumu ve dolayısı ile yeme davranışı doğuran ya da tokluk durumuna yol açan çeşitli endojen kimyasalların bu sistemle olan ilişkisi intratekal ve intrakraniyal kimyasal uygulamalar yoluyla ortaya konulmaya başlanmıştır (Haynes ve ark., 1999, Della-Zuana ve ark., 2002). Böylece besin

alımını artıran ve besin alımını azaltan biyokimyasalların genişçe bir listesi ortaya çıkarılmıştır. Özetle günümüz fizyologlarının besin alımın düzenlenmesinde ortaya koydukları son bulgular merkezi açlık kuramının esas rol üstlendiği ancak periferik unsurlarında yok sayılmadığı modifiye edilmiş bir genel duyarlılık modeli olarak düşünülebilir.

Hipotalamusun arkuat çekirdeğinde yerleşmiş olan iki sinir hücresi topluluğunun açlık ve tokluğun dolayısı ile besin alımının yönetiminden birincil sorumlu olduğu bilinmektedir (Aponte ve ark., 2011). Yakın zamanda gelişen teknik ve teknolojilerle ortaya konulan yeni bulgular fizyolojinin temel sorularından biri olan besin alımın nasıl düzenlendiği sorusunun aslında o kadar da basit bir cevabının olmadığını ortaya koyar niteliktedir. Örneğin son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar hipotalamusun arkuat çekirdeğinde açlık hissini oluşmasından sorumlu olan AgRP hücrelerinin yiyeceğin kokusu ya da görüntüsü ile bile saniyeler içinde inhibe olduğunu, dolayısı ile zihindeki kognitif ve bilişsel süreçlerin de besin alımının düzenlenmesinde etkili olduğunu göstermektedir (Chen ve Knight 2016, Betley ve ark., 2015, Chen ve ark., 2015, Mandelblat-Cerf ve ark., 2015). Yine bazı çalışmalar açlık ve tokluk hissini sadece besin alımını değil, bu süreçte ortaya çıkan besin alımı ile ilgili davranışsal değişiklikleri de regüle ettiğini ortaya koymuştur (Krashes ve ark., 2011, Atasoy ve ark., 2012). Açlık ve tokluğun yönetiminden sorumlu olan bu küçük merkezlerin beyinin farklı bölgelerinde gösterdiği anatomik ve fonksiyonel projeksiyon hayret vericidir. Klasik açlık kuramları ise bu yeni bulguları açıklamakta yetersiz kalmaktadır ve yeni bir açlık kuramına ihtiyaç vardır.

1.2 Gıda Alımının Kontrolünde Sinirsel Devreler

Vücudumuzda canlılığın ideal koşullarda devam ettirilebilmesi için korunması gereken bir iç denge vardır. Bu iç denge fizyolojik süreçlerin temel maksadını oluştururken mutlak bir değerden ziyade üst ve alt sınırları olan dinamik bir denge halini ifade eder. İç dengeyi oluşturan herhangi bir unsurun şu ya da bu şekilde normal sınırların dışına çıkması bir çok sistemde çok yönlü etkiler ortaya çıkarak kompleks patolojik süreçlerin doğmasına sebebiyet vermektedir. Vücut ağırlığının normal sınırlar içinde kalması gibi vücuda ihtiyacı olan enerjiyi

sürdürülebilir bir şekilde temin etmek de bu denge halinin önemli unsurlarından biridir ve çok güçlü fizyolojik kontrol mekanizmalar ile güvence altına alınmıştır. Vücut ağırlığının dengelenmesinde ve vücuda hayatîyetin devamı için gerekli enerji kaynaklarının temininde temel formül tüketilen besin miktarına karşın vücudun sarfettiği enerjinin denge içinde olmasıdır. Bu denge durumunu açacak şekilde besin alımının azalması ya da sarfiyatın artması sonucu ortaya çıkan negatif enerji bilançosu vücut ağırlığında azalmaya sebep olurken tersi bir durumda vücut ağırlığının artması söz konusudur.

Besin alımın düzenlenmesi üzerine yapılan bir çok çalışma besin alımı ve enerji metabolizmasında belirleyici unsurların hipotalamusta yerleşmiş bulunan açlık ve tokluk merkezi olduğunu işaret etmektedir (Sohn, 2015). Hipotalamus beyinde teşkil ettiği alana oranla en kompleks ve yoğun sinirsel ağların bulunduğu oldukça konsantre bir bölgedir. Temel vasfı, beslenme ve enerji metabolizmanın düzenlenmesinden sıvı yönetimi ve iyon dengesine, vücut ısısının düzenlenmesinden üreme fonksiyonlarına, uyku uyanıklılık döngüsünden çevresel adaptasyona kadar yaşamın devamlılığı için gerekli temel fonksiyonları yönetmesidir.

Hipotalamus bu fonksiyonların yönetimi için özelleşmiş birbiri ile ilişki içinde bir sinirsel ağ oluşturan farklı sinir hücreleri toplulukları barındıran çekirdeklerden oluşmuştur. Hipotalamusun lateral çekirdekleri açlık merkezi olarak görev yapar. Bu alanın uyarılması deneklerin besin alımını uyarırken harabiyeti besine karşı isteksizliğe ve kilo kaybına sebebiyet verir (Anand ve Brobeck, 1951). Lateral hipotalamustaki uyarı deneğin motor besin arama davranışını artırarak çalışır. Ventromediyal hipotalamik çekirdek ise, tokluk merkezi olarak görev yapar. Bu merkezin lateral hipotalamusu baskılayarak beslenme davranışını azalttığına inanılmaktadır. VMH'nın elektriksel uyarılması ile yapılan çalışmalar deneklerde tokluk durumu yaratarak besin alımını azaltırken; haraplanması oburluğa ve aşırı şişmanlamaya sebep olmaktadır (Hetherington ve Ranson, 1983).

Bu iki merkezin dışında hipotalamusta bulunan paraventriküler, dorsomediyal ve arkuat çekirdeklerin de besin alımının düzenlenmesine katkı sağladığını gösteren çalışmalar vardır. Paraventriküler çekirdek lezyonları aşırı yemeye (Sims ve Lorden, 1986), dorsomediyal lezyonlar ise, besin alımında

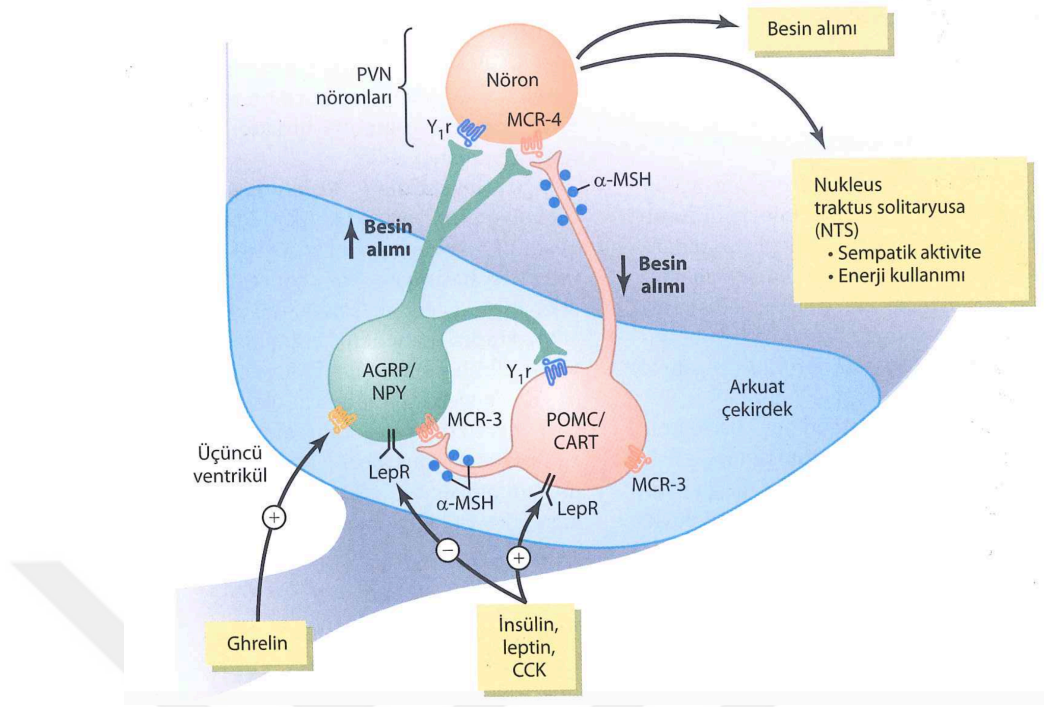
azalmaya sebep olur (Mieda ve ark., 2006). Beslenme ile ilişkili bu bölgeler arasında oldukça yoğun bir sinirsel bağlantı ağı bulunmaktadır. Farklı bölümler açlık ve tokluk durumunda bir arada etkileşim göstermektedir. Bu çekirdekler ayrıca tiroid bezi, adrenal bezler ve pankreasın adacık hücrelerinden salgılanan enerji ve metabolizmanın düzenlenmesinden sorumlu bir çok hormon ile de sıkı bir ilişki içerisinde (Sato ve ark., 2014).

Hipotalamusun alt unsurları arasında besin alımının düzenlemesi ile ilgili kilit mekanizma ise arkuat çekirdektir. Arkuat çekirdek sindirim sistemi ve yağ dokusundan salgılanan hormonlarla diğer açlık ve tokluk merkezleri arasında yer alan ve farklı etkilerin birleştiği bir bölgedir. Arkuat çekirdek bu birleştirici etkiyi beslenme ve enerji tüketimi üzerine baskın bir etkisi olan iki tip sinir hücresi sayesinde gerçekleştirmektedir (Cone 1999, Huszar ve ark., 1997). Bu iki hücre besin alımını azaltıp enerji tüketimini arttıran POMC (Pro-opiomelanokortin) hücreleri ile besin alımını artırıp enerji kullanımını kısıtladığı düşünülen AgRP (Agouti-related peptide) hücreleridir (Schwartz ve ark., 2000, Schwartz ve Porte 2005). Bu iki nöron grubu leptin, ghrelin ve insulin gibi periferik hormonal düzenleme mekanizmaların başlıca hedefi olarak, besin alımında merkezi bir rol üstlenirler (Schwartz ve ark., 1996, Schwartz ve ark., 1992). Mide boşken salgılanan ghrelin hormonu (Andralojc ve ark., 2009) hipotalamusun arkuat çekirdeğinde bulunan AgRP hücrelerinin uyarılarak AgRP ve NPY (Nöropeptit Y) salgılanmasını sağlamak sureti ile açlık hissinin doğmasını ve AgRP bağlantılı merkezi projeksiyon hücreleri üzerinden besin alımı ile ilgili işlevlerin başlatılmasını sağlamaktadır (Kojima ve ark., 1999, Kojima ve ark., 2001). Arkuat çekirdekte AgRP hücrelerine komşu bir başka sinir hücresi topluluğu olan POMC hücreleri ise, tokluk durumunda yağ hücrelerinden salgılanana leptin hormonuna duyarlıdır ve proopiomelanokortin (POMC)'den alfa MSH (melan stimülatin hormon), melanokortin salgılamak sureti ile tokluk hissinin doğmasına (Adan ve Gispen 1997, Lambert ve ark., 1998) ve AgRP hücreleri inhibe ederek merkezi projeksiyon nöronları üzerinden besin alımının kesilmesine sebep olmaktadır (Gropp ve ark., 2005, Luquet ve ark., 2005, Krashes ve ark., 2011).

AgRP ve NPY'nin intrakraniyal enjeksiyonu yeme davranışını aşırı şekilde artırırken (Woods ve ark., 1998, Ollmann ve ark., 1997, Pierroz ve ark., 1996) AgRP ya da NPY genlerinde meydana getirilen bir mutasyon, yeme davranışında ciddi bir

değişiklik yapmamaktadır (Qian ve ark., 2002, Chen ve ark., 2004, Erickson ve ark., 1996). Bununla birlikte, spesifik hücreleri difteri toksini ile yok etmeye dayalı bir metot (Saito ve ark., 2001) kullanılarak AgRP hücreleri özgün olarak yok edildiğinde yeme davranışının ciddi şekilde azaldığını ve kilo kaybının ortaya çıktığını gösteren çalışmalar vardır (Luquet ve ark., 2005). Tükürük salgılama, yalanma, çiğneme gibi beslenmenin mekanik fazı hipotalamusun altında beyin sapı tarafından idare edilirken (Ahima ve ark., 2000), hipotalamusun üzerinde kalan amigdala ve prefrontal korteks gibi yapılar özellikle iştahın kontrolünden sorumludur (Lenard ve Berthoud 2008).

Bununla birlikte, POMC nöronlarının salgıladığı alfa MSH paraventricüler çekirdeklerdeki melanokortin reseptörlerini etkiler (Cone ve ark., 1996). AgRP hücrelerinin aksine, POMC nöronlarında leptin, leptin reseptörleri, POMC ve MCR4 genlerinde mutasyon oluşturulduğunda obezite geliştiği gösterilmiştir (Zhang ve ark., 1994, Friedman ve Halaas 1998, Huszar ve ark., 1997, Hinney ve ark., 1999). POMC hücreleri difteri toksini ile öldürüldüğünde de yine aşırı yemeye bağlı obezite ve kortikosteroid sentezinde azalmaya bağlı hipokortikosterodemi görülmektedir (Gropp ve ark., 2005). Tespit edilmiş 5 MSH reseptöründen 3. ve 4. tiplerin özellikle besin alımı ve enerji kullanımının dengelenmesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bu reseptörlerin uyarılması enerji tüketimini önemli ölçüde artırırken, baskılanması besin alımını artırır ve enerji tüketimi baskılanır. Paraventricüler çekirdeğin enerji kullanımı üzerine olan etkilerinin traktus solitarius üzerinde sempatik aktivasyona katkı sağlaması ile olduğu düşünülmektedir. Hipotalamustaki melanokortin sistemi enerji kullanımı ile ilişkilidir. MSH-4 reseptörlerinin tek gen mutasyonunun aşırı şişmanlığa yol açtığı gösterilmiştir. Şiddetli enfeksiyonlar, tümörler ve üremiye bağlı iştahsızlıkta paraventricüler çekirdek suçlanmaktadır.



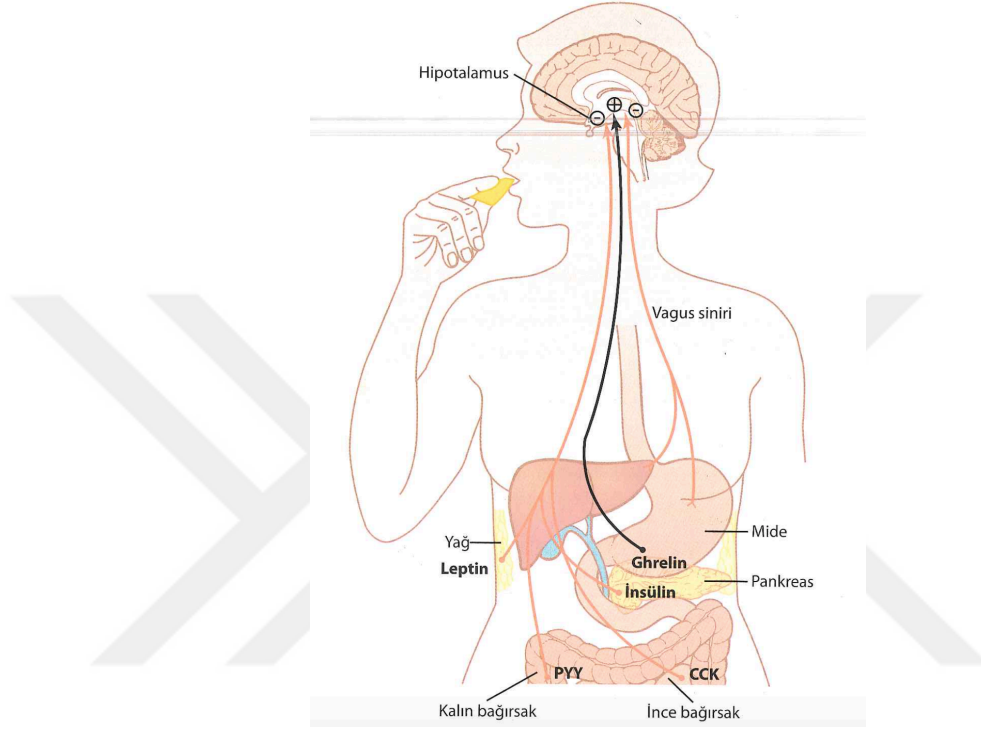
Şekil 1.1. Arkuat Çekirdeğin Çalışma Mekanizması (Hall ve Guyton, 2011).

Arkuat çekirdekte birbirinin alternatifi olarak fonksiyon gösteren iki sinir hücresi topluluğu vardır. AgRP hücreleri besin alımını artırmaya yönelik uyarıları başlatırken, POMC hücreleri besin alımını kesmeye yönelik gerekli merkezlerle ilişki içindedir.

Arkuat çekirdekte yerleşmiş olan bu AgRP ve POMC nöronları besin alımının yönetiminde baskın rol üstlense de bu merkezle bağlantılı olarak çalışan lateral hipotalamus (LH), ventromedial hipotalamus (VMH), paraventriküler nukleus (PVN), ve locus coreleus (LC) gibi merkezlerde kendilerine ait roller üstlenmektedir (Elmquist ve ark., 1999). Örneğin arkaut çekirdek ile sıkı bir ilişkisi gösterilen VMH'deki MCH ve oreksinerjik nöronlar uyku ve uyanıklık durumunun belirlenmesinden sorumludur ve besin alımı ve uyku arasındaki ilişkinin MCH üzerinden şekillendiği düşünülmektedir (Haynes ve ark., 1999).

Hipotalamustaki bu bölgeler ayrıca sindirim sisteminden gelen (midenin doluluk durumu gibi) duysal bilgiler, kanda tokluk hissi veren karbonhidrat, aminoasit ve yağ asitleri gibi besin maddeleri, ya da serebral korteks kaynaklı göre koku ve tat gibi sinyalleri alır. Bunun dışında NPY, AGRP, melanin konsantratin hormon (MCH), oreksin A ve B, endorfinler, Aminoasitler (GABA, glutamat), kotrizol, ghrelin, endokanaboidler gibi oreksinerjik maddelerin iştah artırıcı

etkilerine karşın alfa-MSH, leptin, serotonin, norepinefrin, kortikotropin salgılatıcı hormon (CRH), insulin, cholecystokinin (CCK), glucagon-like peptide (GLP), kokain ve amfetamin düzenleme transkripti (CART), YY peptidi (PYY) gibi iştah kapatıcı anoreksinerjik bir çok maddenin hipotalamus üzerinde etkisini gösterilmiştir.



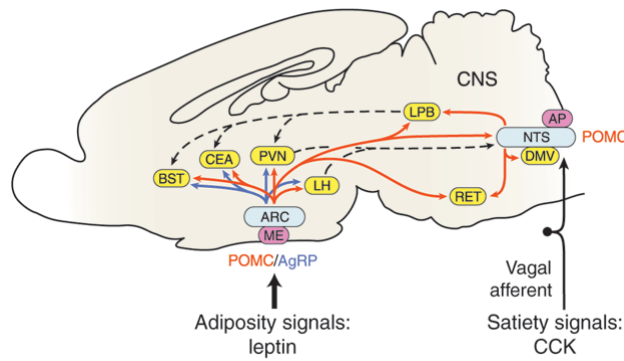
Şekil 1.2. Arkuat çekirdeğin periferik sistemle olan ilişkileri (Hall ve Guyton 2011).

Arkuat çekirdekte yerleşmiş ve beslenme davranışını regüle eden iki sinir hücresi topluluğundan besin alını artırmayı sağlayan AgRP hücreleri barsaktan salgılanan ghrelin adı verilen bir hormona duyarlı iken, POMC hücreleri yağ hücrelerinden salgılanan leptin isimli başka bir hormona duyarlıdır. Arkuat çekirdek bu sayede beslenme düzenlenmesini yaparken periferik merkezlerle de ilişki içinde çalışır.

Besin alımının düzenlenmesinden sorumlu olan bu merkezler besin içeriğine göre de bazı düzenlemelere gidebilmektedir. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada arkuat çekirdekte yer alan AgRP hücrelerinin, Lateral hipotalamustaki VGAT (veziküler GABA taşıyıcısı) nöronlarından farklı olarak sadece kalorik içeriği olan besinlerin alımını sağladığı, LH/Vgat hücrelerinin ise her türlü besin alımını artırdığı göstermiştir. Böylece AgRP hücrelerinin besin içeriğindeki kalorik değer konusunda bir çeşit değerlendirme yapabildiği ortaya konulmuştur (Burnett ve ark., 2016). Kan düzeyindeki glukoz, aminoasit ve yağ asidi değişimine göre besin alımının değiştiği glukostatik, aminostatik ve lipostatik teoriler tanımlanmıştır. Kan glukozundaki

artma, paraventricüler ve ventromedial çekirdeklerde glukozaya duyarlı sinir hücrelerinin ateşlenmesini artırırken, lateral hipotalamustaki duyarlı hücrelerin ateşlenmesini de azaltmaktadır. Benzer şekilde aminoasitler ya da yağ asitleri bu bölgedeki nöronların ateşlenme hızını etkiler. Bu üç besinden hangisi azalırsa hayvan o besini fazla yer ve sonunda kan metabolit yoğunlukları yerine döner. Besinler arasında doyurucu bakımından farklılıkların da besin içerikleriyle ilişkili olduğu görülmektedir (Gunion ve ark., 1990). Fare maymun, köpek ve insanlarda yapılan çalışmalar besin alımının glukostatik mekanizma ile olduğunu ortaya koymaktadır (Mayer ve ark., 1951, Mayer 1953, Mayer ve Bates, 1952).

Besin alımının yemek sonrası kısa süreli düzenlenmesinde mide - barsak duvar gerimini hipotalamusa bildiren vagus, duodenuma giren yağa yanıt olarak salınan ve safra kesesinin kasılması mide boşaltılması ve asit sekresyonunun yavaşlatılması gibi etkileriyle bilenen CCK'nın bölgesel duysal sinirleri uyararak hipotalamusa sinyal göndermesi, yanı sıra besin alımını müteakip 1-2 saat içinde kolondan salınan ve miktarı besin içeriğine göre değişiklik gösteren PYY'nin besin alımını azaltıcı etkisi gösterilmiştir. İlâveten ince barsakta besin bulunması, GLP salımına eşlik eden bir insulin salınımı ile besin alımını kısıtlayıcı bir etki ortaya çıkarır. Bunlara mukabil midenin oksintik hücreleri tarafından salgılanan ghrelin açlık düzeyine göre kanda yükselir ve besin alımından hemen önce pik yapması beslenmeyi uyarıcı bir etkisi olduğunu düşündürür.



Şekil 1.3. Arkuat Çekirdeğin Merkezi Projeksiyonları (Cone 2005).

Farklı beyin bölgeleri ile yaptığı geniş projeksiyon ağı dikkate alındığında arkuat çekirdeğin besin arayışından, tüketilen besinlerin sindirime hatta sindirim sonrası metabolizmasına kadar bütün bir besin alımı sürecini düzenleyen kompleks işlevlerin yönetildiği bir merkez olduğu anlaşılmaktadır.

1.3. Açlık Uygulamaları

Açlık uygulamaları 19. yüzyılın başından itibaren farklı diyet tiplerinin yaşam kalitesine, hastalıkların tedavisine ve uzun yaşama olan etkisini araştıran çalışmaları kapsar (Fernandes ve ark., 1976, McCay ve ark., 1989, Mattson 2000). Bu çalışmalarda genellikle deneklere farklı diyet rejimleri uygulamalarının, kilo alımı ve enerji metabolizmasının yanı sıra sağ kalıma ve yaşlanmaya etkileri değerlendirilmiştir (Weindruch ve ark., 1986, Sohal ve Weindruch 1996). Bu çalışmalarda temel olarak iki tip açlık uygulamasından bahsedebiliriz. Bu uygulamalardan bazılarında günlük besin alımının hesap edilerek alınan kalorinin kısıtlandığı (caloric restriction) rejimler uygulanırken (Anson ve ark., 2003), diğerlerinde günlük kalori alımı değiştirilmeden kahvaltısız diyet (no-breakfast) uygulaması gibi öğün sayısı ya da beslenme zamanları ile ilgili düzenlemeler yapılmış ya da gün aşırı açlık uygulaması (alternate day fasting), haftanın iki günü açlık uygulaması (intermittant fasting) gibi deneklere belli aralıklar ile farklı uzunlukta açlık uygulanmıştır (Goodrick ve ark., 1983).

Besin ve kilo alımı üzerine odaklanan bütün bu çalışmalar göstermiştir ki; beslenme fiziolojisi besin tüketimi miktarının düzenlenmesinin çok ötesinde oldukça kompleks bir süreci kapsamaktadır. Açlığın besin alımı dışındaki etkilerinin neler olduğu ve bunların nasıl bir fiziolojik süreçle ortaya çıktığı konusunda oldukça kısıtlı sayıda araştırma vardır. Zaman zaman yapılan çalışmalarda da farklı diyet uygulamalarının kognitif fonksiyonlar üzerine etkisi de tartışılmıştır. Açlığın yaşa bağlı olarak öğrenme ve bellekte meydana gelen zaafiyetleri giderici bir etkisi olduğunu gösteren çalışmalar yapılmıştır (Ingram ve ark., 1987). Ek olarak açlık grubunun kontrol grubu ile karşılaştırıldığında daha hızlı öğrendiği gösteriren bir takım bulguların yanısıra (Wu ve ark., 2002, Halagappa ve ark., 2007), bir insan çalışmasında da açlık uygulamalarının sözel hafızayı geliştirdiği vurgulanmıştır (Witte ve ark., 2009).

Açlık ve kognisyon arasındaki bu etkileşimin, hangi hücrel ve moleküler mekanizmalar üzerinden gerçekleştiği tam olarak bilinmemektedir. Bazı araştırmacılar uzun süreli açlık uygulamasının hipokampüsteki sinaptik plastisiteyi geliştirdiğini ve kognitif performanstaki artışın buna bağlı olabileceğini düşünürken

(Mladenovic Djordjevic ve ark., 2010), bir kısım çalışmalar açlığın beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) gibi nöroprotektif ajanların artışına yol açarak yeni nöron oluşumunu tetiklediğini öne sürmüştür (Lee ve ark., 2002). Hatta beyinlerindedeneysel iskemik hasar oluşturulan bir hayvan modelinde açlığın BDNF ve diğer nöroprotektif proteinleri yükselterek inflamasyon ve ölüm oranlarını düşürdüğü gösterilmiş, aynı çalışmada açlık uygulaması kognitif performansı da geliştirmiştir (Arumugam ve ark., 2010, Maswood ve ark., 2004). Bir başka çalışma keton cisimlerinin nöroprotektif etkisinden hareketle, açlık esnasında ortaya çıkan ketosis tablosunun kognitif gelişimde etkili olabileceğini öne sürmektedir (Thaler ve ark., 2010). Kısa süreli açlığın otofajiyi tetiklemek sureti ile dokuların tazelenmesine katkı sağladığını düşündüren bulgular da vardır (Alirezaei ve ark., 2010). Başka bir görüşe göre de açlık hipotalamusta stres proteini sentezine yol açarak olumlu etkiler göstermektedir (Aly ve ark., 1994), belki de oksitatif stres ve inflamasyonu engelleyen süreçler ön plandadır (Djuric ve ark., 1992).

Hangi fizyolojik mekanizma ile olduğu henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamış olsada açlığın kognitif fonksiyonlara olan geliştirici etkisi açıktır. Bu etkinin fizyolojik anlamı üzerine yoğunlaşan bazı araştırmacılar organizmanın çevresel koşulları hesaba katarak besin teminine yönelik farklı davranış kalıplarından hangisinin daha çok faydalı ve daha az zararlı olduğunu değerlendirmek için bu bağlantılara ihtiyaç duyduğunu düşünmektedir (Yapıcı ve ark., 2014). Bu görüşe göre organizmanın davranış kalıplarını oluştururken kullandığı temel ilkeler, besin arayışı ile ilgili farklı durumlara özgü farklı davranış şekillerinin ortaya çıkmasını sağlamak için kullanılmaktadır. Besin alımını düzenleyen merkezlerin sadece açlık ve tokluk mekanizmalarını aktive ederek motivasyon sağlamadığı, aynı zamanda besin arayışı ile ilişkili ya da beslenme dışı davranışsal etkilerinin de olduğu konusunda bazı bulgular elde edilmesiyle beraber, son yıllarda açlığın bu davranışsal etkilerine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Çok yakın zamanda açlığın kognitif ilişkileri üzerine yapılan birkaç çalışma, açlık ile anksiyete arasında bir hücresele bağlantı göstererek AgRP hücrelerinin uyarısının anksiyete davranışını azalttığını göstermiştir (Dietrich ve ark., 2015, Padilla ve ark., 2016).

Bütün bu çalışmalara rağmen, AgRP hücrelerinin beslenme davranışının düzenlenmesindeki kompleks etkileri yeterince aydınlatılamamıştır. Bunun sebebi,

açlık ve tokluğu düzenleyen merkezlerin çok farklı hücre gruplarını çok küçük bir alanda barındırması ve bu hücre gruplarının yeterince hasas bir şekilde uyarılamaması ya da inhibe edilemesidir. Üstelik bu merkezi çekirdekler beynin hemen heryeri ile yoğun bir ağ oluşturmaktadır. Bu da bu hücrelerin spesifik görevlerinin anlaşılmasını zorlaştırmıştır. Bununla birlikte özellikle son on yılda sinirbilim alanında yapılan çalışmaların hızlı artışı, yeni teknoloji ve tekniklerin sunduğu imkanlar çerçevesinde, bir çok alanda olduğu gibi besin alımının düzenlenme mekanizmaları ile ilgili şimdiye kadar ortaya atılan teorilerin yeniden ele alınarak incelenebilmesi imkanı doğmuştur.

Nörostimülasyon tekniklerindeki yeni gelişmeler ile sinir hücrelerinin alt gruplarını hedef alan spesifik manipülasyonlar mümkün hale gelmiş ve bugün artık optogenetik metodlar ile mevcut bir sinir ağındaki hücrelerin fizyolojik sürece net katkısının ne olduğu hücre hücre analiz edilebilmektedir. Böylece açlığın kompleks fizyolojisi çeşitli hücreleri aktive ve inhibe ederek daha iyi anlaşılabilir ve çeşitli hastalıkların tedavisinde yeni olanaklarına imkan sağlayabilecektir.

1.4. Nörostimülasyon ve Optogenetik

Karl Deisseroth 2006 yılında optik ve genetik teknikleri bir araya getirilerek gerçekleştirilen spesifik nörostimülasyon için “optogenetik” kavramını önermiştir (Deisseroth ve ark., 2006). Literatüre girmesinden birkaç yıl sonra optogenetik Nature dergisi tarafından “yılın metodu” seçilmiştir. Oldukça yeni bir metot olmasına rağmen bugün dünyada 800 üzerinde optogenetik çalışma merkezi bulunmaktadır ve her geçen gün bunlara yenileri eklenmektedir (Williams 2013).

İnsan beyninde farklı bölgelerin hangi fonksiyonlardan sorumlu olduğu hakkında bilgiler genelde belirli bir bölgenin hasarlanmasını takiben ortaya çıkan fonksiyon kayıplarının gözlenmesi ile elde edilmiştir. Bu tür klinik gözlemlerle elde edilen bilgilerin tarihi Edwin Smith Papürüsü'ne kadar uzanmaktadır (Breasted 1930). Modern sinirbilimin babası Penfield de bir beyin cerrahıdır. Bu çalışmalarda örneğin oksipital bölgesinden yaralanan birinde körlük gelişmesi bu bölgenin görme fonksiyonu ile ilişkili fonksiyonu olabileceğini düşündürmüştür. Yüzyılın başlarında

bu bilgiler toplanarak histolojik ve elektrofizyolojik yaklaşımla desteklenmiş ve farklı beyin bölgelerinin fonksiyonları hakkında haritalar yapılmıştır (Brodmann 2006). Daha sonraları hayvan çalışmalarında, beynin belli bölgelerinde kontrollü lezyonlar oluşturarak ortaya çıkan fonksiyon kayıpları incelenmek sureti ile, beyin bölgelerinin işlevleri konusunda daha ayrıntılı bilgiler edinilmeye çalışılmıştır. Bununla beraber söz konusu fonksiyonel alanlardaki iç döngülerin nasıl gerçekleştiği sorusu günümüzde de hala güncelliğini korumaktadır.

Bu fonksiyonel alanların iç döngülerinin fonksiyona katkısını anlamak sözkonusu olduğunda “nörostimülasyon” kavramı ortaya çıkmaktadır. Nörostimülasyon, bir sinir hücresinin yapay yöntemlerle uyarılması demektir. Tarihteki bilimsel araştırma kurallarına uygun ilk nörostimülasyon çalışması 18. yüzyılda İtalyan bilimadamı Luigi Galvani tarafından gerçekleştirilmiştir (Kipnis 1987).

Galvani'den sonra metal proplarla yürütülen nörostimülasyon çalışmaları daha sonra elektronik teknolojiler kullanılarak yapılmaya başlanmıştır. Ancak söz konusu geleneksel nörostimülasyon yöntemlerin birtakım kısıtlayıcıları vardır. Beyinde belirli bir alan bu yöntemlerle uyarıldığında o bölgedeki bütün hücrelerde yanıt oluşturulmaktadır. Belirli sinir hücre grupları spesifik olarak uyarılmadığında, iç döneal döngüde yürüttükleri fonksiyonun anlaşılmasını olanaksızdır. Buna ek olarak özellikle davranışın değerlendirilmesi gereken çalışmalarda invazif yöntemler kullanabilmek için deneğin hareketinin kısıtlanması hassas analiz imkanını ortadan kaldırmaktadır. Ayrıca sinir sistemi, anatomik açıdan uzak yerleşimli olmasına karşın tek bir fonksiyonu beraberce gerçekleştiren hücre gruplarıyla donatılmıştır; fakat geleneksel yöntemlerle farklı lokalizasyonlardaki bu hücrelerin eş zamanlı uyarılması mümkün olmamaktadır.

Özel bir nörostimülasyon yaklaşımı olarak “fotostimülasyon” kavramı ilk defa 2001 yılında yayımlanan bir makalede gündeme gelmiştir (Zemelman ve ark., 2001). Spesik nörostimülasyon kavramının ilk uygulamalı örneği olarak kabul edilen bu çalışma günümüzde kullanılan optogenetik araçlara nazaran oldukça ilkel olmakla beraber optogenetiğin bütün temel parametelerinin tarif edildiği bir çalışma olması açısından önemlidir. Fotostimülasyon hakkındaki ilk çalışmadan dört yıl sonra Lima

ve Miesenbock makalelerinde fotostimülasyon tekniği için ışığa duyarlı paket moleküller kullandıklarını ifade etmişlerdir. Transgenetik yolla aktarılmış iyon kanalları, ışıkla aktive olan paket moleküller tarafından uyarılarak aksiyon potansiyeli tetiklenebilmiştir. Bu sayede transfekte nöronların ışık ile spesifik biçimde uyarılarak kendilerine ait fonksiyonu icra etmeleri sağlanmıştır (Lima ve ark., 2005). Claridge- Chang ve ark. çalışmalarında optogenetiğin davranış ve öğrenme gibi bilişsel fonksiyonları yürüten nöronlarda da kullanılabileceğini kanıtlamıştır (Claridge-Chang 2009). Optogenetiğin hızlı yükselişinin sebebi yukarıda bahsettiğimiz nörostimülasyon çalışmalarında gördüğümüz üç kısıtlılığı da aşabilmiş olmasıdır. Optogenetik sayesinde sinirbilim alanında şimdiye kadar bilindiği kabul edilen hemen her konunun yeniden çalışılarak doğrulanabilme imkanı yöntemin önemini daha da artırmaktadır.

Optogenetik kontrol için öncelikle uyarılması hedeflenen hedef hücre tipi belirlenir. Belirlenen hedef hücrede aktif olup diğerlerinde olmayan bir gen tespit edilir ve ardından hedef hücrede oluşturulmak istenen etkiye göre kullanılması gereken ışığa duyarlı iyon kanalı (fototetik) seçilir. Doğada ışığa duyarlı iyon kanalları barındıran bir çok organizma vardır. Bu canlılarda fototetik proteinleri kodlayan genler izole edilerek çoğaltılır ve bir taşıyıcı vektöre yüklenerek belirlenen hedef hücrelere transfekte edilir. Böylece hücre yüzeylerinde ışığa duyarlı protein kanalları olan hedef hücreler oluşturulur (Boyden ve ark., 2011). Kullanılan fototetiklerin çeşitliliği ve etki mekanizması ile uygulanan ışığın frekansı gibi faktörler optogenetik modülasyonun çeşitliliğini sağlamaktadır.

Optogenetik çalışmalarda kullanılan transfeksiyon metodu opsinerin spesifik hücrelerde sentezine yönelik vektör ve promotör geliştirilmesi üzerinden kurgulanmıştır. Belirlenen bir opsine ait genin istenilen hedef dokuya transfeksiyonuna kadar süreç şu şekilde işler: Öncelikle hedeflenen genin izole edilmesi gerekir. Bu izolasyon işlemi için hedeflenen genin tespiti yapılmalıdır. Genetik mühendisliğinde anlamlı bir gen bulmak için kullanılan birkaç yöntem vardır. Birincisi “ters transkripsiyon” metodudur. Eğer bir proteini izole edebiliyorsak bu protein dizisini üretecek mRNA dizisini okuyabilir ve bu diziyi kodlamış olabilecek DNA bölgelerinin bir kümesini çıkarabiliriz. Tespit edilen genin izolasyonu için en sık kullanılan yöntem PCR’dir (polimeraz zincir reaksiyonu). Bu

teknikinin uygulanabilmesi için hedeflenen genin en azından bir kaç nükleik asitlik bölümü bilinmelidir. Böylece klonlanması amaçlanan genin translasyon ürünü olan mRNA izole edilir ve bu mRNA dan ters transkriptaz enzimi sayesinde cDNA üretilir. Daha sonra cDNA tamamlanarak izole gen elde edilir ve PCR ile çoğaltılır. Çoğaltılan genin vektöre aktarılması işlemi için “elektroporasyon” tekniği kullanılır. Bu teknikte izole edilip çoğaltılan genetik materyal hücre kültürü ortamına ekilir ve kültürdeki hücrelerin zarlarında geçici porlar oluşturularak genetik materyalin hücre içine alınması sağlanır (Potter 2011). Virüs aracılı gen aktarımı için belirlenen virüsler ortama ekilir. Böylece hedeflenen genleri taşıyan virüsler çoğaltılabilir (Howarth 2010). Gen taşıyıcısı olarak farklı virüsler kullanılmakla beraber optogenetik çalışmalarda genellikle Lentivirus ve Adeno Associated Virus (AAV) tercih edilmektedir (Yao 2012).

Erken dönem optogenetik çalışmalarda ışığa duyarlı paket prekürsörler kullanılmaktaydı. Son yıllarda doğada çeşitli canlılar üzerinde yapılan araştırmalar bir çok fototetik adayı protein keşfedilmesini sağlamıştır. Günümüzde bir dizi fototetik üzerine araştırmalar yürütülüyor olmasına karşın başlıcaları şunlardır;

a) Bakteriyorodopsin: Dieter Oesterhelt ve Walther Stoeckenius'un 40 sene kadar önce yeşil alglerde keşfettikleri ışığa duyarlı ilk proteindir (Oesterhelt 1971). Yeşil ışık ile aktive olduğunda hücre içine katyon girişine yol açar ve transfekte edildiği nöronda aksiyon potansiyeli oluşturur. Yeterince etkin olmadığı ve halorodopsinle birlikte kullanılmadığı için kullanımından vazgeçilmiştir.

b) Halorodopsin: 1977 yılında Halobacterium salinarum'da tespit edilen sarı ışığa duyarlı bir iyon kanalıdır. Aktive olduğunda Cl⁻ iyonlarının hücre içine taşınmasını ve hücre membranı potansiyelini azaltarak aksiyon potansiyelinin inhibe olmasını sağlar (Matsuno-Yagi ve ark., 1977). Natronomonas Pharaonis'den izole edilen bir diğer halo- rodopsin türü (NpHR) 2008 yılında etkin bir şekilde nöronlarda aksiyon potansiyelinin inhibisyonu için kullanılmaya başlanmıştır. Protein mühendisliği ile modifiye edilmiş eNpHR reseptörleri de benzer bir etki oluşturur (Gradinaru ve ark., 2008).

c) Kanalrodopsin: 2002 yılında Chlamydomonas Reinhardtii'de keşfedilmiş mavi ışığa duyarlı bir Na⁺ iyon kanalıdır ve ışıkla uyarıldığında hücre içine Na⁺ girişini sağlayarak aksiyon potansiyeli oluşturur (Nagel ve ark., 2003).

d) OptoXR: Rodopsinin intrasellular parçasının diğer adrenerjik reseptörlerin hücre içi parçaları ile değiştirilmesi fantastik reseptörlerin geliştirilmesini sağladı. Böylece hücre içi sinyal yollarını spesifik olarak kontrol edebilecek optogenetik bir mekanizma geliştirilmiştir. (Airan ve ark., 2009).

Aynı zamanda çok farklı lokalizasyonlardaki farklı hücre tiplerinden bazılarını eksite ederken diğerlerinin inhibisyonunu sağlayabilecek multifokal, multimodal etkileşimleri mümkün kılan bir tekniktir. Zhang ve ark. multimodal etkileşimleri oluşturmak üzere çok renkli optik aktivasyon kullanmıştır (Zhang ve ark., 2007). Başlıca fototetik mekanizmalar Şekil 1.4'de gösterilmiştir.

İlk çalışmalarda drosophila ya da zebra balığı larvaları gibi şeffaf dokular tercih edilmekteydi. Erişkin drosophila'larda yapılan deneylerde de kısa dalga boyu nedeniyle ışık dokuya invaze olarak gerekli etkiyi oluşturabilmiştir; ancak ilerleyen zamanlarda yüksek organizmalarda yapılan çalışmalar ışığın daha invazif metotlarla hedef dokuya ulaştırılması zorunluluğunu ortaya çıkarmıştır. Bu bağlamda fiber optik kablolarla aktarılan lazer ışığı kullanılmıştır (Gradinaru ve ark., 2007). Günümüzde uygulanan optogenetik metotlarda katı-hâl lazer sistemleri ile elde edilen lazer ışığı yaygın olarak kullanılmaktadır.

Son dönemde yüksek doku çözünürlüğüne sahip bir ışık olan LED (Light-emitting diode) teknolojisi de optogenetikte kullanılmaya başlanmıştır (Iwai ve ark., 2011). LED sistemlerin temelinde üzerinden akım geçen bir silikon maddenin ışık vermesi prensibi yatmaktadır. Bu teknoloji sayesinde vücut dışında oluşturulan ışığın fiber optik kablolar vasıtasıyla hedef beyin dokusuna yönlendirildiği konvansiyonel yöntem yerine ışığın doğrudan in vivo şartlarda, hedef beyin dokusu içerisinde oluşturulabilmesi sağlanmıştır. Optogenetikte kullanılan ışığın mahiyeti ve hedef bölgeye ulaştırılma şekli optogenetik kontrolün çeşitliliğini belirleyen parametrelerdendir.

Yüzyılın başında Luigi Galvani'nin bir kurbağa bacağındaki sinir hücrelerini elektrikle uyarmasıyla başlayan süreçte; klinik uygulamalar ve lezyon çalışmaları, yerini beynin farklı bölgelere yerleştirilen iletkenler ile sunni olarak uyarılması esasına dayanan "nörostimülasyon uygulamaları"na bırakmıştır

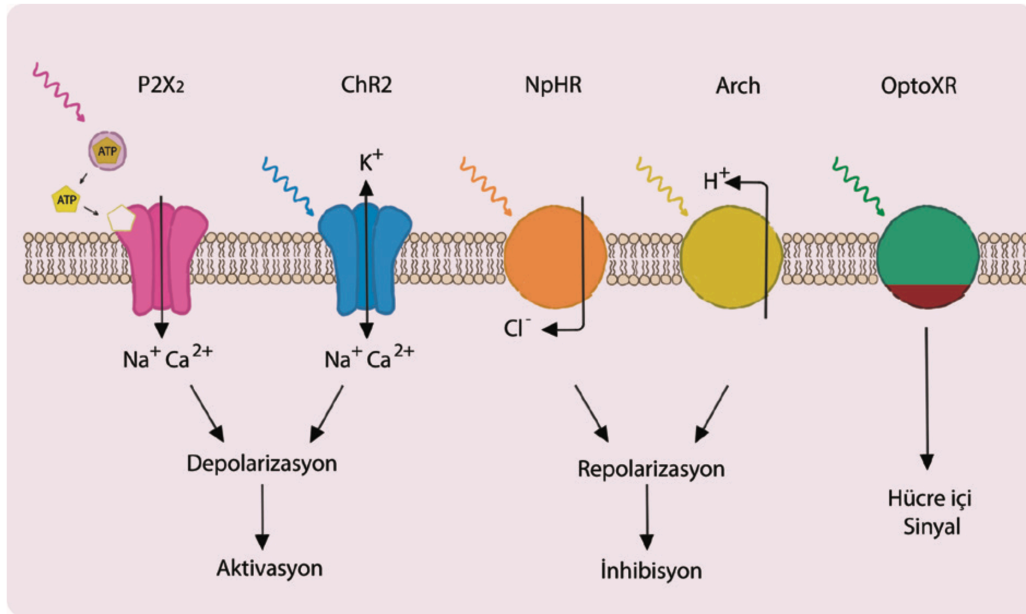
(Piccolino, 1998). Başlangıçta geniş alanlarda nonspesifik olarak gerçekleştirilen nörostimülasyon uygulamaları zamanla daha küçük bölgelere spesifik olarak uygulanmaya ve farklı sinir hücrelerinden oluşan hücre kümelerinin işlevlerinin belirlenmesinde etkin bir yöntem olarak kullanılmaya devam etti. Yakın bir tarihte ise insanlar üzerinde de uygulama alanı bulan transmanyetik stimülasyon tekniği fizyolojik bütünlüğü bozmadan, daha küçük beyin alanlarına özgün uyarı yapabilmeyi mümkün kılmıştır. Transmagnetik stimülasyonun klasik elektriksel stimülasyona üstünlüğü sadece aktive edebilmesi değil, aynı zamanda inhibisyon da oluşturabilmesiydi (Barker ve ark., 1991). Ancak bütün nörostimülasyon metodların uygulandığı bölgedeki nöron alt tiplerini aynı anda uyarması sebebiyle, nöron alt tiplerinin ortaya çıkan fizyolojik sonuca nasıl bir katkı sağladığını tam olarak anlamak mümkün olmamıştır. 2005 yılında keşfinden sonra kısa zamanda bütün dünya da çok geniş bir uygulama alanı bulan optogenetik uyarım tekniği ise; klasik nörostimülasyon tekniklerinin bu kısıtlılıklarını bertaraf ederek belli bir bölgede birbirine çok yakın yerleşimli bir çok nöron tipinden sadece belli bir grubu spesifik olarak uyarabilmeyi mümkün kılmıştır (Lima ve Miesenbock 2005, Deisseroth ve ark., 2006).

Bu yeni teknik ışığa duyarlı bir grup protein olan opsinerin genetik metaryalinin bir virus taşıyıcı içine yüklenerek uyarılmak istenen sinir hücresine transfer edilmesi bu sayede sinir hücresi yüzeyinde ışığa duyarlı protein kanallar oluşturmak sureti ile ışık kullanarak hedef hücrelerin manipüle edilebilmesi esasına dayanmaktadır. Optogenetiğin farklı hücre tiplerini spesifik olarak uyarabilme konusundaki bu başarısı uyarılabilir hücrelerle ilgili bütün alanlarda yarattığı geniş devrimsel etkiyi kısa zamanda beslenmeyi düzenleyen mekanizmaların daha ayrıntılı bir şekilde ortaya konulmasında da hissettirdi. Bir kaç yıl içerisinde optogenetik metodu ile ilk sunni açlık uygulaması gerçekleştirildi (Aponte ve ark., 2011). Beslenme ile ilgili daha önce yapılan çalışmaların bir çoğu bu yeni metodla sadece beyin bölgesi değil, hücre tipi düzeyinde hatta hücre tiplerinin alt grupları düzeyinde yeniden ele alınmaya başladı. Bu gelişmeler daha önce ortaya konulan ama kompleks yapısı nedeniyle test edilemeyen bir çok hipotezin test edilmesine olanak sağlamıştır.

Başlangıçta hücresel spesifiteyi sağlamak için hücre tiplerine özgü üretilen virüslerin yerini hedef hücrelerinde ters çevirilmiş gen parçalarını (FLEx gen)

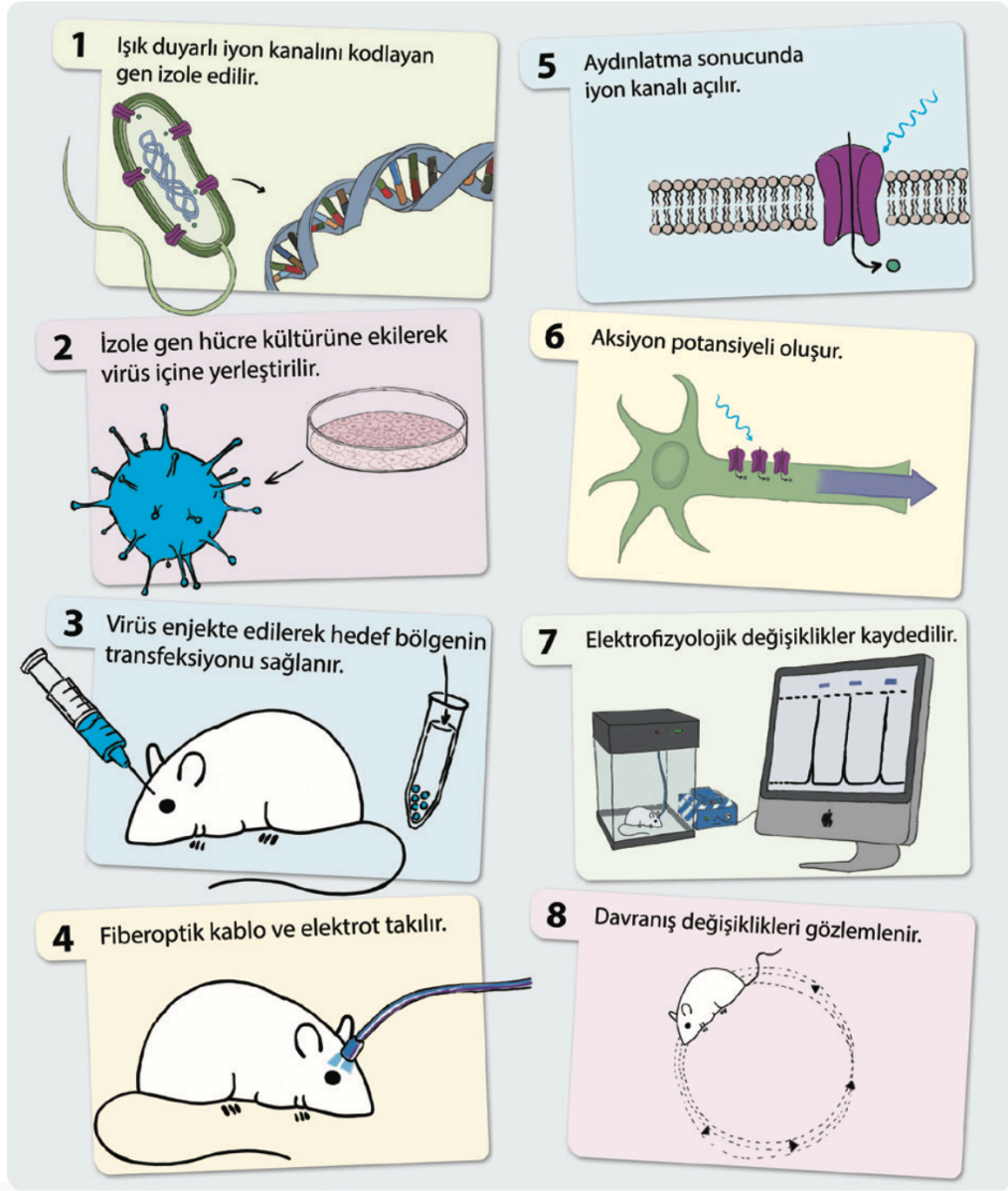
düzelterek okuma kabiliyeti barındıran hücreye spesifik transgenik (Cre) hatlarla virüslerin içerde hedef bölgeye enjekte edilen FLEEx genlerin kombinasyonlarına bıraktı (Pupe ve Wallen-Mackenzie 2015). Zamanla daha kronik manipulasyonları mümkün kılan modifiye reseptörleri eksojen kimyasallarla uyarma prensibine dayalı kemogenetik metodlar da yeni nesil bir hücreye spesifik norostimülasyon tekniği olarak kullanıma girdi.

Bu teknoloji sayesinde bilim insanları beslenme ile ilgili nöronal mekanizmalarda hangi sinir hücrelerinin tam olarak nasıl bir rol üstlendiği konusunu araştırmak için güçlü bir araç edinmiş oldu. Optogenetik lezyon çalışmaları ile daha önce gösterilen bir çok bulgunun ve hipotezin hücresel düzeyde test edilebilmesine olanak sağlamaktadır. Yapılan çalışmalar AgRP proteini sentezinin özgün olarak arkuat çekirdekte açlığı regüle eden AgRP/NPY hücrelerinde yapıldığını göstermektedir (Broberger ve ark., 1998, Hahn ve ark., 1998). AgRP hücrelerinin spesifik olarak uyarılmasının yeme davranışını ciddi anlamda tetiklediğini gösteren çalışmalar yapılmıştır (Aponte ve ark., 2011). Bu çalışmada daha önce diyeteryan çalışmalarda ortaya koyulan açlığın kognitif faaliyetleri geliştirici etkisinin nöronal düzenlenme mekanizmasına hücresel düzeyde yaklaşmak üzere optogenetik tekniğinin imkanlarını kullandık.



Şekil 1.4. Başlıca fototetik mekanizmalar (Alp ve ark., 2014).

Optogenetik uygulamalarda kullanılan stimüle ve inhibe edici fototetikler.



Şekil 1.5. Optogenetik uygulama aşamaları (Alp ve ark., 2014).

Optogenetik uygulamalarda doğadaki ışığa duyarlı organizmalardan elde edilen protein kanallar hedef hücrelere transfekte edilerek ışık uygulaması ile kontrol edilebilir hale getirilmektedir. Böyle bir hücreni bir sinirsel döngüdeki fizyolojik anlamı elektrofizyolojik ve davranış testleri ile analiz edilebilir.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

AgRP-Cre transgenik denekler Jackson Laboratuvarı'ndan satın alındı. Medipol Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde üretimi gerçekleştirildi. Yavruların doku örnekleri alınarak genotipleri belirlendi. 40 günlük 60 erkek transgenik fare kontrol, açlık ve optogenetik stimülasyon grubu olarak üç gruba ayrıldı. Kontrol ve açlık grubuna grubuna intrakraniyal rAAV-GFP, optogenetik stimülasyon grubuna rAAV-ChR2-tdTom enjekte edilerek optik fiber kanülleri takıldı. 2 haftalık remisyondan sonra kontrol grubuna ve optogenetik stimülasyon grubuna serbest beslenme rejimi uygulanırken açlık grubuna 18 saatlik akut açlık uygulandı. Denekler lazer uyarı altında öğrenme bellek kapasiteleri Morris su labirenti kullanarak değerlendirildi.

2.1. Gereç

Çalışmada kullanılan biyolojik materyal ve kimyasalların listesi çizelge 2.1'de, teknik gereçler de çizelge 2.2'de belirtilmiştir.

Çizelge 2.1. Deneylerde Kullanılan Biyolojik Materyaller ve Kimyasallar

Biyolojik Materyaller ve Kimyasallar	Marka	Ürün Kodu
LB Agar	Biomatik	A8523-500G
LB Broth	Biomatik	A8523-500G
OneShot Stbl-3 Kompetant <i>E.coli</i> hücre hattı	Life Technologies	C737303
Primerler	Sentegen	
AAV plazmitleri	Addgene	
293AAV hücre hattı	Cell BioLabs	AA V-100
Sodyum Pirüvat (C ₃ H ₃ NaO 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

Çizelge 2.1. (Devam) Deneylelerde Kullanılan Biyolojik Materyaller ve Kimyasallar

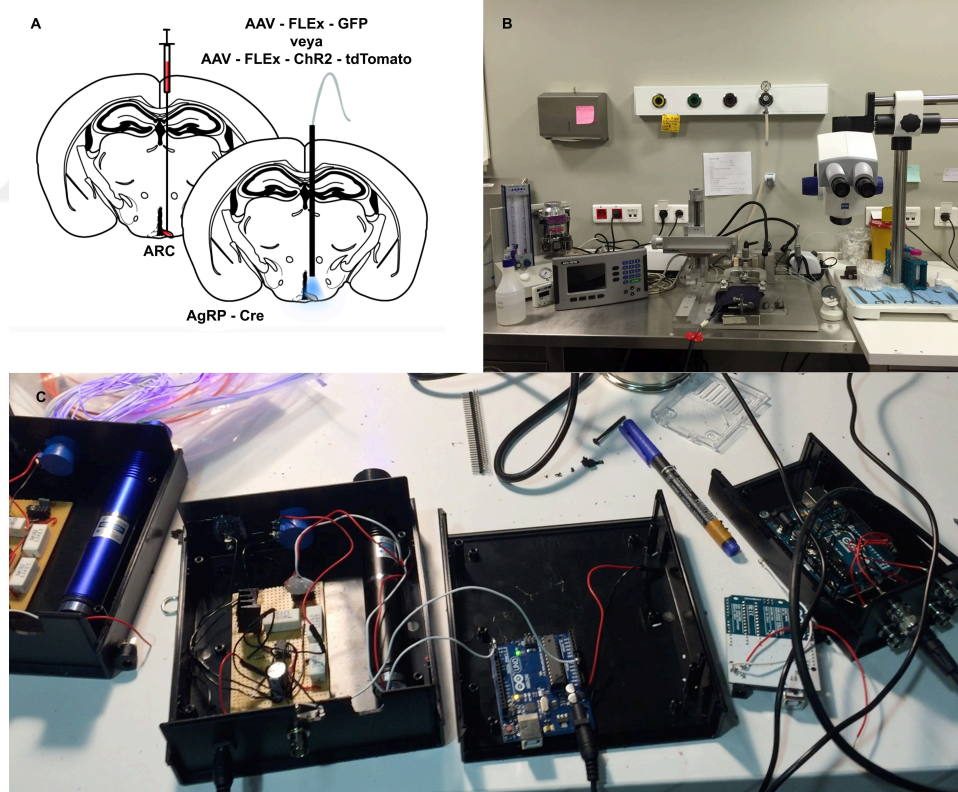
Biyolojik Materyaller ve Kimyasallar	Marka	Ürün Kodu
Potasyum Klorür (KCl)	Sigma-Aldrich	P9541
Sodyum Fosfat (NaH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich	S8282
Sodyum Bikarbonat (NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich	S6014
Magnezyum Klorür (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich	208337
Kalsiyum Klorür (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich	C1016
Fosfat Tamponlu Tuz (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 TM	Lumafluor	R180
Triton X-100	Sigma-Aldrich	X100
Trizma [®] HCl	Sigma-Aldrich	T3253
Clozapine N-Oxide	Enzo LifeScie.	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

Çizelge 2.2 DeneYlerde 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	Ist. 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 Sci.	BR2000
dH2O Cihazı	Millipore	ZRQSV8W
Ear Tag	Harvard Apparatus	52-4717
Eppendorf® LoBind Microcentrifuge Tube	Sigma-Aldrich	Z666505
Manyetik Karıştırıcı	Benchmark Sci.	H400HSB
Multi-Therm Shaker	Benchmark Sci.	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 Sci.	BV1000
Konfokal Mikroskop	Zeiss	LSM-780
Vibratom	Leica	VT1000S
Mikropipet Çekici	Sutter Instruments	P-1000
Ozmometre	Advance Ins.	3250
AnyMaze 5.0	Anymaze Soft.	
Stereo Mikroskop	Zeiss	Disc. V8

2.2. Yöntem

Arkuat çekirdekteki AgRP nöronlarını seçici olarak uyararak için ters-GFP veya ters-ChR2 gen dizileri taşıyan virüsler, genotipleri PCR tekniği ile teyit edilen AgRP/Cre transgenik farelerin arkuat çekirdeklerine enjekte edildi. Bu sayede AgRP/Cre denekler sadece AgRP hücrelerinde ters dizilerin düzeltilmesinden sorumlu rekombinaz enzimi sentezlendiği için sadece AgRP hücrelerinde ters-GFP ve ters-ChR2 genleri düzeltilerek GFP ve ChR2 ifadesi gerçekleştirilmiş oldu. AgRP/ChR2 hücrelere ışığı ulaştırmak üzere deneklerin kafalarına fiberoptik bir kablo yerleştirildi (Şekil 2.1). AgRP hücrelerinin uyarılmasının öğrenme bellek fonksiyonları üzerine olan etkisini anlamak üzere hücreleri ışıkla uyarılan denekler Morris su labirenti kullanılarak 18 saatlik açlık uygulanan ve herhangi bir açlık uygulaması yapılmayan gruplarla karşılaştırıldı.



Şekil 2.1.

(A) AgRP-cre deneklere ters-GFP ya da ters-ChR2-tdtom geni taşıyan virüsler enjekte edilerek arkuat çekirdeklerinde protein ifadesi sağlandıktan sonra yerleştirilen fiber optik kablo ile gerçekleştirilen ışık uyarısı. (B) İntrakraniyal enjeksiyon ve fiberoptik kablo yerleştirmede kullanılan stereotaktik düzenek (C) Uyarım için geliştirilen lazer sistemi.

2.2.1. Denekler

AgRP hücrelerine spesifik bir uygulama yapmak için özel üretilmiş olan AgRP/Cre transgenik C57 ırkı fareler Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığının izni ile bir adet dişi ve bir adet erkek olmak üzere Jackson Laboratuvarı'ndan hemizigot olarak satın alındı. Medipol Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde Tg(AgRP-cre)1Lowl/J veya kısa adıyla AgRP-Cre erkek transgenik fare, dişi C57BL/6 yabanıl tip fareler veya dişi AgRP-Cre fareler ile çaprazlanarak üretimi gerçekleştirildi. Yavrular 21 ila 28 günlüğe ulaştıklarında, anestezi altında yavruların kulaklarından doku örnekleri alınarak genotipleri belirlendi. AgRP-Cre olduğu belirlenen 40 günlük 60 erkek transgenik fare operasyon için hazırlandı ve tekli kafeslere konuldu. Denekler gruplar arasında ağırlık dağılımının dengeli olmasına dikkat edilerek üç gruba ayrıldı (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3 Deney Grupları

Grup	Sayı (n)	Uygulama	Denek / Transfeksiyon
Kontrol Grubu	12	Serbest beslenen tok fareler	AgRP-Cre / GFP
Açlık Grubu	12	18 saatlik açlık	AgRP-Cre / GFP
ChR2 Grubu	12	Tok/ Optogenetik Stimülasyon	AgRP-Cre/ChR2-tdTomato

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.

2.2.2 Genotipleme

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

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 T100TM 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.

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 için DNA konulmadan bırakıldı. Tüm tüplerde son hacim, ddH₂O ile 12 µL'ye tamamlandı.

Çizelge 2.4. Kontrol PCR karışımı

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

Çizelge 2.5 Transgenik PCR karışımı

Gereç	Son Konsantrasyon
10X Reaksiyon tampon çözeltisi	1X
Ortak primer	0,5 mikroM
Transgenik geri primer	0,5 mikroM

Çizelge 2.5. (Devamı) Transgenik PCR karışımı

Gereç	Son Konsantrasyon
dNTP Solüsyon Karışımı	200 mikrom
Taq Polimeraz	1,25 unit/50 mikrolitre PCR
DNA	
ddH2O	

Çizelge 2.6 Kullanılan Primer Dizileri

Primer	Dizi 5' à 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 Cyclers cihazına koyuldu.

Çizelge 2.7 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

Agaroz jel elektroforezi ve görüntüleme

100 µL 1X TAE (Tris-Asetat-Etilendiamin tetraasetik asit) 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 5µL safeview eklendi ve yükleme tarafları takılarak elektroforez kasetine döküldü. Jel

kıvamına geldikten sonra 1X TAE tampon çözeltisi ile dolu elektroforez tankına yerleştirildi. Birinci kuyuya 5 µL 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.

2.2.3 Rekombinant Adeno-asosiye Virüs Üretimi

Rekombinant adeno-asosiye virüs üretimi için gereken plazmitler Addgene firmasından satın alındı. Kompetant Stbl3 *E. Coli* transformasyonu ile gelen plazmitler, bakteriyel sürüntü halinde temin edildi.

Plazmit DNA çoğaltma

35 g/L oranında H₂O ile karıştırılmış LB (Lysogeny broth) 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 besiyeri yerine aktarıldı. Bakteriler sıvı besiyerinde 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.

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.

AAV Hücre transfeksiyonu

Rekombinant adeno-asosiyasyon virüsü üretimi için özelleştirilmiş 293AAV hücre hattı Cell BioLabs firmasından temin edildi (Cell BioLabs, AAV-100). 106 293AAV hücresi 10 cm çaplı 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 eksi 80°C'de donduruldu.

Pürifikasyon

Hücre çökeltisi 9 mL steril lizis 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 60.000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj işleminin sonunda virüsler %40'lik çözeltinin bulunduğu katmanda birikti. Şırınga yardımıyla bu katman toplandı. Önceden 1 kez saklama tampon çözeltisi (1 L: 100 mL 10x PBS, 50 g D-Sorbitol, 42,4 mL %5 NaCl) ile ıslatılan Amicon 100K filtrelili 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.

2.2.4 İntrakraniyal Enjeksiyon

Deneklerin arkuat çekirdeklerinde yer alan belirli nöron gruplarına ışığa duyarlı bir iyon kanalı olan Channelrhodopsin (ChR2) membran proteinlerinin genetik dizisi transfekte edilmek üzere bu gen dizilerini taşıyan Adeno Associated Virüsler (AAV) geliştirildi. Transfeksiyon reaksiyonlarında kullanılan plasmidler ChR2 geni yanı sıra bir ya da belli antibiyotiklere direnç sağlayan genler de barındırmaktadır. Böylece klasik ısıtma ve soğutma tekniği ile bakteri içerisine girmesi sağlanan genetik metaryaller virüsün enkapsilasyonunu sağlayacak proteinler, ChR2 genleri yanı sıra ampisiline direnç sağlayan proteinler de sentezlemektedir. Bu sayede antibiyotikli LB ağarlara ekilen bakterilerden sadece içinde virüs bulunduranlar bakteriyel koloni oluşturabildi ve virüs belli bir konsantrasyon elde edilinceye kadar çoğaltılarak konsantre edildi. Deneylerde kullanılacak FLEx-ChR2 genler Standford Üniversitesinden temin edilerek Ampisilin yüklü LB agar küvetlerde 1×10^{13} genom kopyası/ml seviyesine kadar konsantre edilerek kullanıma hazır hale getirildi ve enjeksiyon gününe kadar -80 derecede muhafaza edildi (Gray ve ark., 2011).

Mikroinfzyon sistemi ve mikropipet hazırlanması

Enjeksiyonunda kullanılacak olan viruslerin hacmi çok küçük olduğundan enjeksiyonda mikroinfzyon pompası (Narishige One-axis Oil Hydraulic Micromanipulator) kullanıldı. Mikropipetler pipet çekme makinasında (Sutter Instrument P-1000 flaming/Brown Pipette Puller System) çekilerek arkuat çekirdeğe ulaşabilecek uzunlukta ve mukavemette pipetler üretildi. Pipetlerin uç açıklıkları elektron mikroskobu altında ölçülerek pipet çekme ayarları optimize edildi. Mikropipetlerin 20–40 mm uç açıklığı ve 7 cm uzunluğunda olması sağlandı.

Koordinatların Belirlenmesi

Farklı ırk, cins ve büyüklükteki farelerde beyindeki yapıların yerleşim koordinatları farklılık gösterdiği için virus enjeksiyonlarına başlanmadan önce enjeksiyon yapılacak koordinatların belirlenmesi için bir kaç denekte 560 nm floresan ışıktaki parlayan özel bir floresan boya olan latex bead enjeksiyonları yapıldı. Bunun için denekler inhalasyon yolu ile 5ml izoflurana maruz bırakıldı. 30 günlük erkek farelerin üst dişi ve kulak çıkıntısı stabil anestezisi altında stereotaksik çerçeveye sabitlendi (Stoelting Just for Mice). Burun ve ağzı kapsayacak şekilde maske takılarak izofluran inhalasyon ile anestezinin idamesi sağlandı. Kafanın düz ve sabit olduğundan emin olunmasıyla, kafa derisi Betadin ile temizlendi ve bisturi ile kesildi. Başın üstünde önden arkaya doğru bir santim uzunluğunda insizyon açıldı. İnsizyon kenarları ekarte edilerek kafatası kemiğinin görülmesi sağlandı. Küçük bir miktar hidrojen peroksit ile kafatası kemiğinin üstündeki bağ dokusu uzaklaştırılarak anatomik referans noktaları olan lamda ve bregma noktalarının görüntülenmesi sağlandı. Kafatası hidrojen peroksitten arındırıldı ve SteREO Discovery V8 mikroskop altında kraniyal koordinatlar belirlendi. Narishige mikromanipulator yardımıyla bregma noktasında tüm koordinat değerleri sıfırlandı. Lambda ve bregmanın ön arka ve sağ sol ekseninde aynı hizada olması temin edildi. Lambda ve bregma mesafesi referans atlaslardaki ölçümlerle orantılanarak arkuat çekirdeğin muhtemel X-Y-Z koordinatları 1.24-0.25-5.5 mm olarak tesbit edildi. Navigasyon iğnesi lambdadan itibaren X ve Y ekseninde tesbit edilen koordinatlara hareket ettirilerek ilgili bölge işaretlendi. Bir dişi matkabı yardımı ile kafatası kemiğinde

delik açıldı. Sutter P-1000 mikropipet çekici ile cam mikropipetler ısı yardımıyla inceltirilerek hazırlandı. İçine mineral yağ doldurulan cam mikropipetler mikromanipülatöre takıldı. Mikroinjeksiyon pompası ile mikropipere 1 mikrolitre latex bead çekildi. Mikropipet ile açılan delikten Z ekseninde dakikada 0.5 mm/dk hızında 5.5 mm ilerlenerek, Narshige bir mikromanipülatör (MWS-1A: Micromanipulator One-axis Water Hydraulic System) yardımı ile 25 nl/dk olacak şekilde 180 nanolitre enjeksiyon yapıldı. 5 dk enjeksiyonun boşalması için beklendikten sonra mikropipet Z ekseninde 0.5 mm/dk hızında çıkartılarak enjeksiyon sonlandırıldı. Akabinde 5.2.6 Görüntüleme bölümünde anlatılan işlemler uygulanarak enjekte edilen yapılan latex florasanın yeri tespit edilerek enjeksiyonun yapılacağı koordinatlar optimize edildi.

Virus enjeksiyonu ve fiberoptik yerleştirme

Koordinat belirlenmesi bölümünde anlatılan enjeksiyon yöntemi ile (200nl, bregma: AP: -1.24 mm, DV: -5.50/- 5.60 mm, ML: +/-0.25 mm) her deneğe tek taraflı olarak 200 nanolitre AAV2-FLEX-ChR2-tdTomato (Medipol Üniversitesi Elektrofizyoloji ve Davranış Laboratuvarı; titer 1×10^{13} genom kopyası/ml) virüs enjeksiyonu enjeksiyonu gerçekleştirildi. Kontrol grubu ve açıklık grubuna ise 200 nanolitre AAV2-FLEX-GFP (Medipol Üniversitesi Elektrofizyoloji ve Davranış Laboratuvarı; 1×10^{13} genom kopyası/ml) enjeksiyonu yapıldı. Optogenetik uygulanacak gruba lazer ışığın ilgili bölgeye iletilmesini sağlamak amacıyla fiberoptik bir kablo (200 µm diameter açıklık; BFH37-200 Multimode; NA 0.37; Thor Labs) arkutat çekirdeğin 0.5 mm yukarısına olacak şekilde yerleştirildi (bregma: AP: -1.24 mm, DV: -5.45 mm, ML: -0.20 mm). Fiberoptik kablo kafatası kemiği üzerine C&B Metabond Quick Cement ve dental akrilik kullanılarak sabitlendi.

Çizelge 2.8 İntrakraniyal enjekte edilen rAAV

Rekombinant adeno-asosiy virüsler

rAA V-FLEX-GFP

rAA V-hSyn-FLEX-CHR2-tdTomato

Operasyon sonrası takip

Operasyon komplikasyonlarını azaltmak ve postoperatif takip süresini kısaltmak için 0.5 mg/kg ip meloxicam uygulandı. Denekler operasyon sonrası tekli kafeslere alınarak 22-24 °C, 12 saatlik aydınlık karanlık döngüsünde serbest besin erişimi (besleme şekli: Teklad F6 Rodent Diet 8664; 4.05 kcal/g¹, 3.3 kcal/g¹ metabolizable energy, 12.5% kcal from fat; Harlan Teklad) ve su erişimi sağlanarak 2 hafta süre ile aklimatizasyon sağlandı. Operasyon sonrası denekler postop takibe alındı. Tekli kafeslerde sıvı yem (ensure) ve katı yemle 22 -24 °C oda sıcaklığında 2 hafta remisyona sağlandı. 12 saat karanlık / aydınlık döngüsüne alıştırdı.

2.2.5 Fiber Fotometre ve Lazer Kaynağı

Takılan fiber optik kabloların ışık geçirgenlikleri fotometre (Thorlab Digital Handheld Optical Power and Energy Meter Console) ile ölçülerek 15mw olacak şekilde optimize edildi. 540 nm lazer geliştirdiğimiz bir yazılım ve kontrol devresi ile entegre edilerek istenilen pulsasyonlarda ve güçte lazer çıkışı sağlandı. Arduinio sistemi ile bilgisayar üzerinden oluşturulan bir yazılım marifetiyle yönetilmek sureti ile saniyede kaç pulsasyon yapacağı belirlendi.

Fotostimülasyon Protokolü

AAV2-FELX-ChR2 enjeksiyonu uygulanan denekler 2. haftanın sonunda fiberoptik kablo (5 m uzunluk, 200 mm çap; Thorlab Lenses) ile lazer ünitesine bağlanarak mavi ışıkla (473nm dalga boyu) 10 dakika boyunca uyarıldı (10-ms

pulsasyon 20Hz; 2 saniye açık, 2 saniye kapalı). Işık kaynağı olarak lazer kaynağını belli sıklıkla açıp kapatan bir arduino sistem tasarlanarak kullanıldı (PCGU100; Valleman Instruments ve Arduino Electronics Platform). Uygulama esnasında belirgin yeme davranışı gösteren denekler AgRP hücrelerinde ChR2 transfeksiyon pozitif olduğu değerlendirilerek ChR2 grubuna alındı. Deneklerin başına yerleştirilek fiberoptik ünitenin geçirgenliği göz önünde bulundurularak fiber optik kablodan gelen ışık deneğin beynine 10-15 mV luk ışık ulaşacak şekilde optimize edildi. Fiberin yerleşimine göre verilece ışığın gücü Starnford Üniversitesi web sitesindeki otomatik hesaplayıcı kullanılarak hesaplandı (Stanford Üniversitesi Web Sitesi, Krashes ve ark., 2011).

Açlık

Deney gününden bir gün önce başlamak üzere açlık grubundaki denekler aksam saat 17:00'den sabah 11:00'e kadar 18 saat aç bırakıldı. Su erişimleri kısıtlanmadı. Günlük davranış kayıtların tamamlanmasını müteakip 6 saat serbest beslenmeye tabi tutuldu.

2.2.6 Davranış Testleri

30 günlük erkek AgRP-Cre transgenik farelere intrakraniyal olarak enjekte edilen rAAV-hSyn-FLEX-ChR2(Gq)-tdtom virüsü ile 14 gün süreyle arkuat çekirdek bölgesindeki AgRP 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. Akabinde deneklerin beslenme davranışları ve öğrenme bellek performansları değerlendirildi.

Besin Ölçümleri

Deneklerin deney ortamına alıştırılması günlük besin tüketimi gözlenerek gerçekleştirildi. Besin tüketimi stabil hale geldiğinde serbest beslenme programı altında davranış deneyleri başlatıldı. Öncelikle yapılan lazer uygulamasının yeme davranışı üzerine olan etkisini saptamak için denekler yarım saat arayla iki kayıt alınarak saatlik yem tüketimi tespit edildi. Daha sonra lazer ünitesine bağlanarak 1 saat boyunca uyarıya maruz bırakıldılar ve 30 dk arayla iki kayıt daha alınarak deneklerin tükettiği besin miktarı kayıt altına alındı. Gündüz döngüsü olan saat 7 de her üç grubun da günlük yem tüketimleri kayıt altına alındı.

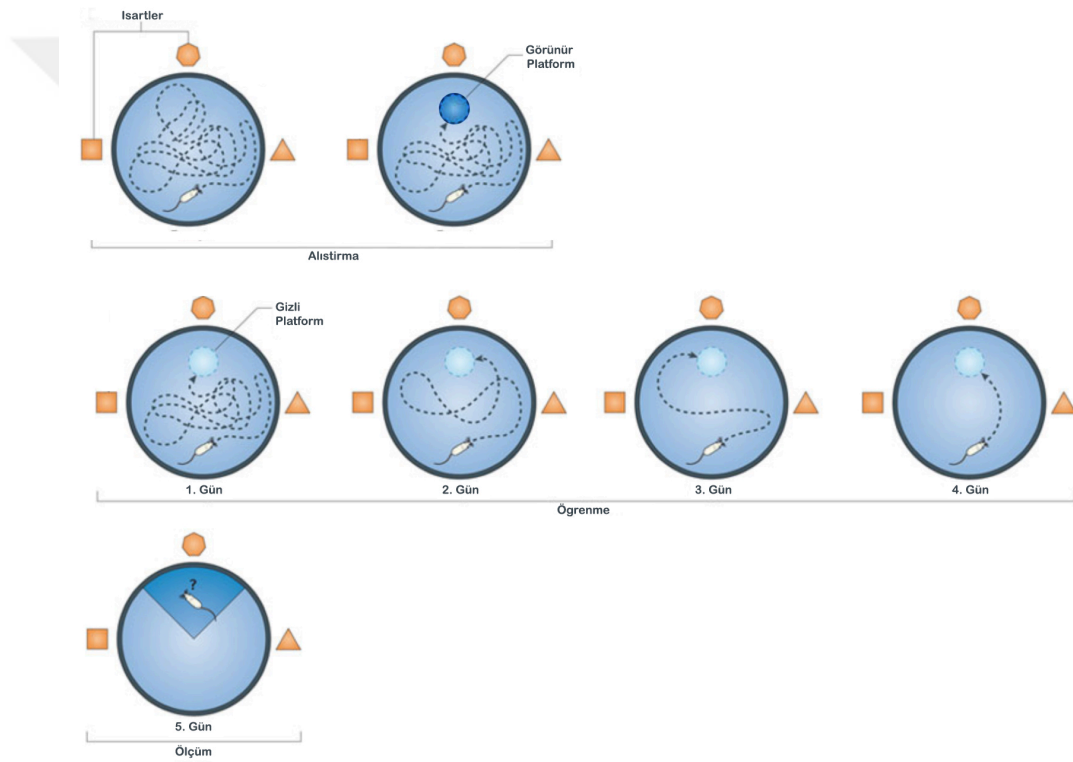
Morris Su Labirenti

Gruplar arasında mekansal öğrenme ve bellek açısından bir farklılık olup olmadığını değerlendirmek için Morris su labirenti testinden yararlanıldı. 120 santim genişliğinde bir su tankına 1 gün alıştırma 4 gün eğitim 1 gün ölçüm olmak üzere 6 günlük uygulama yapıldı. Alıştırma günü denekler su tankına bırakılarak 120 saniye boyunca serbest bir şekilde yüzmesi sağlandı. Akabinde yüzme alanı 4 kadrana ayrılarak kardanlardan birine bir platform konuldu. Su seviyesi platformun altında bırakılarak deneklerin platformu görmesi sağlandı. Denekler aşağıda belirtildiği sıra ile havuzun farklı köşelerinden dörder kez bırakılarak takip edildi (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Deneklerin günlere göre bırakıldığı köşeler

	1. deneme	2. deneme	3. deneme	4. deneme
0. gün	N	NE	SE	NW
1. gün	SE	N	NW	E
2. gün	NW	SE	E	N
3. gün	E	NW	N	SE
4. gün	N	SE	E	NW
5. gün (probe)	NE			

120 sn içinde platforma çıkan denekler 20 sn platformda bekletildikten sonra kafeslerine geri alınırken 120 sn içinde platformu bulamayan denekler alınarak platform üzerine manuel olarak bırakıldı ve 20 sn platformda kalmaları sağlandı. Ertesi gün su seviyesi yükseltilerek süt tozu eklenmek sureti ile platformun gizlenmesi sağlandı. İlk gün yapılan uygulama dört gün boyunca her denek için tekrarlandı. 5. gün ise platform havuzdan çıkarılarak denekler daha önce bırakılmadıkları bir noktadan havuza bırakıldılar ve 60 sn boyunca hareketleri kayıt altına alındı. Alınan kayıtlar Any Maze programında analiz edildi (Vorhees ve Williams 2006).



Şekil 2.2 Su labirenti deney dizaynı

Denekler 1 gün alıştırma 4 gün eğitim 1 gün ölçüm olmak üzere toplam 6 günlük davranış deneyine tabi tutuldular.

2.2.7 Mikroskopik Görüntüleme

Davranış deneyleri tamamlanan denekler 60 günlük iken izofluran ile anestezi altına alınarak, sırasıyla fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ve %4

paraformaldehit fiksativi (PFA) ile kardiyak perfüzyona tabi tutuldu. Sakrifiye edilen farelerin beyinleri çıkarıldı. Beyinler önce 4°C’de bir gece %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. Lecia VT1000S vibratom ile 70 µm kalınlığında koronal kesitler alındı.

Davranış deneyleri tamamlanan denekler izofluran altında paraformaldehid (PFA) ile intrakardiyak fiksasyona tabi tutuldu. Beyinleri çıkarılarak PFA içerisinde bir gece boyu tutulduktan sonra 12 saat sükrözde bekletildi. Vibratomda 70 µm kalınlığında kesilerek floresan mikroskop altında ilgili bölgeler belirlendi ve ilgili kesitler cama aktararak konfokal mikroskopta hüresel düzeyde görüntüledi. Floresan görüntüleme Zeiss LSM 780 Konfokal Mikroskop ile yapıldı. Kırmızı ChR2-tdtom floresan proteinleri görüntülemek için 610 nm, yeşil GFP proteinleri görüntüleyebilmek için 488 nm dalga boyu kullanıldı. AgRP hücreleri spesifik olarak trasfekte olduğu doğrulan deneklerin davranış kayıtları değerlendirmeye alındı. (Aponte ve ark., 2011).

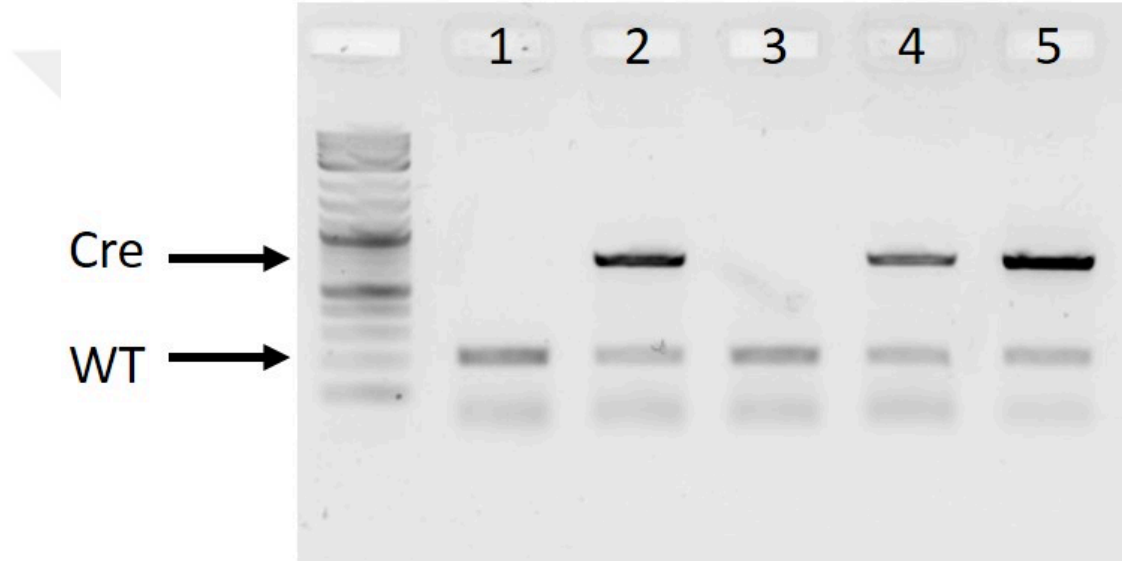
2.2.8 İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler Prism 6.0 (GraphPad) programı kullanılarak gerçekleştirildi. 0,4 gramın altında besin tüketen denekler deney grubundan çıkarıldı. İstatistiksel analizler için GraphPad Prism (RRID:SCR 002798, GraphPad, San Diego, CA) programı kullanıldı. Sonuçlar, two way ANOVA - repeated measures ve normal ANOVA testi ile değerlendirildi. $p > 0,05$; istatistiksel olarak anlamsız kabul edildi. $p < 0,05$; *, $p < 0,01$; **, $p < 0,001$; *** olarak gösterildi.

3. BULGULAR

3.1 Genotipleme

Yapılan deneylerde yalnızca 30 günlük AgRP-cre transgenik erkek fare kullanıldı. Genotipleme sonucuna göre aynı anneden doğan transgenik erkek fareler aynı deneyler için kullanıldı. rAAV-FLEX-GFP enjeksiyonu yapılan 30 günlük AgRP-cre transgenik erkek fareler kontrol grubu olarak kullanıldı. Transgenik olmayan fareler deneylere dahil edilmedi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 C57BL/6 ve AgRP-cre faresinin genotipleme sonuçları.

3.2 Yeme Davranışı

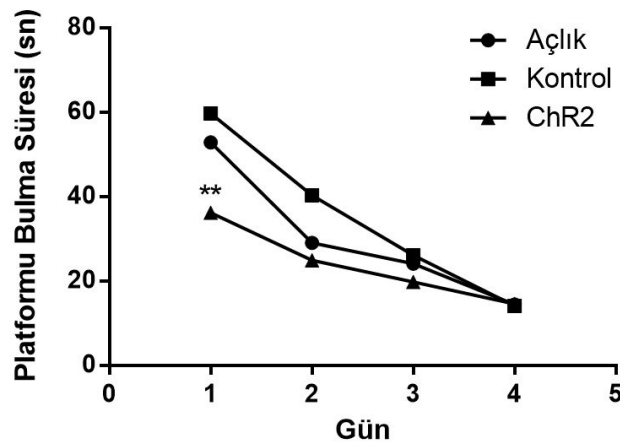
AgRP-Cre / ChR2 deneklerin stimülasyon öncesi ve sonrası yeme davranışları kayıt altına alınmıştır. Stimülasyon öncesi saatte 0,1-2 gr seviyelerinde gerçekleşen besin tüketimi stimülasyon sonrası 1 saat içinde 0,7 grama yükselmişti.

3.3 Spatial (Mekansal) Öğrenme ve Bellek Davranışı

Mekansal öğrenme gizlenmiş bir hedefin ip uçlarına bakarak belli bir zaman içinde bulmayı öğrenme kapasitesini ve öğrenilen bilginin hatırlanmasını değerlendirilmek üzere kurgulanır. Morris su labirenti mekansal öğrenme için en sık kullanılan düzenektir. Deneklerin bir havuz içerisine gizlenmiş bir platformu yüzerek bulma becerileri ve platformun yerini hatırlama düzeyleri ölçülerek gerçekleştirilir. Morris su labirentinde deneklerin öğrenme kapasitelerinin göstergesi olarak eğitim günlerinde deneklerin platforma ulaşma zamanı, bellek değerlendirme kriteri olarak da platformun çıkarıldığı ölçüm gününde platformun bulunduğu hatırladıkları kadranda geçirdikleri süre ve katettikleri mesafe gruplar arasında karşılaştırılır.

3.3.1 Platforma Ulaşmak İçin Geçen Zaman

Morris su labirentinde öğrenme sürecini değerlendirmek için en uygun parametre deneğin suya bırakılmasından platforma ulaşmasına kadar geçen zamandır. Bütün gruplar 4 gün içerisinde platformun yerini anlamlı bir şekilde daha kolay bulmuşlardır. Kontrol grubu ile 18 saat açlık uygulanan grup arasında 4 gün boyunca görünen fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Ancak ChR2 grubunun kontrol grubuna göre platformun yerini bulma konusunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha iyi olduğu şekil. de gösterilmiştir.

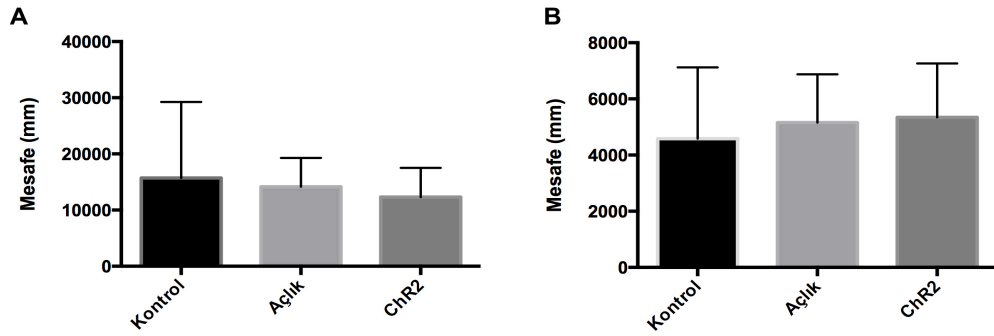


Şekil 3.1. Platforma Ulaşma Süresi (sn)

18 saatlik açlık uygulanan fareler kontrol grubuna göre öğrenme davranışında belirgin bir fark oluşturmazken AgRP hücreleri yapay olarak aktive edilen denekler kontrol grubuna göre platforma daha hızlı ulaşmıştır.

3.3.2 Ölçüm Günü Katedilen Mesafe

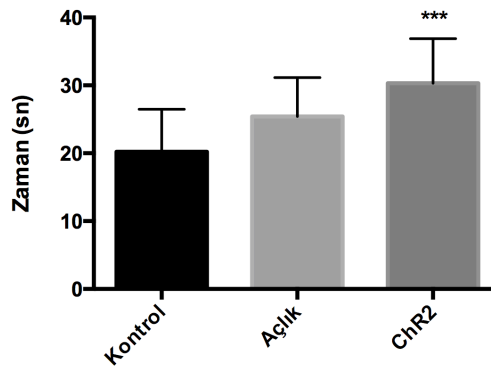
Deneklerin hatırlama kapasitesini değerlendirmek için kullanılan kriterlerden biri ölçüm günü gittikleri toplam mesafe ile hedef kadranda katettikleri mesafenin birlikte değerlendirilmesidir. Bizim çalışmamızda toplam katedilen mesafe ya da hedef kadrandan katedilen mesafe bakımından denekler arasında istatistiksel anlamlılık tesbit edilememiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Ölçüm günü (A) toplam (B) hedef kadranda katedilen mesafe. Gruplar arasında katedilen toplam mesafe bakımından bir fark yoktur.

3.3.3 Ölçüm Günü Hedef Kadranda Geçirilen Süre

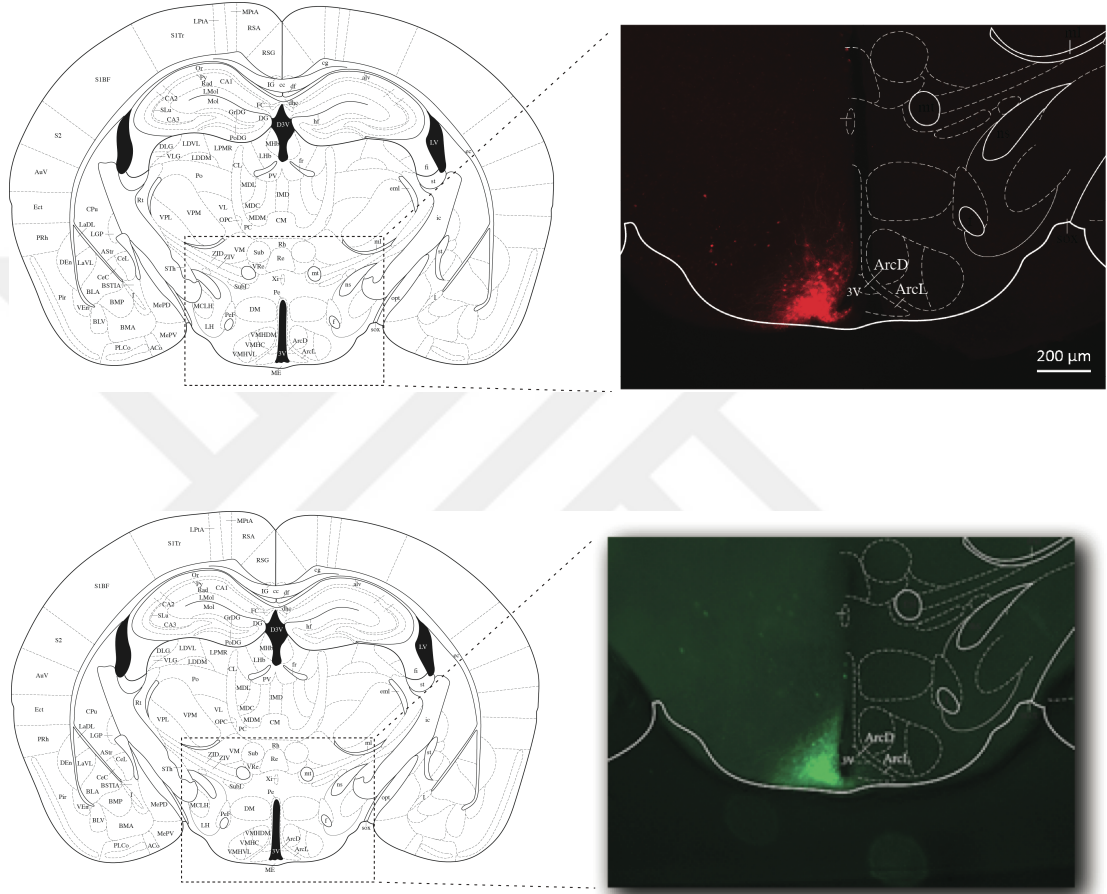
Deneklerin platform kaldırıldıktan sonra hedef kadranda geçirdikleri süre bakımından kontrol grubu ile açlık grubu arasındaki fark istatistiksel anlamlılıktan yoksundur (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Ölçüm günü hedef kadranda geçirilen süre. Yapay açlık oluşturulan ChR2 grubun kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde hedef kadranda daha çok zaman geçirmiştir.

3.4 İleri Mikroskopik Görüntüleme

Yapılan enjeksiyonlar davranış deneylerinin tamamlanmasının ardından deneklerin beyni çıkarılıp fikse edilerek enjeksiyonun tutarlılığı teyit edildi. Tutarsız enjeksiyonlar tespit edilerek deney gruplarından çıkarıldı.



Şekil 3.4 AgRP- Cre/GFP deneklerin arkuat çekirdek florasan mikroskopisi
AgRP-cre transgenik deneklerin arkuat çekirdeklerine yapılan intrakraniyal rAAV-ChR2 ve rAAV-GFP enjeksiyonundan 4 hafta sonra alınan bu görüntü yapılan enjeksiyonların başarısını göstermektedir.

4. TARTIŞMA

Klinik açlık uygulamalarında açlığın kognitif performansını geliştirici etkisini gösteren bulgular elde edilmiş olmasına karşın bunun fizyolojik arkaplanı konusunda açıklığa kavuşmuş bir mekanizma yoktur. Bu çalışmada bu kognitif etkilerin AgRP hücreleri üzerinden işleyen bir mekanizma olabileceği ortaya konulmaya çalışılmıştır.

Haftanın iki günü aralıklı açlık uygulaması yapılan deneklerin saklı bir hedefi bulmasında kontrol grubuna üstün olduklarını gösteren bir çok çalışma vardır (Halagappa ve ark., 2007). Bu çalışmalar uzun süreli açlık uygulamalarının mekansal öğrenme performansına olan olumlu etkisini göstermektedir (Stewart ve ark., 1989, Li ve ark., 2013). Ancak açlığın öğrenme bellek üzerine akut etkilerini inceleyen yeterli literatür yoktur. Tramvatic beyin hasarındada 24 saatlik akut açlığın nörotrofik yollar üzerinden yeni nöron oluşumuna ve remisyona katkısı olduğunu gösteren çalışmalarda vardır (Davis ve ark., 2008). Bizim çalışmamızda da 18 saatlik açlık uygulanan deneklerin öğrenme belleklerinde istatistiksel anlamlılık göstermeyen bir gelişme olduğu gözlemlenmiştir. Bu bulgu uzun süreli açlık uygulamalarındaki öğrenme belleği geliştirici etkilerle de uyumluluk göstermektedir (Wu ve ark., 2002).

Akut açlıktaki öğrenme kapasiteki bu gelişmenin kronik açlıktaki kadar yüksek olmaması akut açlığa bağlı vücutta meydana gelen kan glukozu, hipotansiyon metabolik değişikliklerle ilişkili olabilir. Kronik açlık uygulamalarında vücut bu strese karşı tolerans geliştirerek bir adaptasyon geliştiriyor olabilir. Serbest beslenme rejimi uygulanan optogenetik uyarı ile yapay açlık oluşturulmuş grupta ise öğrenme kapasitesinin istatistiksel olarak anlamlı bir gelişim göstermesi (Şekil 3.3) bu bulguyu destekler mahiyettedir.

Geçtiğimiz yıllarda açlığın kognitif performansı geliştirici etkisi üzerine yapılan bir grup yayın bu etkinin ghrelin üzerinden olabileceğini düşündürmektedir. Merkezi sinir sistemine ghrelin enjeksiyonu yapılan deneklerde hipokampal formasyonun zenginleştiği ve öğrenme kapasitesinin geliştiğine dair çalışmalar vardır (Li ve ark., 2013). Ghrelin aynı zamanda hipotalamus arkuat çekirdeğinde

açlığın yönetiminden sorumlu AgRP hücrelerinin ana stimulatörüdür. Bizim bulgularımızda AgRP hücrelerinin optogenetik uyarımının öğrenme bellek üzerine olan geliştirici etkisi ghrelin çalışmalarındaki bulgularla örtüşmekte hatta ghrelinin öğrenme performansını artırıcı etkisinin AgRP hücreleri üzerinden işleyebileceğini düşündürmektedir.

18 saatlik açlık grubunun kontrol grubuna göre bir hedef kadranda durma süresinin uzadığı gözlemlense de bu bulgu istatistiksel bir anlamlılıktan yoksundur. AgRP hücreleri uyarılan deneklerin ölçüm günü hedef kadranda geçirdiği sürenin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde uzun olduğu gösterilmiştir. Bu bulgu AgRP hücrelerinin bellek fonksiyonları geliştirici bir etkisi olduğunu düşündürmektedir ve önceki yıllarda yapılan kronik açlık çalışmalarının bellek üzerine olumlu etkileri ile de örtüşmektedir.

Ölçüm günü toplam katedilen mesafede denekler arası bir fark olmaması lokomotor aktivite bakımından deneklerin birbirine yakın bir performans gösterdiğinin göstergesidir. İlginç şekilde optogenetik olarak yapay açlık uyarılan grup ölçüm günü hedef kadranda daha uzun süre geçirmesine rağmen diğer gruplarla eşit mesafe katetmiştir. Bu bulgu deneklerin hareket güzergahlarını gösteren haritalar ile birlikte ele alındığında ChR2 grubunun hedef bölgeye geldiği ve fazla mobilize olmadan o bölgede platformu aramaya devam ettiğini göstermektedir. Bu nedenle hedef bölgede daha uzun kalmasına rağmen daha fazla mesafe katetmemiştir.

Bu çalışma ile eş zamanlı gerçekleştirilen bazı çalışmalarda AgRP hücrelerinin spesifik uyarısının kognitif davranış kalıplarına etkisi tartışılmış, AgRP hücrelerinin spesifik uyarısının anksiyojenik durumlardan korunma ve sosyal davranışlarada etkili olduğu bunun yanı sıra Y testinde besin odaklı karar verme davranışını değiştirdiği gösterilmiştir. Buradan hareketle AgRP nöronlarının açlığa bağlı besin alımını aşan bir motivasyon sisteminin odak noktası olabileceği düşünülmüştür (Burnett ve ark., 2016). Sonuçlar bizim çalışmamızla da yapay açlık uygulamasının kognitif performansı geliştirici etkisi bakımından paralellik göstermektedir. Ayrıca diğer kognitif faaliyetlerle AgRP hücrelerinin etkileşiminin nasıl olduğu konusunda yeni sorular doğurmuştur.

Bazı araştırmacılar uzun süreli açlık uygulamasının hipokampüsteki sinaptik plastisiteyi geliştirdiğini ve kognitif performanstaki artışın buna bağlı olabileceğini düşünmektedir (Mladenovic Djordjevic ve ark., 2010). Bu çalışmada elde edilen veriler önceki çalışmalarda kaydedilen kognitif performans artışı ile uyumludur. AgRP hücrelerinin uyarımı sonucu oluşan kognitif performans artışında nöral plastisitenin etkisi ayrı bir araştırma konusudur.

Bir kısım çalışmalar açlığın beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) gibi nöroprotektif ajanların artışına yol açarak yeni nöron oluşumunu tetiklediğini öne sürmüştür (Lee ve ark., 2002). AgRP hücrelerin uyarısı nöroportektif ajanların sentezinde ne düzeyde etkilidir? AgRP spesifik kognitif performans artışında elde edilen bu fenotip.

Beyinlerinde deneysel iskemik hasar oluşturulan bir hayvan modelinde açlığın BDNF ve diğer nöroprotektif proteinleri yükselterek inflamasyon ve ölüm oranlarını düşürdüğünü gösteren çalışmalar (Arumugam ve ark., 2010, Maswood ve ark., 2004) AgRP hücrelerinin aktivasyonun nöroprotektif etkisi ile yenilenmeye muhtaçtır.

Bazı çalışmalarda ise keton cisimlerinin nöroprotektif etkisinden hareketle, açlık esnasında ortaya çıkan ketosis tablosunun kognitif gelişimde etkili olabileceğini öne sürmektedir (Thaler ve ark., 2010). AgRP hücrelerinin uyarısının keton cisimlerini nasıl etkileyeceği de bir başka soru işaretini teşkil eder.

Kısa süreli açlığın otofajiyi tetiklemek sureti ile dokuların tazelenmesine katkı sağladığını düşündüren bulgular da vardır (Alirezaei ve ark., 2010). AgRP hücrelerinin uyarımı açlıkta artan otofajiyi taklit ederek nöron yenilenmesini ve kondisyonunu temin edebilir mi? AgRP uyarımı ve açlık esnasında oluşan otofaj arasında hücrenel moleküler bağlantılar olabilir.

Başka bir görüşe göre de açlık hipotalamusta stres proteini sentezine yol açarak olumlu etkiler göstermektedir (Aly ve ark., 1994). AgRP hücrelerinin spesifik uyarımının stres hormonu sentezine katkısı tam olarak nedir? Hipotalamo hipofizer aks üzerine olan etkileri nasıl gerçekteşmektedir? AgRP hücrelerin spesifik uyarımı

sonucu oluşan kognitif performans gelişimi stres hormonu üzerine yoğunlaşan çalışmalar ile uyumluluk gsteremeri yeni bilimsel sorularla beraber yeni çalışma alanları doğurmuştur.

Oksitatif stres ve inflamasyonu engelleyen süreçler ön planda olduğunu düşündüren çalışmalardan hareketle (Djuric ve ark., 1992) AgRP spesifik uyarımı sonucu oluşturulan yapay açlık oksitadif stresparametrelerini nasıl değiştirecektir.



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar açlığın kognitif fonksiyonlar üzerine olan geliştirici etkisinin AgRP nöronları üzerinden gerçekleştiğini göstermiştir. Bununla birlikte, daha önce yapılan çalışmalarda AgRP hücrelerinin hipokampüse bilinen doğrudan bir projeksiyonu bilinmemektedir. Böyle bir anatomik bağlantı olup olmadığı konusunda ileri çalışmalar yapılabilir. Anatomik bir bağlantı bulunmadığının teyidi durumunda AgRP hücreleri ile hipokampus arasında fonksiyonel bir bağlantının olabilir mi. Bu muhtemel fizyolojik bağlantı hangi merkezi projeksiyon nöronları üzerinden ilerlemektedir. Son bulgular, dikkatlerin MCH ve oreksinerjik sistem üzerine yoğunlaşmasını sağlamıştır. Ancak AgRP nin uyarılması sonucu ortaya çıkan öğrenme bellek fonksiyonlarındaki iyileşmenin tam olarak hangi mekanizmalar üzerinden olduğu araştırmaya muhtaçtır.

Önceki çalışmalarda açlığa bağlı olarak miktarının arttığı gösterilen BDNF ya da NPY gibi nöroprotektif proteinlerin AgRP nöronlarının uyarısına bağlı değişip değişmediği ikinci bir araştırma konusudur.

AgRP hücrelerinin mekansal öğrenmeye etkileri dışında obje tanıma, zamansal öğrenme, kısa ve uzun süreli bellek ve çalışan hafıza diğer kognitif fonksiyonlarla olan ilişkisi de ortaya konulmalıdır. Kognitif fonksiyonlar dışında açlık uygulamalarında elede edilen metabolik ve periferik etkilerinde düzenlenmesinden sorumlu sinir döngüleri araştırılmaya muhtaçtır.

Besin alımı davranışı insanlarda sadece bir metabolik ihtiyaçla değil sosyal bir besin alımı etkisi de bilinmektedir. Sosyal davranışların hipotalamik bağlantıları üzerine araştırmalar yoğunlaştırılabilir. Yine kronobiyojinin besin alımın regülasyonundaki etkileri ile AgRP hücrelerinin ilişkisi ortaya konulmaya muhtaçtır.

AgRP hücreleri bu çalışmanın da aralarında bulunduğu bir grup çalışma tarafından besin alımının dışında bir çok kognitif ve metabolik faaliyetlerin kavşak noktasında bulunmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- Adan, R. A. and W. H. Gispen (1997). Brain melanocortin receptors: from cloning to function. *Peptides* 18(8): 1279-1287.
- Ahima, R. S., C. B. Saper, J. S. Flier and J. K. Elmquist (2000). Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 21(3): 263-307.
- Airan RD, Thompson KR, Fenno LE, Bernstein H, Deisseroth K. Temporally precise in vivo control of intracellular signaling. *Nature* 2009;458(7241):1025–9.
- Alirezai, M., C. C. Kambal, C. T. Flynn, M. R. Wood, J. L. Whitton and W. B. Kiosses (2010). Short-term fasting induces profound neuronal autophagy. *Autophagy* 6(6): 702-710.
- Alp, M. İ., Demir. E.A, and Gergerlioğlu H.S (2014). Optogenetiğin Temelleri. *Eur J Basic Med Sci* 4(2): 37-43.
- Aly, K. B., J. L. Pipkin, W. G. Hinson, R. J. Feuers, P. H. Duffy and R. W. Hart (1994). Temporal and substrate-dependent patterns of stress protein expression in the hypothalamus of caloric restricted rats. *Mech Ageing Dev* 76(1): 1-10.
- Anand, B. K. and J. R. Brobeck (1951). Localization of a feeding center in the hypothalamus of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 77(2): 323-324
- Andralojc, K. M., A. Merzalli, K. W. Nowak, L. Albarello, R. Calcagno, L. Luzi, E. Bonifacio, C. Doglioni and L. Piemonti (2009). Ghrelin-producing epsilon cells in the developing and adult human pancreas. *Diabetologia* 52(3): 486-493.
- Anson, R. M., Z. Guo, R. de Cabo, T. Iyun, M. Rios, A. Hagepanos, D. K. Ingram, M. A. Lane and M. P. Mattson (2003). Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(10): 6216-6220.
- Aponte, Y., D. Atasoy and S. M. Sternson (2011). AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nat Neurosci* 14(3): 351-355
- Arumugam, T. V., T. M. Phillips, A. Cheng, C. H. Morrell, M. P. Mattson and R. Wan (2010). Age and energy intake interact to modify cell stress pathways and stroke outcome. *Ann Neurol* 67(1): 41-52.
- Atasoy, D., J. N. Betley, H. H. Su and S. M. Sternson (2012). Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature* 488(7410): 172-177.
- Barker, A. T., C. W. Garnham and I. L. Freeston (1991). Magnetic nerve stimulation: the effect of waveform on efficiency, determination of neural membrane time constants and the measurement of stimulator output. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl* 43: 227-237.
- Beninger, R. J., K. Jhamandas, R. J. Boegman and S. R. el-Defrawy (1986). Effects of scopolamine and unilateral lesions of the basal forebrain on T-maze spatial discrimination and alternation in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 24(5): 1353-1360.
- Betley, J. N., S. Xu, Z. F. Cao, R. Gong, C. J. Magnus, Y. Yu and S. M. Sternson (2015). Neurons for hunger and thirst transmit a negative-valence teaching signal. *Nature* 521(7551): 180-185.
- Boyden ES. A history of optogenetics: the development of tools for controlling brain circuits with light. *F1000 Biol Rep* 2011;3:11.
- Breasted JH. The Edwin Smith surgical papyrus. Chicago: Univ. of Chicago Press, 1930.
- Broberger, C., J. Johansen, C. Johansson, M. Schalling and T. Hokfelt (1998). The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(25): 15043-15048.
- Brodmann K, Gary LJ. Brodmann's localization in the cerebral cortex, The principles of comparative localisation in the cerebral cortex based on cytoarchitectonics. New York: Springer, 2006.
- Burnett, C. J., C. Li, E. Webber, E. Tsousidou, S. Y. Xue, J. C. Bruning and M. J. Krashes (2016). Hunger-Driven Motivational State Competition. *Neuron* 92(1): 187-201.

- Cannon, W. B. and A. L. Washburn (1993). An explanation of hunger. 1911. *Obes Res* 1(6): 494-500.
- Carlson, A. J. (1916). *The control of hunger in health and disease*. Chicago, Ill., The University of Chicago press.
- Chen, H. Y., M. E. Trumbauer, A. S. Chen, D. T. Weingarth, J. R. Adams, E. G. Frazier, Z. Shen, D. J. Marsh, S. D. Feighner, X. M. Guan, Z. Ye, R. P. Nargund, R. G. Smith, L. H. Van der Ploeg, A. D. Howard, D. J. MacNeil and S. Qian (2004). Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. *Endocrinology* 145(6): 2607-2612.
- Chen, Y. and Z. A. Knight (2016). Making sense of the sensory regulation of hunger neurons. *Bioessays* 38(4): 316-324.
- Chen, Y., Y. C. Lin, T. W. Kuo and Z. A. Knight (2015). Sensory detection of food rapidly modulates arcuate feeding circuits. *Cell* 160(5): 829-841.
- Clark, J. T., P. S. Kalra, W. R. Crowley and S. P. Kalra (1984). Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology* 115(1): 427-429
- Claridge-Chang A, Roorda RD, Vrontou E, Sjulson L, Li H, Hirsh J et al. Writing memories with light-addressable re- reinforcement circuitry. *Cell* 2009;139(2):405–15.
- Cone, R. D. (1999). The Central Melanocortin System and Energy Homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 10(6): 211-216.
- Cone, R. D. (2005). Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci* 8(5): 571-578.
- Cone, R. D., D. Lu, S. Koppula, D. I. Vage, H. Klungland, B. Boston, W. Chen, D. N. Orth, C. Pouton and R. A. Kesterson (1996). The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation. *Recent Prog Horm Res* 51: 287-317; discussion 318.
- Cowley, M. A., J. L. Smart, M. Rubinstein, M. G. Cerdan, S. Diano, T. L. Horvath, R. D. Cone and M. J. Low (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411(6836): 480-484.
- Cowley, M. A., R. G. Smith, S. Diano, M. Tschop, N. Pronchuk, K. L. Grove, C. J. Strasburger, M. Bidlingmaier, M. Esterman, M. L. Heiman, L. M. Garcia-Segura, E. A. Nillni, P. Mendez, M. J. Low, P. Sotonyi, J. M. Friedman, H. Liu, S. Pinto, W. F. Colmers, R. D. Cone and T. L. Horvath (2003). The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37(4): 649-661.
- Crick FH. Thinking about the brain. *Sci Am* 1979;241(3):219– 32.
- Davis, L. M., J. R. Pauly, R. D. Readnower, J. M. Rho and P. G. Sullivan (2008). Fasting is neuroprotective following traumatic brain injury. *J Neurosci Res* 86(8): 1812-1822.
- Deisseroth, K., G. Feng, A. K. Majewska, G. Miesenbock, A. Ting and M. J. Schnitzer (2006). Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits. *J Neurosci* 26(41): 10380-10386.
- Della-Zuana, O., F. Presse, C. Ortola, J. Duhault, J. L. Nahon and N. Levens (2002). "Acute and chronic administration of melanin-concentrating hormone enhances food intake and body weight in Wistar and Sprague-Dawley rats." *Int J Obes Relat Metab Disord* 26(10): 1289-1295.
- Dietrich, M. O., M. R. Zimmer, J. Bober and T. L. Horvath (2015). Hypothalamic Agrp neurons drive stereotypic behaviors beyond feeding. *Cell* 160(6): 1222-1232.
- Djuric, Z., M. H. Lu, S. M. Lewis, D. A. Luongo, X. W. Chen, L. K. Heilbrun, B. A. Reading, P. H. Duffy and R. W. Hart (1992). Oxidative DNA damage levels in rats fed low-fat, high-fat, or calorie-restricted diets. *Toxicol Appl Pharmacol* 115(2): 156-160.
- Elmqvist, J. K., C. F. Elias and C. B. Saper (1999). From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* 22(2): 221-232.
- Erickson, J. C., K. E. Clegg and R. D. Palmiter (1996). Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. *Nature* 381(6581): 415-421.
- Fernandes, G., E. J. Yunis and R. A. Good (1976). Influence of diet on survival of mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(4): 1279-1283.

- Friedman, J. M. and J. L. Halaas (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395(6704): 763-770.
- Gao, Q. and T. L. Horvath (2007). Neurobiology of feeding and energy expenditure. *Annu Rev Neurosci* 30: 367-398.
- Goodrick, C. L., D. K. Ingram, M. A. Reynolds, J. R. Freeman and N. L. Cider (1983). Effects of intermittent feeding upon growth, activity, and lifespan in rats allowed voluntary exercise. *Exp Aging Res* 9(3): 203-209.
- Gradinaru V, Thompson KR, Deisseroth K. eNpHR: a Natronomonas halorhodopsin enhanced for optogenetic applications. *Brain Cell Biol* 2008;36(1-4):129-39.
- Gradinaru V, Thompson KR, Zhang F, Mogri M, Kay K, Schneider MB et al. Targeting and Readout Strategies for Fast Optical Neural Control In Vitro and In Vivo. *Journal of Neuroscience* 2007;27(52):14231-8.
- Gray, S. J., V. W. Choi, A. Asokan, R. A. Haberman, T. J. McCown and R. J. Samulski (2011). Production of recombinant adeno-associated viral vectors and use in in vitro and in vivo administration. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 4: Unit 4 17.
- Gropp, E., M. Shanabrough, E. Borok, A. W. Xu, R. Janoschek, T. Buch, L. Plum, N. Balthasar, B. Hampel, A. Waisman, G. S. Barsh, T. L. Horvath and J. C. Bruning (2005). Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. *Nat Neurosci* 8(10): 1289-1291.
- Gunion, M. W., G. L. Kauffman, Jr. and Y. Tache (1990). Intrahypothalamic corticotropin-releasing factor elevates gastric bicarbonate and inhibits stress ulcers in rats. *Am J Physiol* 258(1 Pt 1): G152-157.
- Hahn, T. M., J. F. Breininger, D. G. Baskin and M. W. Schwartz (1998). Coexpression of AgRP and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci* 1(4): 271-272.
- Halagappa, V. K., Z. Guo, M. Pearson, Y. Matsuoka, R. G. Cutler, F. M. Laferla and M. P. Mattson (2007). Intermittent fasting and caloric restriction ameliorate age-related behavioral deficits in the triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 26(1): 212-220.
- Hall, J. E. and A. C. Guyton (2011). *Guyton and Hall textbook of medical physiology*. Philadelphia, Pa., Saunders/Elsevier.
- Haynes, A. C., B. Jackson, P. Overend, R. E. Buckingham, S. Wilson, M. Tadayyon and J. R. Arch (1999). Effects of single and chronic intracerebroventricular administration of the orexins on feeding in the rat. *Peptides* 20(9): 1099-1105.
- Hervey, G. R. (1959). The effects of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats. *J Physiol* 145(2): 336-352.
- Hinney, A., A. Schmidt, K. Nottebom, O. Heibult, I. Becker, A. Ziegler, G. Gerber, M. Sina, T. Gorg, H. Mayer, W. Siegfried, M. Fichter, H. Renschmidt and J. Hebebrand (1999). Several mutations in the melanocortin-4 receptor gene including a nonsense and a frameshift mutation associated with dominantly inherited obesity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 84(4): 1483-1486.
- Huszar, D., C. A. Lynch, V. Fairchild-Huntress, J. H. Dunmore, Q. Fang, L. R. Berkemeier, W. Gu, R. A. Kesterson, B. A. Boston, R. D. Cone, F. J. Smith, L. A. Campfield, P. Burn and F. Lee (1997). Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88(1): 131-141.
- Ingram, D. K., R. Weindruch, E. L. Spangler, J. R. Freeman and R. L. Walford (1987). Dietary restriction benefits learning and motor performance of aged mice. *J Gerontol* 42(1): 78-8
- Iwai Y, Honda S, Ozeki H, Hashimoto M, Hirase H. A simple head-mountable LED device for chronic stimulation of op- togenetic molecules in freely moving mice. *Neurosci Res* 2011;70(1):124-7.
- Kennedy, G. C. (1953). The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 140(901): 578-596.
- Kipnis N. S. Luigi Galvani and the debate on animal electricity, 1791-1800. London, 1987.
- Kipnis, J., S. Gadani and N. C. Derecki (2012). Pro-cognitive properties of T cells. *Nat Rev Immunol* 12(9): 663-669.

- Kojima, M., H. Hosoda, Y. Date, M. Nakazato, H. Matsuo and K. Kangawa (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402(6762): 656-660.
- Kojima, M., H. Hosoda, H. Matsuo and K. Kangawa (2001). Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Trends Endocrinol Metab* 12(3): 118-122.
- Krashes, M. J., S. Koda, C. Ye, S. C. Rogan, A. C. Adams, D. S. Cusher, E. Maratos-Flier, B. L. Roth and B. B. Lowell (2011). Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. *J Clin Invest* 121(4): 1424-1428.
- Lambert, P. D., P. R. Couceyro, K. M. McGirr, S. E. Dall Vechia, Y. Smith and M. J. Kuhar (1998). CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y. *Synapse* 29(4): 293-298.
- Lee, J., W. Duan and M. P. Mattson (2002). Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem* 82(6): 1367-1375.
- Li, E., H. Chung, Y. Kim, D. H. Kim, J. H. Ryu, T. Sato, M. Kojima and S. Park (2013). "Ghrelin directly stimulates adult hippocampal neurogenesis: implications for learning and memory." *Endocr J* 60(6): 781-789.
- Li, L., Z. Wang and Z. Zuo (2013). Chronic intermittent fasting improves cognitive functions and brain structures in mice. *PLoS One* 8(6): e66069.
- Lima, S. Q. and G. Miesenbock (2005). Remote control of behavior through genetically targeted photostimulation of neurons. *Cell* 121(1): 141-152.
- Lenard, N. R. and H. R. Berthoud (2008). Central and peripheral regulation of food intake and physical activity: pathways and genes. *Obesity (Silver Spring)* 16 Suppl 3: S11-22.
- Luquet, S., F. A. Perez, T. S. Hnasko and R. D. Palmiter (2005). NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science* 310(5748): 683-685.
- Lytle, L. D. and B. A. Campbell (1975). Effects of lateral hypothalamic lesions on consummatory behavior in developing rats. *Physiol Behav* 15(3): 323-331.
- Mandelblat-Cerf, Y., R. N. Ramesh, C. R. Burgess, P. Patella, Z. Yang, B. B. Lowell and M. L. Andermann (2015). Arcuate hypothalamic AgRP and putative POMC neurons show opposite changes in spiking across multiple timescales. *Elife* 4.
- Marsh, D. J., G. Hollopeter, K. E. Kafer and R. D. Palmiter (1998). Role of the Y5 neuropeptide Y receptor in feeding and obesity. *Nat Med* 4(6): 718-721.
- Maswood, N., J. Young, E. Tilmont, Z. Zhang, D. M. Gash, G. A. Gerhardt, R. Grondin, G. S. Roth, J. Mattison, M. A. Lane, R. E. Carson, R. M. Cohen, P. R. Mouton, C. Quigley, M. P. Mattson and D. K. Ingram (2004). Caloric restriction increases neurotrophic factor levels and attenuates neurochemical and behavioral deficits in a primate model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(52): 18171-18176.
- Mattson, M. P. (2000). Neuroprotective signaling and the aging brain: take away my food and let me run. *Brain Res* 886(1-2): 47-53.
- Matsuno-Yagi A, Mukohata Y. Two possible roles of bacteri- orhodopsin; a comparative study of strains of *Halobacterium halobium* differing in pigmentation. *Biochem Biophys Res Commun* 1977;78(1):237-43.
- Mayer, J. (1952). The glucostatic theory of regulation of food intake and the problem of obesity. *Bull New Engl Med Cent* 14(2): 43-49.
- Mayer, J. (1953). Glucostatic mechanism of regulation of food intake. *N Engl J Med* 249(1): 13-16.
- Mayer, J. and M. W. Bates (1952). Blood glucose and food intake in normal and hypophysectomized, alloxan-treated rats. *Am J Physiol* 168(3): 812-819.
- Mayer, J., J. J. Vitale and M. W. Bates (1951). Mechanism of the regulation of food intake. *Nature* 167(4249): 562-563.

- McCay, C. M., M. F. Crowell and L. A. Maynard (1989). The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. *Nutrition* 5(3): 155-171; discussion 172.
- Mieda, M., S. C. Williams, J. A. Richardson, K. Tanaka and M. Yanagisawa (2006). The dorsomedial hypothalamic nucleus as a putative food-entrainable circadian pacemaker. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(32): 12150-12155.
- Mladenovic Djordjevic, A., M. Perovic, V. Tesic, N. Tanic, L. Rakic, S. Ruzdijic and S. Kanazir (2010). Long-term dietary restriction modulates the level of presynaptic proteins in the cortex and hippocampus of the aging rat. *Neurochem Int* 56(2): 250-255.
- Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P et al. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(24):13940–5.
- Neher E, Sakmann B, Steinbach JH. The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflügers Arch* 1978;375(2):219–28.
- Oesterhelt D, Stoeckenius W. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nature New Biol* 1971;233(39):149–52.
- Ollmann, M. M., B. D. Wilson, Y. K. Yang, J. A. Kerns, Y. Chen, I. Gantz and G. S. Barsh (1997). Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 278(5335): 135-138.
- Padilla, S. L., J. Qiu, M. E. Soden, E. Sanz, C. C. Nestor, F. D. Barker, A. Quintana, L. S. Zweifel, O. K. Ronnekleiv, M. J. Kelly and R. D. Palmiter (2016). Agouti-related peptide neural circuits mediate adaptive behaviors in the starved state. *Nat Neurosci* 19(5): 734-741.
- Piccolino, M. (1998). Animal electricity and the birth of electrophysiology: the legacy of Luigi Galvani. *Brain Res Bull* 46(5): 381-407.
- Pierroz, D. D., C. Catzeflis, A. C. Aebi, J. E. Rivier and M. L. Aubert (1996). Chronic administration of neuropeptide Y into the lateral ventricle inhibits both the pituitary-testicular axis and growth hormone and insulin-like growth factor I secretion in intact adult male rats. *Endocrinology* 137(1): 3-12.
- Potter H. Transfection by electroporation. *Curr Protoc Neurosci* 2001;Appendix 1:Appendix 1E.
- Pupe, S. and A. Wallen-Mackenzie (2015). Cre-driven optogenetics in the heterogeneous genetic panorama of the VTA. *Trends Neurosci* 38(6): 375-386.
- Qian, S., H. Chen, D. Weingarh, M. E. Trumbauer, D. E. Novi, X. Guan, H. Yu, Z. Shen, Y. Feng, E. Frazier, A. Chen, R. E. Camacho, L. P. Shearman, S. Gopal-Truter, D. J. MacNeil, L. H. Van der Ploeg and D. J. Marsh (2002). Neither agouti-related protein nor neuropeptide Y is critically required for the regulation of energy homeostasis in mice. *Mol Cell Biol* 22(14): 5027-5035.
- Saito, M., T. Iwawaki, C. Taya, H. Yonekawa, M. Noda, Y. Inui, E. Mekada, Y. Kimata, A. Tsuru and K. Kohno (2001). Diphtheria toxin receptor-mediated conditional and targeted cell ablation in transgenic mice. *Nat Biotechnol* 19(8): 746-750.
- Sato, M., M. Murakami, K. Node, R. Matsumura and M. Akashi (2014). The role of the endocrine system in feeding-induced tissue-specific circadian entrainment. *Cell Rep* 8(2): 393-401
- Schwartz, M. W. and D. Porte, Jr. (2005). Diabetes, obesity, and the brain. *Science* 307(5708): 375-379.
- Schwartz, M. W., R. J. Seeley, L. A. Campfield, P. Burn and D. G. Baskin (1996). "Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus." *J Clin Invest* 98(5): 1101-1106
- Schwartz, M. W., A. J. Sipols, J. L. Marks, G. Sanacora, J. D. White, A. Scheurink, S. E. Kahn, D. G. Baskin, S. C. Woods, D. P. Figlewicz and Ve ark., (1992). Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology* 130(6): 3608-3616.
- Schwartz, M. W., S. C. Woods, D. Porte, Jr., R. J. Seeley and D. G. Baskin (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature* 404(6778): 661-671.
- Sims, J. S. and J. F. Lorden (1986). Effect of paraventricular nucleus lesions on body weight, food intake and insulin levels. *Behav Brain Res* 22(3): 265-281.

- Stanford Üniversitesi Web Sitesi, 2017. <http://web.stanford.edu/group/dlab/cgi-bin/graph/chart.php>
- Sohal, R. S. and R. Weindruch (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273(5271): 59-63.
- Sohn, J. W. (2015). Network of hypothalamic neurons that control appetite. *BMB Rep* 48(4): 229-233.
- Sporns O, Tononi G, Kötter R. The Human Connectome: A Structural Description of the Human Brain. *PLoS Comp Biol* 2005;1(4):e42.
- Stewart, J., J. Mitchell and N. Kalant (1989). "The effects of life-long food restriction on spatial memory in young and aged Fischer 344 rats measured in the eight-arm radial and the Morris water mazes." *Neurobiol Aging* 10(6): 669-675.
- Thaler, S., T. J. Choragiewicz, R. Rejdak, M. Fiedorowicz, W. A. Turski, M. Tulidowicz-Bielak, E. Zrenner, F. Schuettauf and T. Zarnowski (2010). Neuroprotection by acetoacetate and beta-hydroxybutyrate against NMDA-induced RGC damage in rat--possible involvement of kynurenic acid. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 248(12): 1729-1735.
- Vorhees, C. V. and M. T. Williams (2006). Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc* 1(2): 848-858.
- Hetherington A. W. and Ranson S. W. (1983). Nutrition Classics. The Anatomical Record, Volume 78, 1940: Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *Nutr Rev* 41(4): 124-127.
- Howarth JL, Lee YB, Uney JB. Using viral vectors as gene transfer tools (Cell Biology and Toxicology Special Issue: ETCS-UK 1 day meeting on genetic manipulation of cells). *Cell Biol Toxicol* 2010;26(1):1–20.
- Wangensteen O. H. ve Carlson H. A. (1931). Hunger Sensations in a Patient After Total Gastrectomy. *Experimental Biology and Medicine* Vol 28, Issue 5.
- Weindruch, R., R. L. Walford, S. Fligiel and D. Guthrie (1986). The retardation of aging in mice by dietary restriction: longevity, cancer, immunity and lifetime energy intake. *J Nutr* 116(4): 641-654.
- Williams SC, Deisseroth K. Optogenetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013;110(41):16287.
- Witte, A. V., M. Fobker, R. Gellner, S. Knecht and A. Floel (2009). Caloric restriction improves memory in elderly humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(4): 1255-1260.
- Woods, S. C., R. J. Seeley, D. Porte, Jr. and M. W. Schwartz (1998). Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* 280(5368): 1378-1383.
- Wu, A., F. Wan, X. Sun and Y. Liu (2002). Effects of dietary restriction on growth, neurobehavior, and reproduction in developing Kunmin mice. *Toxicol Sci* 70(2): 238-244.
- Yapici, N., M. Zimmer and A. I. Domingos (2014). Cellular and molecular basis of decision-making. *EMBO Rep* 15(10): 1023-1035
- Yao J, Hou W, Yin Z. Optogenetics: a novel optical manipulation tool for medical investigation. *Int J Ophthalmol* 2012;5(4):517–22.
- Zemelman BV, Miesenböck G. Genetic schemes and schemata in neurophysiology. *Curr Opin Neurobiol* 2001;11(4):409– 14.
- Zhang F, Wang L, Brauner M, Liewald JF, Kay K, Watzke N et al. Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature* 2007;446(7136):633–9.
- Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold and J. M. Friedman (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372(6505): 425-432.

EKLER



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

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
08/11/2016	78		Yrd. Doç. Dr. Deniz ATASOY

“Açlık Kuramına Yeni Bir Bakış: Arkuat Çekirdeğin Optogenetik Olarak Uyarılmasının Kognitif Fonksiyonlar Üzerine Etkisi” başlıklı bilimsel araştırma Etik Kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “oybirliği” ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 2 ay

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

ÖZGEÇMİŞ

Dr. Muhammed İkbal Alp İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesinde lisans eğitimini 2010 yılında tamamladı. Bir süre Şanlıurfa Akçakale'de pratisyen hekim olarak çalıştıktan sonra Konya 112 Ambulans Hizmetleri Komuta Kontrol Merkezinde danışman hekimlik yaptı. İki yıl Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi yerel etik kurulun üyeliği yanısıra Selçuk Üniversitesi Sinirbilim Araştırmaları Merkezi yönetim kurulu üyeliği yaptı. 2015 yılından itibaren Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalında Öğretim görevlisi olarak çalışan Dr. İkbal, Medipol Üniversitesi Genetik Tanı Merkezi müdürlüğü yanısıra Medipol Üniversitesi Geleneksel Tedaviler Araştırma ve Uygulama Merkezi ve Medipol Üniversitesi Reneratif ve Restoratif Araştırmalar Merkezinde açlık ve tokluğun sinirsel bağlantıları üzerine sinirbilim araştırmalarına devam etmektedir. Bilimsel hakemli dergilerde yayınlanmış iki makalesi çeşitli platformlarda bilimsel sunumları bulunmaktadır. Ulusal Fizyoloji Derneği, Türkiye Sinirbilimleri ve Beyin Araştırmaları Derneği yanı sıra Society for Neuroscience üyeliği bulunmaktadır. 13. Ulusal Sinirbilim Kongresi genel sekreterliği ve 15. Ulusal Sinirbilim Kongresi düzenleme kurulu üyeliği yanısıra, Hücresel ve Moleküler Sinirbilim çalışma grubu üyesidir. Bu grubun düzenlediği Sinirbilim Günleri etkinliğinde 3 dönem genel sekterelik yaptı. Türkiyede ilk defa olmak üzere 2015 yılında Medipol Üniversitesi bünyesinde Optogenetik Uygulamalar Kursu düzenledi. 2012 yılından itibaren yüzün üzerinde konferans ve bilimsel etkinlik düzenledi. Doktorasını Selçuk Üniversitesi Fizyoloji Doktora Programında 2017 yılında tamamladı.