

T.C.  
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KRONİK YÜKSEK KALORİLİ DİYETİN  
MEDİOBAZAL HİPOTALAMİK TOKLUK SINIR  
AĞLARININ İŞLEYİŞİNE ETKİLERİ**

Doktora Tezi  
Özge BAŞER

İSTANBUL-2023

T.C.  
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KRONİK YÜKSEK KALORİLİ DİYETİN  
MEDIÖBAZAL HİPOTALAMİK TOKLUK SINIR  
AĞLARININ İŞLEYİŞİNE ETKİLERİ**

Doktora Tezi

Özge BAŞER

DANIŞMAN

Prof. Dr. BAYRAM YILMAZ

İSTANBUL-2023

## TEZ ONAYI FORMU

Kurum : Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Program : Fizyoloji

Tez Başlığı : Kronik yüksek kalorili diyetin mediobazal hipotalamik tokluk sinir ağlarının işleyişine etkileri

Tez Sahibi : Özge BAŞER

Sınav Tarihi : 14.11.2023

	Unvanı, Adı-Soyadı (Kurumu)
Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Bayram YILMAZ Yeditepe Üni. Fizyoloji ABD
Tez danışmanı:	Prof. Dr. Bayram YILMAZ Yeditepe Üni. Fizyoloji ABD
Üye:	Prof. Dr. Burcu GEMİCİ BAŞOL Yeditepe Üni. Fizyoloji ABD
Üye:	Prof. Dr. Mehtap KAÇAR Yeditepe Üni. Fizyoloji ABD
Üye:	Prof. Dr. Selim KUTLU Necmettin Erbakan Üni. Fizyoloji ABD
Üye:	Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ İst. Medeniyet Üni. Fizyoloji ABD

ONAY

Bu tez Yeditepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun ...../...../..... tarih ve .....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Bayram YILMAZ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



## BEYAN

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

20.10.2023

Özge Başer



## İTHAF

Her zaman beni destekleyen değerli ailem  
Hakan, Nihal ve Alper Başer'e ithaf edilmiştir.

## TEŞEKKÜR

Değerli öğretmenlerim Prof.Dr. Bayram Yılmaz'a, Prof.Dr. Burcu Gemici Başol'a ve Prof.Dr. Mehtap Kaçar'a Yeditepe'de bulunduğum zaman boyunca bana kattıkları vizyon, bilgi, beceri ve sundukları imkanlar için teşekkür ediyorum. Hocalarımdan öğrendiğim sabır, özveri, ahlak ve başarı değerlerini ömrümce yaptığım her işe aksettireceğime söz veriyorum. Burada içinde bulunduğum her değerli proje için teşekkür ediyorum. Öğretmenlerimin bana sunduğu sıcak ve hoşgörülü ortam sayesinde özgürce üretebilme ve bu mutluluğunun beni hem kişisel hem de beceri anlamında geliştirdiğine inanıyorum.

Değerli hocam Prof. Dr. Bayram Yılmaz'ın enerjisi ve iş bitiriciliği, birbirinden kıymetli birçok rolünün altından başarıyla kalkabilmesi, 6. katta bir işten diğerine koşurken gördüğümüz ve sonunda başarılarını alkışladığımız hocamız, alanımızda ve Türkiye'de 'nasıl başarılı olunur?'un önümüzde çok güzel bir örneğini oluşturuyor. İletişimin, kopmayan bağların ve ortaklıkların bilimin birlikte daha iyi yapıldığının güzel bir örneğini ise bize diğer üniversitelerde bulunan değerli hocalarımız ile yürüttüğümüz projeler, konferanslar, kurslar ve yayınlar ile öğretmiştir. Öğrencilerine her daim güven ve barış ortamı sağlamış, istediklerini her daim yapabilecekleri konusunda desteklemiş ve yüreklendirmiştir. Kimi zaman ise bırakmaya meyledenleri yolda tutarak yöneticilik becerilerini konuşturmuştur. Bugüne gelebildiysem bu sayededir ve doktora başlamamda beni ikna ettiği için kendisine teşekkür ediyorum.

Prof. Dr. Burcu Gemici Başol ve Prof. Dr. Mehtap Kaçar hocalarım ise her daim bana örnek olmuş ve zor zamanlarımda sakin birer liman olmayı bilmiş, desteklerini hiç esirgememiş ve beni her zaman değerli bir asistan, insan ve meslektaş olarak hissettirmiş olmalarıyla benim için çok özellerdir. Bu yedi sene zaman zarfında bir yüksek lisans ve bir doktora yapmış ve hocalarımla birçok ders paylaşma şansına erişmiş, 'nasıl öğretmen olunur, öğrenciye nasıl yaklaşılr, ders nasıl sevdirilir, bilim nasıl paylaşılır?' konularında cevaplarımı onlardan en güzel şekilde almış bulunmaktayım. Burada onlarla olan paylaşımlarımı, gördüğüm sevgi ve desteği bir daha nerede nasıl bulacağımı bilmesem de aramaya degeceğini biliyorum. Ve her daim hatıralarımla kalacaklar.

Yüksek lisans ve doktora dönemim boyunca bana destek olan, üzerimde emeği olan, bana yol gösteren tüm hocalarıma başta Prof. Dr. Ece Genç, Prof. Dr. Aylin Yaba Uçar, Prof. Dr. Selim Kutlu, Prof. Dr. Ertuğrul Kılıç, Prof. Dr. Ahmet Ayar, Prof. Dr. Süleyman Sandal, Prof. Dr. Nurettin Aydoğdu, Doç. Dr. G. Seda Güleç Yılmaz, Doç. Dr. Bilge Güvenç Tuna ve Dr. Aikaterini Panteli'ye teşekkürlerimi sunarım.

Doktora sürecinde Amerika'da Dr. Srdjan Antic'in laboratuvarında çalışma deneyimini kazanmama vesile olan Sayın Hocalarım Prof.Dr. Bayram Yılmaz ve Prof. Dr. Gülderen Yanıkkaya Demirel'e ve süreçte yanımızda olan Dr. Başak Aru'ya emekleri için teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim öğretim döneminde sadece öğrenci olarak değil, lisans öğrencilerine öğretmen olarakta deneyim kazandığım şu süreçte, birlikte öğrendiğimiz canım arkadaşlarıma bana sundukları tüm destek ve öğrettikleri her şey için, tüm yol arkadaşlıkları için teşekkür ederim. Bu süreçte birçok ödül, düğün, doğum gibi kutlama vesilelerimiz olurken,

projelerde karşılaşılan zorluklar, psikolojik zor dönemler, hastalıklar, yakınlarımızın başına gelen durumlar da destek olunacak durumları yarattı. Hepsinde de birarada durabilmek destek olup birlikte gülüp ağlamak bizi biz yapabildi. Bu doktorayı bitirirken kendimdeki gelişmeleri görüyor, geriye bakılırken duyumsanan o buruk keşşeler ve iyikilerin yüzde bıraktığı tebessümle hepsine teşekkür ediyorum.

Bu tez bir TÜBİTAK 1001 projesi (118S245) olduğundan, tezimde birçok yardım aldım. Bu tezin oluşmasında ve makaleye dönüşüm süreçlerinde katkı sunan, elektrofizyoloji, konfokal görüntüleme ve intrakraniyal enjeksiyon gibi birçok tekniği gözetiminde öğrendiğim ve yüksek lisans tezimde de eş danışmanım olan Doç. Dr. Deniz Atasoy'a teşekkür ediyorum. Süreçte bana can-ı gönülden yardım eden arkadaşlarım; her daim beni desteklediğini bildiğim ve kendim olma yolculuğumun her anında yanımda olan Deniz Öykü Özen'e, insanlara yardım etmeyi kendine görev bilen ve her zaman en yakın aile danışanımız-eczacımız Dr. Buğra Özgün'e, destekleyici arkadaşlığı ve makalesinin yazım aşamalarındaki sonsuz katkılarından dolayı Dr. Yavuz Yavuz'a, projede olmamasına rağmen yardımlarını esirgemeyen ve benimle olan Zehra Yağmur Erol'a, proje sonlanmalarında bana destek olan ve bizlere kapısı her zaman açık Dr. Engin Sümer'e, ve deney hayvanlarıyla ilgili her aşamada emeğini ve desteğini gördüğüm Ramazan Güney'e, tanıdığıma sevindiğim ve kaliteli sorularıyla ekibi zenginleştiren Cihan Civan Civaş'a, projeye ve dolayısıyla tezimi bitirmeme olan katkılarından dolayı teşekkürü bir borç bilirim. Bu tez haricinde birlikte birçok projede bulunduğum ya da doktora yolculuğumda her alanda manevi desteklerini aldığım, çok farklı alanlarda bana ufuk olan sevgili arkadaşlarım; alanında uzman ve örnek aldığım titiz çalışması ile Meltem Yalçın Oğuz, özverili çalışmalarıyla örnek aldığım Dr. B. Tuvana Us, örnek öğrenme isteği ve çalışkanlığıyla birden çok projede birlikte çalışmaktan keyif aldığım Meyli Ezgi Karagöz, bana hep iyi gelmiş olan Nida Bekar, en eski dostlarımdan Dr. Ecem Yıldırım ve Dr. Tuğçe Önel, kızımın biricik doktoru benim çalışkan arkadaşım Vet Hek. Dr. Edibe Bilişli, hobi kardeşim güler yüzlü Dr. Ahmet Saç, çalışkan yeni nesilden, yardımsever arkadaşlarım Habibe Gören, Uğur F. Kalkan ve in vitro çalışmalarımızda bana yol gösteren yeni ekip arkadaşım Busenur Bolat, bir dönem bizimle olan candan arkadaşım İskalen Cansu Topçu Okan, önümde bana örnek olan, tüm sorularıma cevap olan ve desteklerini hep bildiğim ve bana çok şey öğreten iki başarılı bilim insanı arkadaşım Dr. Siğnem Eyuboğlu ve Dr. M.Sinem Ethemoglu Sarı, değerli Dr. Sami Ağuş ve sevgili Dr. Özge Atasayan, ekibimizin akıl hocası abimiz sevgili Dr. Volkan Adem Bilgin ve ekibimize iyi ki gelmiş olan her konuda yardımsever güler yüzlü, dürüst arkadaşım Yunus Kosif'e, mezuniyetten sonra bana in vitro çalışmalarında yol gösteren Dr. Cihan Erdoğan'a, iş dünyasındaki yol göstericim sevgi dolu iletişimi ile Esra İlhan'a, eğlenceli kişiliği ile Begüm Yalçın, teknik yardımları için abimiz Hasan Koç'a ve Adem Akyıldırım'a, tüm gün bizlerle olan çalışma ortamımızı yaşanılır kılan Gülseren ve Hanife Ablalarım'a ve tüm bahsetmeyi unuttuğum tüm Yeditepe ailesine teşekkürlerimi sunarım.

Mert Yılmaz, Çağla Akagündüz, Gülşah Alcan, Dr. Fulya Köksalar Alkan, Dr. Sidar Aydın, Dr. Kıvılcım Kılıç sürecimi keyifle paylaştığım, bana güvenip desteklemiş kıymetli dostlarımdır ve desteklerine, bana olan güzel motivasyonlarına her zaman minnettarım.

Meslektaş olmaktan gurur duyacağım pek çok tanıdık ve arkadaş edinmiş olarak bu dönemi bitiriyor olmaktan büyük kıvanç duyuyorum.

Bu tez Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK, proje no: #118S245) tarafından desteklenmiştir.

Son olarak, her günümüzü öğrenmeye adadağımız bu yolculukta benimle olan ve maddi manevi beni ayakta tutan sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım. Her zaman arkamda olduklarını bildiğim ve gururlandırmak istediğim çekirdek ve geniş ailemle bu sürecimi paylaşabilidiğim için ne kadar şanslı olduğumun farkındayım ve herbirine ayrı ayrı teşekkür ediyorum. Saf sevgisiyle her zaman yanımda olan Roxy ve iki senedir öz-kızım gibi olan Rosie hayattaki diğer şanslarımdır. Doğa sevgisi, doğayı anlama arayışı beni doktora eğitimine, bilime yönlendiren esas değerlerdir. Bu sorunun peşinde koşarken benimle heyecanlanan yolumun keşiştiği herkese sonsuz teşekkürler, sevgiler sunuyorum.



## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI FORMU .....	ii
BEYAN .....	iv
İTHAF .....	v
TEŞEKKÜR .....	vi
İÇİNDEKİLER .....	ix
TABLOLAR LİSTESİ .....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xiii
ÖZET .....	xviii
ABSTARCT .....	xx
1. GİRİŞ ve AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Hipotalamusta Enerji Metabolizması .....	3
2.1.1. Hipotalamus .....	3
2.1.2. Arkuat Nükleus .....	3
2.1.3. Merkezi melanokortin sistemi .....	4
2.1.4. Heterojen POMC sistemi .....	5
2.1.5. Pro-opiomelanokortin sistemi ve düzenlenmesi .....	9
2.2. Hipotalamus ve Obezite .....	13
2.2.1. Leptin hormonu ve POMC ilişkisi .....	13
2.2.2. Yüksek yağlı diyet ve obezite ilişkisi .....	15
3. GEREÇ ve YÖNTEM .....	17
3.1. Deney Hayvanları .....	17
3.2. Farelerin Üretim .....	17
3.3. Genotipleme .....	17
3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Agaroz Jel Elektroforezi .....	17

3.5. Cre rekombinaz Bağımlı AAV virüslerin İntrakraniyal Enjeksiyonu .....	19
3.6. Beyin Kesiti Hazırlanması.....	21
3.7. Elektrofizyoloji kayıtları (Patch clamp) .....	22
3.8. Beslenme Davranışı .....	23
3.9. Kardiyak Perfüzyon/Fiksasyon ile Deney Sonlandırma ve Postmortem Beyin Dokusunun Saklanması.....	24
3.10. ELİSA Yöntemiyle Serum Leptin Analizi .....	25
3.11. C-Fos İmmünohistokimyasal Boyama .....	26
3.12. Konfokal Mikroskopi .....	26
3.13. Morfolojik Analiz .....	26
3.13.1. Dendrit ve aksonal sayımlar .....	26
4. BULGULAR .....	29
4.1. Yüksek Yağlı Diyetin POMC Nöron Anatomisine Anatomik Etkisi .....	29
4.2. Yüksek Yağlı Diyetin POMC Nöronlarının Elektrofizyolojik Özelliklerine Etkisi .....	32
4.3. Yüksek Yağlı Diyetin POMC Nöron Davranışsal Özelliklerine Etkisi.....	35
4.4. Vücut Ağırlık Takibi.....	39
4.5. Kanda ölçülen parametreler .....	41
4.5.1. Glikoz .....	41
4.5.2. Leptin.....	42
4.5.3. Kolesterol .....	43
4.6. İmmünohistokimyasal <i>c-Fos</i> boyaması.....	45
5. TARTIŞMA.....	46
6. KAYNAKLAR .....	50
7.İntihal Raporu İlk Sayfası .....	59
1. Özgeçmiş .....	60

## TABLÖLAR LİSTESİ

**Tablo 3.1.** Genotipleme için kullanılan p2r solüsyonunun hazırlanması için kullanılan konsantrasyon ve hacim değerleri.....18

**Tablo 3.2.** Genotipleme için kullanılan p2r koşulları.....18



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Klasik leptin-melanokortin modeli.....	5
Şekil 2.2. POMC nöron alt tiplerini tanımlamak için kullanılan mevcut sınıflandırmalar.....	8
Şekil 2.3. ARC / NTS POMC nöronlarına yönelik başlıca presinaptik girdilerin şematik gösterimi.....	9
Şekil 2.4. POMC nöronal aktivitesini düzenleyen POMC protein işleme ve sinyal yolları.....	12
Şekil 2.5. Leptinin hipotalamustaki fonksiyonel rolüne şematik gösterimi.....	14
Şekil 2.6. YYD ile beslenmenin POMC nöronlarına zararlı etkileri.....	16
Şekil 3.1. Agaroz jel (% 2'lik) içerisinde yürütülmüş Cre pzs reaksiyon görüntüsü.....	19
Şekil 3.2. Stereotaksik cihaza yerleştirilen farede cam pipetle virüs enjeksiyonu.....	20
Şekil 3.3. Beyin kesitlerinin alınması.....	21
Şekil 3.4. Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin Araştırmaları Laboratuvarı.....	22
Şekil 3.5. Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin Araştırmaları Laboratuvarı .....	23
Şekil 3.6. Agaroz gömülü beyin dokusundan vibratom kullanılarak kesit alınması.....	24
Şekil 3.7. Image J programı analizinin farklı aşamalarda gösterilmesi.....	26
Şekil 3.8. POMC-GFP ifadeli bir somadan çıkan dendritik dikenlerin sayımının yapıldığı konfokal mikroskopi görüntüsü (63X).....	27
Şekil 3.9. Image J programında aktif ve enfekte nöronların ayrı kanallarda gösterimi.....	28
Şekil 4.1. POMCARC nöronlarının hedeflenmesi ve deney gruplarının oluşumu.....	29
Şekil 4.2. Kronik YYD'nin POMCARC dendritik iğne sayısına etkisi.....	30
Şekil 4.3. Kronik YYD'nin POMCARC → PVN projeksiyon sayısına etkisi.....	31
Şekil 4.4. Kronik YYD'nin POMCARC → LH projeksiyon sayısına etkisi.....	31
Şekil 4.5. Kronik YYD'nin POMCARC →BNST projeksiyon sayısına etkisi.....	32
Şekil 4.6. Kronik YYD'nin POMCARC nöronlarının leptinle indüklenmiş frekansına etkisi.....	33

Şekil 4.7. Kronik YYD'nin 3.ay sonunda kontrol ve obez gruplarda POMCARC nöronlarına gelen spontan uyarıcı ve inhibe edici akımlardaki leptin regülasyonuna etkisi.....	34
Şekil 4.8. Kronik YYD'nin 6.ay sonunda obez ve post-obez gruplarda POMCARC nöronlarına gelen spontan uyarıcı ve inhibe edici akımlardaki leptin regülasyonuna etkisi.....	35
Şekil 4.9. Yeme davranışı deney programının şematik gösterimi.....	36
Şekil 4.10. Kontrol grubu hayvanlarının deney süresi boyunca diyet tüketim grafiği.....	36
Şekil 4.11. Obez grubu hayvanların deney süresi boyunca diyet tüketim grafiği.....	37
Şekil 4.12. Post-obez grubu hayvanların deney süresi boyunca diyet tüketim grafiği.....	38
Şekil 4.13. Altıncı ay sonunda tüm grupların cinsiyete göre diyet tüketim grafiği.....	39
Şekil 4.14. Davranış grubu POMC-Cre farelerin zamana göre vücut ağırlığı grafikleri....	40
Şekil 4.15. Tüm gruplarda kan glikoz seviyeleri.....	41
Şekil 4.16. Tüm gruplarda serum leptin seviyeleri.....	43
Şekil 4.17. Altıncı ay sonunda tüm gruplardan bakılan lipit sonuçları.....	44
Şekil 4.18. YYD'nin POMC nöron aktivitesi üzerindeki etkisi.....	45

## SİMGELER ve KISALTMALAR

A/P:	Anterior/Posterior
AAV:	Adeno-Asosiyel Virüs
aCSF:	Yapay Beyin Omurilik Sıvısı
ACTH:	Adrenokortikotropin
ADX:	Farede Adrenal Bez Yoksunluğu Modeli
AgRP:	Agouti ile ilişkili peptit
AH:	Anterior Hiptalamus
AHi:	Amigdalohipokampal Alan
AMPK:	AMP-aktivasyonlu Protein Kinaz
AP5:	2R-amino-5-fosfonovalerik asit
ARC:	Arkuat nükleus
BNST:	Stria terminalinin yatak çekirdeği
CB1,CB2:	Kannabinoid Reseptör 1 ve 2
CeM:	Medial Amigdala
Cre:	Causes of Recombination
CRH:	Kortikotropin Salgılatıcı Faktör
D/V:	Dorsal/Ventral
ddH <sub>2</sub> O:	Arıtılmış su
DMH:	Dorsomedial hipotalamus
DR:	Dorsal rafe çekirdek
ECS:	Endokannabinoid Sistem
EDTA:	Etilendiamintetraasetik asit
EGTA:	Etilen glikol-bis( $\beta$ -aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetraasetik asit

EPSC:	Uyarıcı postsinaptik akım
FLEX:	Flip-excision
GABA:	Gamma aminobütirik asit
GFP:	Yeşil Floresan Protein
H <sub>2</sub> O:	Su
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Hidrojen Peroksit
HCl:	Hidroklorik Asit
IL-6:	İnterlökin 6
IPSC:	İnhibitör postsinaptik akım
I.P:	İntraperitoneal
IRt:	Orta Retiküler Çekirdek
KATP:	Potasyum ATPaz
KBB:	Kan Beyin Bariyeri
KCl:	Potasyum Klorür
LA:	Lateral septal
LC:	Lokus Koroleus
LEPR:	Leptin Reseptörü
LHA:	Lateral Hipotalamik Alan
Lox:	Locus of Crossing
M/L:	Medial/Lateral
MCH:	Melanin Konsantre Eden Hormon
ME:	Medial Eminens
Mg-ATP:	Adenosine Triphosphate Magnesium
MgCl <sub>2</sub> :	Magnezyum Klorür

MgSO <sub>4</sub> :	Magnesium Sülfat
MPA:	Medial Preoptik Alan
MSH:	Melanosit Uyarıcı Hormon
mTOR:	Rapamisin Hedefi
NAC:	Nucleus Arcuatus
NaCl:	Sodyum Klorür
NaGTP:	Guanosine 5'-triphosphate sodium salt hydrate
NaHCO <sub>3</sub> :	Sodyum Bikarbonat
NaHPO <sub>4</sub> :	Sodyum Fosfat
NaOH:	Sodyum Hidroksit
NI:	Çekirdek İnsertus
NMDG:	N-Methyl-D-glucamine
NOS:	Nitrik Oksit Sentaz
NPY:	Nöropeptit Y
NTS:	Traktus Soliter Çekirdek
PAG:	Periakvaduktal Gri
PBN:	Parabrakiyal Çekirdek
PCR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PH:	Posterior Hipotalamus
PI3K:	Fosfatidil-inazitol-3kinaz
Pn:	Pontik Retiküler Çekirdek
POMC:	Pro-opiomelanokortin
PSTh:	Parasubtalamik Çekirdek
PVH:	Paraventriküler Hipotalamus

PVT:	Talamusun Paraventriküler Çekirdeği
RMg:	Rafe Magnus Çekirdeği
RNA:	Ribonükleik Asit
SCN:	Suprakiazmatik Çekirdek
SON:	Supraoptik Çekirdek
rAAV:	Rekombinant Adeno-Asosiye Virüs
Rn:	Kırmızı Çekirdek
RNA:	Ribonükleik Asit
TAE:	Tris-Asetat-EDTA
TNFa:	Tümör Nekroz Faktörü Alfa
TRPC:	Geçici Reseptör Potansiyeli Kanonik Kanal
VMH:	Ventromedial Hipotalamus
VTA:	Ventral Tegmental Alan
YYD:	Yüksek Yağlı Diyet

## ÖZET

**Başer, Ö. (2023). Kronik Yüksek Kalorili Diyetin Mediobazal Hipotalamik Tokluk Sinir Ağlarının İşleyişine Etkisi. Yeditepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji ABD, Doktora Tezi. İstanbul**

**AMAÇ:** Sürekli olarak yüksek kalori alımı ve fazla kalorinin yağ dokusu olarak depolanmasıyla karakterize olan obezitenin prevalansı son otuz yılda artmıştır. Hipotalamik arkuat çekirdekteki (ARC) proopiomelanokortin (POMC) nöronları, tokluk oluşumunda hayati bir rol oynar. Yüksek yağlı gıdaların kronik tüketiminin, leptin gibi hormonlara karşı hipotalamik nöron duyarlılığını azalttığı, dolayısıyla obezitenin gelişmesine ve kalıcılığına katkıda bulunduğu bilinmektedir. Yüksek kalorili bir diyetin POMC nöronları üzerindeki fonksiyonel ve morfolojik etkileri ve bu etkilerin obez fenotipin gelişimine ve sürdürülmesine nasıl katkıda bulunduğu tam olarak anlaşılammıştır. Bu amaçla bu tezde POMC-Cre transgenik fare modeli yüksek yağlı diyete (YYD) maruz bırakılmış ve 3 ve 6 aylık süre sonunda elektrofizyolojik ve morfolojik değişiklikler, POMC nöronlarının homeostatik beslenmedeki rolü ve leptine verdikleri yanıt kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır.

**METOT:** Kronik yüksek yağlı diyete (6 ay) maruz kalan transgenik fare modelinde (POMC-Cre), YYD'nin POMC tokluk nöronları üzerindeki etkileri, AAV (adeno-asosiy virüs) vektörü aracılığı ile yeşil floresan protein (GFP) eksprese eden POMC nöronlarında sinaptik ve aksonal bölgelerin, konfokal mikroskopi görüntülemesi ile incelendi. POMC nöronlarındaki hücresel leptin yanıtlarının ve post-sinaptik potansiyel kayıtlarının YYD'e bağlı değişiklikleri elektrofizyoloji (patch clamp) tekniği ile araştırıldı. POMC nöronlarının kronik YYD beslenme davranışı takibi ise POMC nöronlarının kemogenetik aktivasyonu yoluyla kaydedildi. Grupların leptin, glikoz ve lipid profilleri belirlendi.

**BULGULAR:** Altı ay boyunca yüksek yağlı diyete maruz bırakılan farelerde, POMC dendritik omurga sayısında veya POMC nöronlarından paraventriküler hipotalamusa (PVN), lateral hipotalamusa (LH) ve yatak çekirdeği stria terminaline (BNST) projeksiyon yoğunluğunda herhangi bir değişiklik olmadı. Ayrıca 6 ay boyunca YYD ile beslenen farelerde leptin hormonunun POMC nöronlarının elektrofizyolojik aktivitelerini değiştirmedeği ortaya çıktı. Ayrıca POMC nöronlarının kemogenetik uyarılması YYD

tüketimini arttırdı ( $p < 0,05$ ). Üç aylık YYD ile beslenen grupta, POMC aktivasyonu farelerde oreksijenik bir tepkiye neden olurken, standart diyete geçmenin POMC farelerinde oreksijenik davranışı ortadan kaldırdığı gösterilmiştir.

**SONUÇ:** Kronik yüksek yağ tüketimi, POMC nöron aktivasyonunun leptin tarafından düzenlenmesini bozmaktadır. Değişen POMC nöron aktivasyonu, nöronun karakteristik davranışsal anoreksijenik tepkisini ortadan kaldırdı. Besin içeriğindeki değişiklik, gelişen uyumsuzlukların yeniden düzenlenmesine katkıda bulunur.

**Anahtar Kelimeler:** Obezite, Elektrofizyoloji, Patch-Clamp, Kemogenetik, POMC nöronları, Hipotalamus, Arkuat çekirdek, yüksek yağlı diyet, Leptin



## ABSTARCT

**Objective:** The prevalence of obesity, which is characterized by persistently high calorie intake and the storage of excess calories as fat tissue, has increased over the past three decades. Proopiomelanocortin (POMC) neurons in the hypothalamic arcuate nucleus (ARC) play a vital role in generation of satiety. Chronic consumption of high-fat foods is known to reduce hypothalamic neuronal sensitivity to hormones like leptin, thus contributing to the development and persistence of obesity. The functional and morphological effects of a high-calorie diet on POMC neurons and how these effects contribute to the development and maintenance of the obese phenotype are not fully understood. For this purpose, POMC-Cre transgenic mice model was exposed to high-fat diet (HFD) and at the end of a 3- and 6-month period, electrophysiological and morphological changes, and the role of POMC neurons in homeostatic nutrition and their response to leptin were thoroughly investigated.

**Methods:** The effects of HFD on POMC neurons in a transgenic mouse model (POMC-Cre) exposed to chronic high-fat diet (6 months) by confocal microscopy imaging of synaptic and axonal regions in POMC neurons expressing green fluorescent protein (GFP) via AAV (adeno-associated virus) vector. HFD-related changes in cellular leptin responses and post-synaptic potential recordings in POMC neurons were investigated with the electrophysiology (patch clamp) technique. Chronic HFD feeding behavior monitoring of POMC neurons was recorded through chemogenetic activation of POMC neurons. Leptin, glucose and lipid profiles of the groups were determined.

**Results:** In mice exposed to a high-fat diet for 6 months, no changes in POMC dendritic spine number or projection density from POMC neurons to the paraventricular hypothalamus (PVN), lateral hypothalamus (LH), and bed nucleus stria terminalis (BNST) were observed. It was also revealed that leptin hormone did not change the electrophysiological activities of POMC neurons in mice fed with HFD for 6 months. In addition, chemogenetic stimulation of POMC neurons increased HFD consumption ( $p < 0.05$ ). In the 3-month HFD-fed group, POMC activation induced an orexigenic response in mice, whereas switching to a standard diet was shown to abolish orexigenic behavior in POMC mice.

**Conclusions:** Chronic high fat consumption disrupts the regulation of POMC neuron activation by leptin. Altered POMC neuron activation abolished the neuron's

characteristic behavioral anorexigenic response. Change in nutritional content contributes to the reorganization of developing maladaptations.

Keywords: Obesity, Electrophysiology, Patch-Clamp, Chemogenetics, POMC neurons, Hypothalamus, Arcuate nucleus, HFD, Leptin



## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Obezite, kalori alımı ile enerji harcaması arasındaki ilişkinin dengesizliği sonucu vücutta yağ birikmesi olarak açıklanan, kronik ve multifaktöriyel bir hastalıktır. Bu karmaşık durum, başlı başına sağlık risklerine yol açmanın yanı sıra, çeşitli vücut sistemlerini etkileyen diğer hastalıkların olasılığını da artırır. Kas-iskelet sistemi, kardiyovasküler, zihinsel ve metabolik sistemler de dahil olmak üzere birçok vücut sistemini etkiler<sup>1</sup>. Obezite ve bununla ilişkili risklerin ele alınması, genel sağlığın geliştirilmesi ve daha fazla komplikasyonun gelişmesinin önlenmesi açısından çok önemlidir<sup>2</sup>.

Modern zamanlarda, yüksek kalorili diyetlere kolay erişim ile hareketsiz yaşam tarzının obezitenin nedenlerinden biri olduğu düşünülmektedir<sup>3</sup>. Obeziteye katkıda bulunan faktörler incelenirken, belirli beslenme kalıplarının sürekli tüketilmesinin periferik ve merkezi sinir sistemlerinde metabolizmanın düzenlenmesi üzerindeki etkileri araştırılmaktadır. Yüksek yağlı diyetin (YYD) aşırı tüketiminin, uzun vadede enerji metabolizmasını yanlış düzenleyerek hipotalamik sinir ağlarını bozabileceği ve obeziteye yol açabileceği öne sürülmüştür<sup>4-6</sup>.

Hipotalamik arkuat çekirdekte (ARC) yer alan sinir ağları, enerji homeostazisini düzenlemek için beynin diğer bölgelerinden periferik sinyalleri ve projeksiyonları alır ve entegre eder<sup>7</sup>. ARC'deki bu nöronlar, nörotransmitterler/nöromodülatörler, hormonlar ve besinlerle ilgili sinyaller hakkındaki bilgileri alıp işleyen bir arayüz görevi görür. Bu hipotalamik bölgede yer alan agouti ile ilişkili peptit (AgRP)/Nöropeptit Y (NPY) sinir devresi, gıda alımını arttırıcı (oreksijenik) sinyalleri taşır<sup>8,9</sup>, Proopiomelanokortin (POMC) eksprese eden nöronlar ise tokluk (anoreksijenik) nörotransmisyonunda rol oynar<sup>10</sup>. Bu sinir ağlarındaki işlev bozukluğu obezite gibi metabolik bozukluklara yol açabilir.

Leptin hormonunun POMC nöronlarının aktivitesi üzerinde uyarıcı etkisi vardır<sup>11</sup>. Bu etki, genel bir katyon kanalının aktivasyonundan ve POMC hücrelerinde inhibitör sinaptik bağlantıların eş zamanlı inhibisyonundan kaynaklanır<sup>11-13</sup>. Obezitenin ilerlemesi, kronik yüksek yağ tüketiminin neden olduğu hipotalamik inflamasyona bağlı olarak nöronal fonksiyonun bozulmasını ve hormon duyarlılığının (leptin gibi) kaybını içerir<sup>13</sup>. Leptin direnci hem kısa süreli (6 gün) hem de uzun süreli (12 hafta) YYD ile beslenen farelerde gösterilmiştir<sup>14,15</sup>. Leptin duyarlılığının kaybı, kısa süreli YYD tüketimini takiben bozulan kalsiyum dengesi ile ilişkilendirilmiştir<sup>16</sup>. Somatik değişikliklere ek

olarak, POMC<sup>ARC</sup> nöronlarına giden inhibitör postsinaptik akımların (IPSC) sıklığı ve genliği, YYD'nin kısa süreli (3 gün) kullanımından sonra arttı<sup>17</sup>. Ayrıca POMC nöronlarında tokluğun düzenlenmesi, YYD tüketimi sırasında AGRP nöronları içermeyen NPY nöronları aracılığıyla farklı bir sinir yolunu aktive eder<sup>18</sup>. YYD'nin POMC nöron regülasyonu üzerindeki bilinen etkileri zamanla derinleşmektedir. Ancak kronik yüksek kalorili diyetin tokluk nöronlarının fonksiyonel ve morfolojik özelliklerini nasıl etkilediği ve bu etkilerin obez fenotipin oluşumuna ve sürdürülmesine nedensel olarak nasıl katkıda bulunabileceği sorusu henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Bu çalışmada amacımız kronik YYD'ye maruz kalma sonrasında POMC nöronlarının morfolojik yapısının, leptin sinyallerine verilen yanıtların ve homeostatik yeme davranışlarının nasıl değiştiğini ve etkilerin kalıcı olup olmadığını araştırmaktır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Hipotalamusta Enerji Metabolizması

#### 2.1.1. Hipotalamus

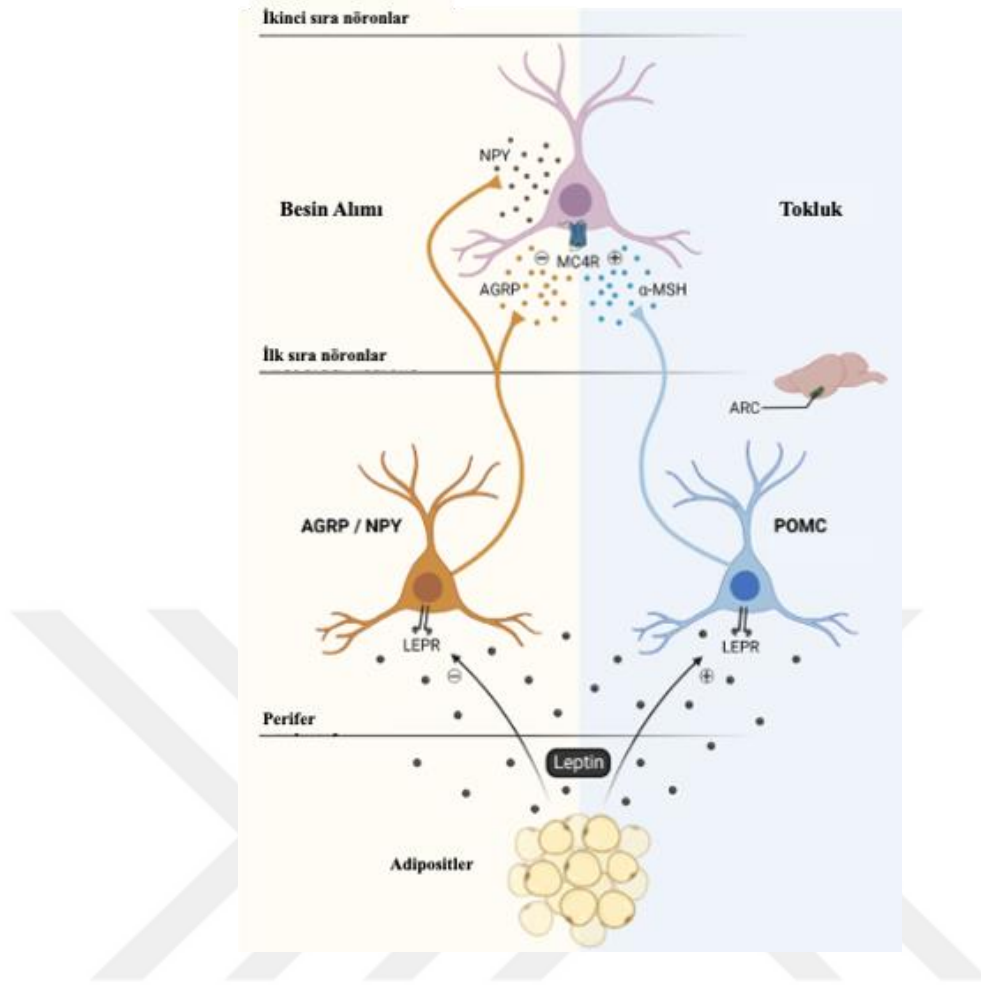
Beyin, periferik organ ve dokulardan humoral ve sinirsel yollarla vücuttaki beslenme ve enerji durumları hakkında bilgi alarak, enerji harcanması ya da enerji kaynağı takviyesinin sağlanması için efektör organlara düzenleyici sinyaller gönderir. Hayvanlarda enerji homeostazı, besin alımı ve enerji harcaması arasındaki dengeye bağlıdır. Aşırı negatif enerji dengesine sahip hayvanlar açlıktan ölümler, aşırı pozitif enerji dengesi obeziteye yol açabilir. Pek çok çalışma, beslenme konusunda periferik sinyallerin taşındığı, açlık ya da tokluk davranış yanıtlarının alındığı aynı zamanda çevreden beslenme durumları hakkında bilgi alan hipotalamus beyin bölgesindeki sinyalleşmelere odaklanmaktadır<sup>19</sup>. Hipotalamus, uyku, kan basıncı, vücut sıcaklığı, sirkadiyen ritimler ve enerji dengesi gibi homeostazı düzenlemekten sorumlu bir beyin bölgesidir. Hipotalamus, ARC, paraventriküler çekirdek (PVH), supraoptik çekirdek (SON), suprakiazmatik çekirdek (SCN), dorsomedial çekirdek (DMH), ventromedial çekirdek (VMH) ve lateral hipotalamik alan (LHA) dahil olmak üzere birkaç küçük ana çekirdekte oluşur. Bu çekirdekler arasında çeşitli nöron alt tipleri bulunur. Tek hücreli RNA dizilimine dayanan son çalışmalar, yetişkin fare hipotalamusunda farklı transkripsiyonel ifadelerle sahip en az 34 nöronal ve 11 nöronal olmayan hücresel grup tanımlamıştır ve hatta ARC-POMC pozitif nöronlar oldukça heterojen popülasyonlardır<sup>20,21</sup>. Bugün kullandığımız ileri metodolojik teknoloji sayesinde (tek hücre mRNA analizleri, optogenetik, kemogenetik gibi) hipotalamustaki nöral ağları ve fonksiyonlarını spesifik olarak araştırma fırsatı oluşmuştur.

#### 2.1.2. Arkuat Nükleus

ARC ve popülasyonları üzerine araştırmalar, 30 yıl önce leptinin keşfiyle hızlanmış ve moleküler araştırmalar başlamıştır<sup>22</sup>. Beyinde, hipotalamus bölgesinin çekirdeklerinden ARC, anoreksijenik ve oreksijenik nöropeptitlerin üretimi yoluyla sırasıyla tokluk ve açlık yanıtından sorumludur<sup>23</sup>. Anoreksijenik nöropeptitler POMC nöronları<sup>24</sup> tarafından üretilirken; NPY/AgRP nöronları oreksijenik nöropeptitleri salgılar. AgRP nöronları, oreksijenik nöropeptitler ile birlikte  $\gamma$ -aminobütirik asit (GABA) nörotransmitterini de salgılar<sup>25</sup>.

### 2.1.3. Merkezi melanokortin sistemi

Merkezi melanokortin sistemi, enerji homeostazı, kardiyovasküler fonksiyonlar ve üremenin düzenlenmesinde önemli rol oynar<sup>26</sup>. Merkezi melanokortin sistemi, endojen melanokortin ligandlarını salgılayan nöronlar ve melanokortin reseptörlerini (Mcr) taşıyan nöronlardan oluşur<sup>27</sup>. Bu sistem üç grup projeksiyon nöronunu içerir<sup>26</sup>: Hipotalamik ARC'deki POMC nöronları, medullanın nukleus solitariusunda (NTS) POMC nöronları ve ARC'daki AgRP nöronları. Melanokortin reseptörlerinin beş Mcr alt tipi (Mc1r, Mc2r, Mc3r, Mc4r ve Mc5r) tanımlanmıştır. Mc3r ve Mc4r beyinde üretilen tipleridir. Bu reseptörler, özellikle Mc4r, endojen melanokortin ligandlarına ( $\alpha$ -,  $\beta$  - veya  $\gamma$  – MSH; melanosit uyarıcı hormon) bağlanarak enerji homeostazının düzenlenmesinde anahtar rol oynar<sup>11</sup>. AgRP, PVN üzerindeki melanokortin reseptörünü (Mcr) inhibe eden endojen bir melanokortin ters agonistidir<sup>27</sup>. MC4R aktivasyonunu azaltır<sup>28</sup> ve tokluk sinyallerini önleyerek gıda alımını uyarır<sup>29</sup>. Ayrıca, inhibitör nörotransmitter GABA'yı içeren NPY/AgRP nöronları, POMC nöronlarına projekte olur<sup>30</sup>. Dolayısıyla, MC4R eksprese eden hücreler üzerindeki etkilerine ek olarak, aynı zamanda POMC nöron aktivitesi üzerinde doğrudan inhibitör etkiye de sahiptir. Öte yandan aktif POMC nöronları tarafından salınan  $\alpha$  -MSH, PVN üzerinde Mc4r aracılı PVN aktivasyonu yaparak besin alımını durdurur. Melanokortin sinyalinin enerji dengesinin yönetilmesindeki kritik rolü, POMC veya MC3/4R'de fonksiyon kaybı mutasyonları olan insan hastalarda görülen sürekli açlık durumu ve bunun sonucunda gelişen obezite ile anlaşılabilir<sup>31,32</sup>.



**Şekil 2.1. Klasik leptin-melanokortin modeli.** AGRP, agouti ile ilişkili peptit; LEPR, leptin reseptörü; NPY, nöropeptid Y; POMC, pro-opiomelanokortin;  $\alpha$ -MSH,  $\alpha$ -melanosit uyarıcı hormon. Şekil Lavoie ve arkadaşlarının makalesinden<sup>33</sup> türkçeleştirilmiştir.

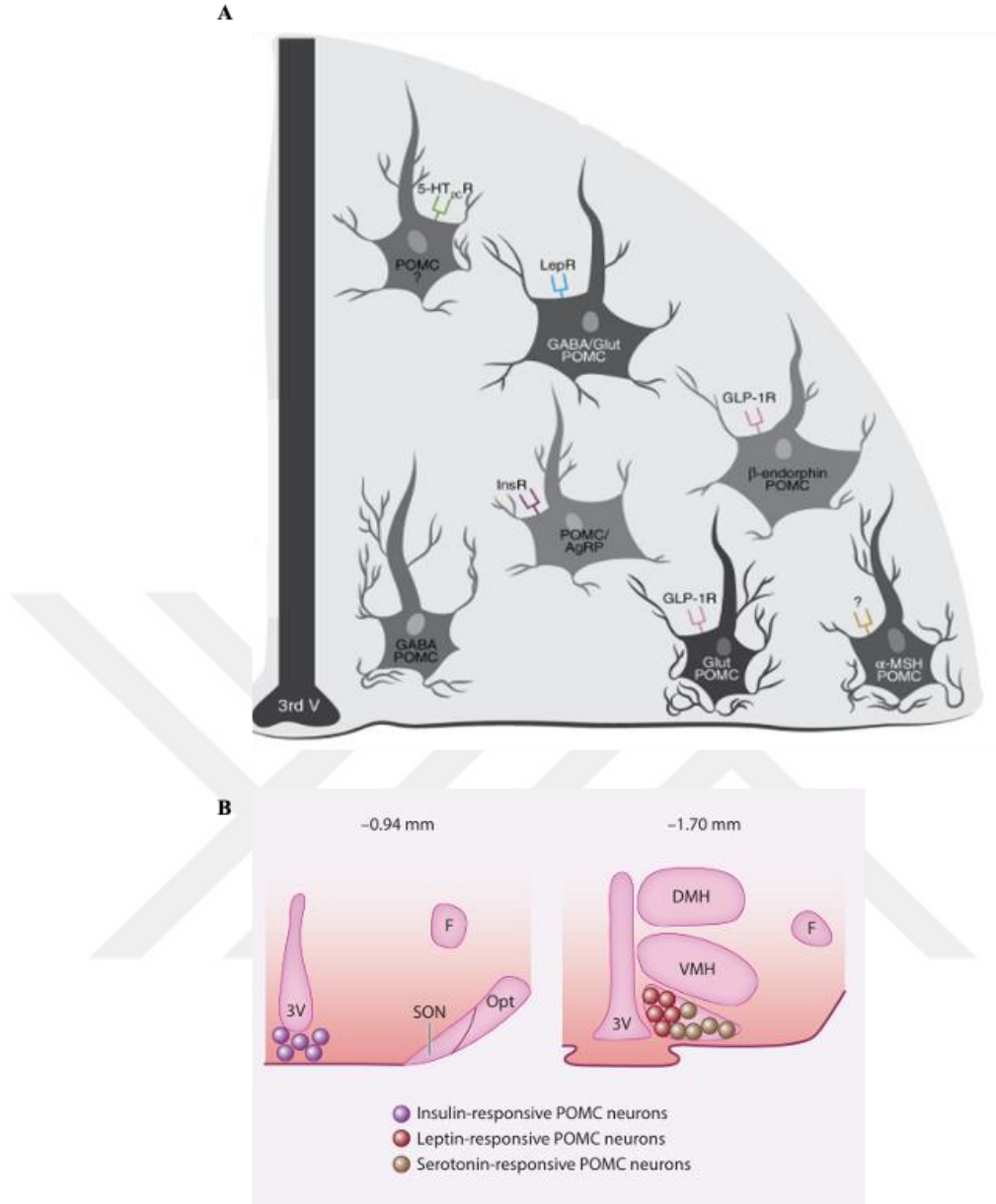
#### 2.1.4. Heterojen POMC sistemi

- ARC-POMC: Yakın zamana kadar kabul görmüş olan, ARC POMC ve AgRP nöronlarının homojen popülasyonlar olduğu ve PVN projeksiyonları üzerinden beslenme davranışını zıt mekanizmalarla düzenledikleri bir "homeostatik" sistemdi. Ancak zaman içinde önce tüm POMC nöronlarının leptin reseptörü taşımadığının (elektrofizyolojik olarak leptine yanıtız POMC nöronları olduğu anlaşıl原因 olarak) anlaşılması, daha sonra kemogenetik, optogenetik yaklaşım ve tek hücreli ribonükleik asit (RNA)-sekanslama teknolojisi gibi ileri biyoteknolojilerin gelişmesiyle birlikte POMC nöronları ve AgRP nöronlarının rollerinin önceden

düşünüldüğünden daha karmaşık olduğunun bulunması<sup>20,33</sup>, modelin yeniden değerlendirilme ihtiyacına dikkat çekti. Tek hücreli RNA-sekans yaklaşımıyla sağlanan POMC hücrelerinin moleküler profili farklı birkaç kümeye bölünebileceğini ortaya çıkardı<sup>7,21,34</sup>. POMC nöronlarının farklı projeksiyonlarının POMC haricinde glutamaterjik, gabaerjik ve kolinerjik olduğunu gösterilmiştir. Nörotransmitter salgıları haricinde taşıdığı membran reseptörleri üzerinden de farklı gruplara ayrılan POMC nöronlarının %40'ı yalnızca serotonin, %18'i hem insulin hem leptin reseptörü taşımaktadır. Ayrıca %40 POMC nöronu sadece insulin reseptörü taşıırken, %7 oranında POMC sadece leptin reseptörü taşımaktadır. %25 oranında AgRP nöronu ise POMC nöronları ile aynı kök hücreden köken almakta ve POMC eksprese etmektedir. 5 hidroksitriptamine-2C (5Ht2C) reseptörü silinen farelerin hiperfaji göstererek obezite geliştirmesi dikkatleri bu reseptöre (Htr2c) çekmiştir<sup>35</sup>. Reseptör agonistleri ile yapılan çalışmalar POMC nöronlarında depolarizasyona yol açmış<sup>36,37</sup> ve POMC nöronlarının leptine cevapsız bir alt grubunun serotonin reseptörü taşıdığı saptanmıştır<sup>38</sup>. POMC-5Ht2CR nöron grubu hepatik insülin duyarlılığını düzenleyerek glikoz metabolizmasını kontrol etmektedir<sup>39</sup>. Bu leptin ve serotonin reseptör gruplarının aynı hücreler üzerinde olmayışı da POMC heterojenliğine ilk adımın atılmasını sağlamıştır. Serotonin duyarlı bu alt grubun büyük yoğunluğu ARC'ta bulunurken, ufak bir popülasyon ise NTS POMC nöronlarında gösterilmiştir<sup>40</sup>.

- NTS-POMC: ARC-POMC ve NTS-POMC alt popülasyonları benzerlik gösterir fakat aynı zamanda farklıdır. Her iki nöron bölgesi de leptin ve somatostatin(SST) reseptörü taşıır<sup>41</sup>. NTS'te bulunan POMC nöronları ARC'deki POMC nöronlarının aksine, girdilerini ağırlıklı olarak pons ve medulladan (~%80) almaktadır<sup>42</sup>. Fakat ARC ve NTS te bulunan POMC nöronlarının her ikisi de yeme alımını durdurmaktadır<sup>29,31</sup>. Her iki bölgedeki POMC nöron grubu da birbirlerine projeksiyon göndermekte fakat presinaptik dağılım olarak farklı bölgelerden girdi almaktadırlar. Lateral septum (LS), medial preoptik alan ve medial preoptik çekirdek (MPA/MPO), anterior hipotalamus (AH), PVN, dorsomedial hipotalamus (DM), posterior hipotalamus (PH), amigdalohipokampal alan (AHi), subikulumun dorsal ve ventral kısımları (DS ve VS), ventral tegmental çekirdek (VTg) ve çekirdek insertus (NI) bölgeleri ARC POMC nöronlarına yoğunluklu olarak bilateral presinaptik projeksiyon gönderen bölgeler arasındadır. ARC

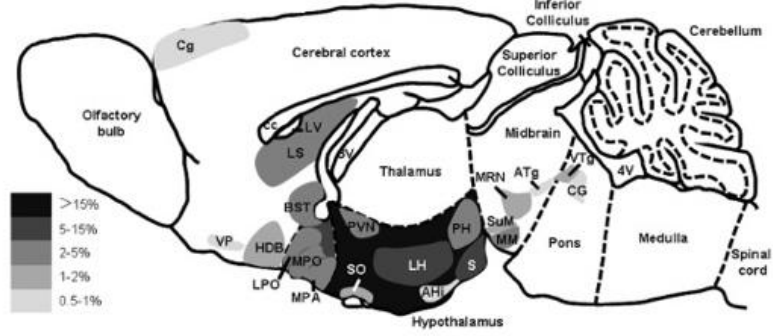
POMC nöronları tüm beyin bölgelerinden yaklaşık 45000 nörondan bilgi toplamaktadır. AgRP nöronları bunun yarısı kadar iletiyi çoğunlukla ARC POMC nöronları ile aynı presinaptik bölgelerden toplamaktadır. Stria terminalisin yatak çekirdeği (BNST), PVN, LH, merkezi amigdaloïd çekirdeğin medial kısmı (CeM), parasubtalamik çekirdek (PSTh), kırmızı çekirdek (Rn), pontin retiküler çekirdeğin oral ve kaudal kısımları (PnO ve PnC), locus koroleus (LC), orta retiküler çekirdek (IRt), gigantosellüler retiküler çekirdek (Gi), raphe magnus çekirdeği (RMg), lateral ve medial serebellar çekirdek (Lat ve Med) ise NTS POMC nöronlarına presinaptik ileti gönderen beyin bölgeleridir. NTS bölgesindeki POMC nöronları ARC'a gelen sinaptik iletilerin neredeyse yarısı kadar bilgi alırken, bu sinapsların birlikte işlenmesi yönünden ARC bölgesinden daha yoğun sinaptik ağı sahiptir<sup>42</sup>. NTS POMC nöronları çiğneme ve yutmada gibi tüketici sindirim davranışlarının kontrol edilmesinde ve düzenlenmesinde rol oynayan bölgelerden projeksiyon alır. ARC POMC nöronları genellikle projeksiyonlarını ön beyin merkezlerine gönderirken, NTS POMC nöronları aksonları ile beyin sapını hedefler. Bu anatomik bağlantılardaki farklılıklar, hipotalamus ve beyin sapındaki POMC nöronlarının birbirlerinden farklı görevlere özelleştiklerini göstermektedir. Diğer yandan NTS-POMC nöronlarına, ARC-POMC nöronlarına ve ARC-AgRP nöronlarına doğrudan girdi sağlayan 12 çekirdek tanımlanmıştır. Bu yapılar, enerji homeostazisini düzenleyen ana merkez olan PVN'yi ve serotonerjik nöronların iki beyin sapı merkezi olan RMg ve rafe obskurus çekirdeğini (Rob) içerir. Bu ortak girdilerin, melanokortin sistemindeki üç tip projeksiyon nöronunun tümünü hedef alarak beslenme davranışının tüm bölgelere bilgi ileterek uyumlu çalışmalarının düzenlenmesine anatomik altyapı sağladığı düşünülmektedir<sup>42</sup>.



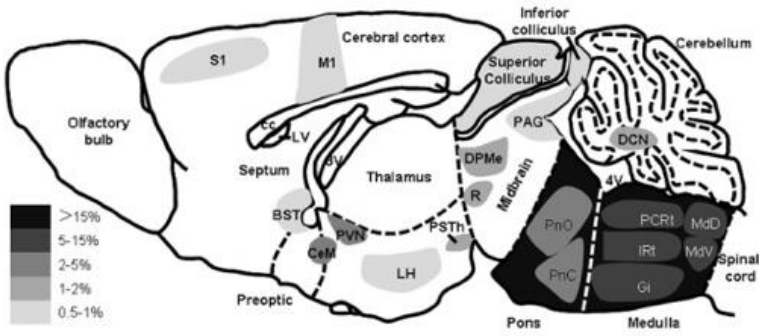
**Şekil 2.2. POMC nöron alt tiplerini tanımlamak için kullanılan mevcut sınıflandırmalar**

A) Hipotalamik POMC nöronlarının farklı alt kümeleri<sup>7</sup> B) ARC'de insülin, leptin ve serotonine duyarlı POMC nöronlarının lokalizasyonu<sup>27</sup>. Şekiller referans verilen makalelerden alınarak düzenlendi. 3V, üçüncü ventrikül; InsR, insülin reseptörü; Opt, Optik sistem; LepRb, leptin reseptörü; GLP-1R, glucagon benzeri peptin 1 reseptörü; 5HT<sub>2c</sub>R, serotonin reseptörü; α-MSH, alfa-melanosit uyarıcı hormon; AgRP, agouti ile ilişkili peptid; GABA, γ-aminobütirik asit; GLUT, glutamat; β-endorphin, beta endorphin; POMC, pro-opiomelanokortin; PVH, hipotalamusun paraventriküler çekirdeği; SON, supraoptik çekirdek; VMH, hipotalamusun ventromedial çekirdeği; ARC, arkuat çekirdek; DMH, hipotalamusun dorsomedial çekirdeği; F, forniks.

A. ARC POMC nöronlarına gelen projeksiyon haritası



B. NTS POMC nöronlarına gelen projeksiyon haritası



Şekil 2.3. A/B) ARC / NTS POMC nöronlarına yönelik başlıca presinaptik girdilerin şematik gösterimi. Gri tonlama toplam girdilerin yüzdesini temsil eder<sup>42</sup>. Şekiller makaleden<sup>42</sup> alınarak yeniden düzenlendi.

### 2.1.5. Pro-opiomelanokortin sistemi ve düzenlenmesi

- **POMC nöron transkripti**

POMC gen transkripti, dokuya özgü proteolize uğrayan bir polipeptit hormonu taşınması sayesinde adrenokortikotropin (ACTH),  $\alpha$ -,  $\beta$ - ve  $\gamma$ - melanosit uyarıcı hormon (MSH)'ler ve  $\beta$ -endorfin dahil olmak üzere biyolojik olarak aktif peptitler ve hormonlardan oluşan bir kokteyl salgı üretir ve bunların hepsi gıda alımını ve enerji dengesini düzenleyebilir<sup>27</sup>.

- **POMC nöron ekspresyonu ve periferik sinyaller**

Hormonlar ve besinler gibi çeşitli periferik sinyaller, organizmanın metabolik durumu hakkında bilgi taşır. Kan beyin bariyeri (KBB), medial eminens (ME; aksonların sızan kandan bilgiyi direkt alabilmesini sağlayan fenestreli kapillerlere sahip) ve bu ilişkiyi aktif olarak yöneten üçüncü ventrikül boyunca uzanan ependimal tanisit hücrelerinin oluşturmuş olduğu birliktelik, ARC bölgesinin sahip olduğu çok özel anatomik bir yapıdır. KBB'nin olmadığı noktalara uzanan aksonları sayesinde ARC popülasyonları kandaki sinyallerden etkilenirler ve

cevap oluştururlar<sup>43</sup>. Ayrıca POMC transkripsiyonu ve işlenmesi, POMC nöronal aktivitesi, sinaptik plastisite ve aksonal projeksiyonlar da bu sinyaller yoluyla düzenlenir<sup>15,27,44</sup>. Entegre ettiği periferik bilgiler ile enerji ve glikoz homeostazının korunmasına katkı sunar. POMC nöronları ve AgRP/NPY nöronları, periferik sinyallere karşı farklı yanıtla ra sahiptir. Örneğin, anoreksijenik hormonlar veya leptin, insülin ve serotonin gibi nörotransmitterler POMC nöronlarını aktive ederken, AgRP nöronları bu sinyaller tarafından inhibe edilir, bu da gıda alımını azaltmak ve/veya enerji harcamasını arttırmak için Mc4r'nin aktivasyonu la sonuçlanır.

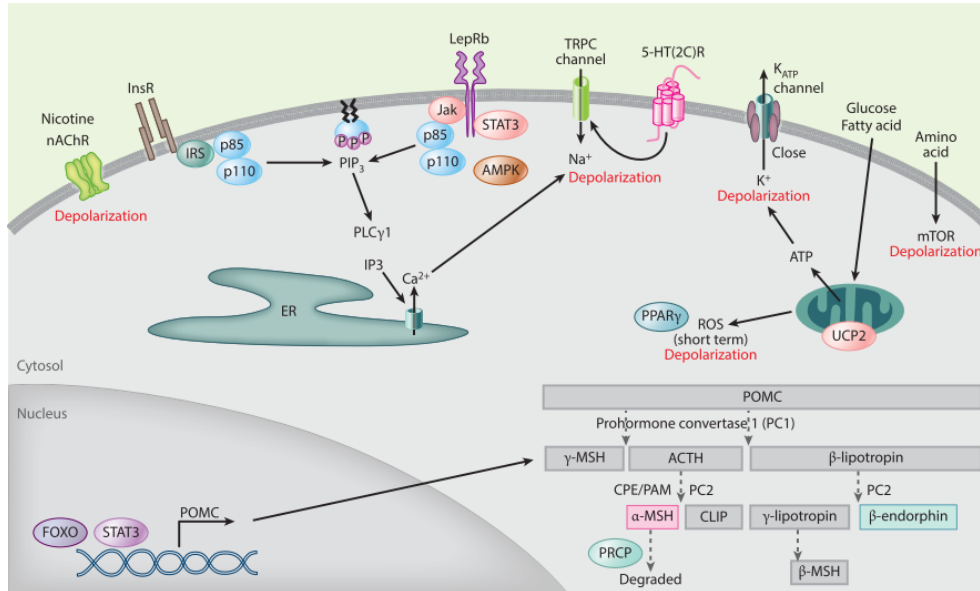
- **İnsulin:** İnsülinin POMC üzerindeki etkisi tartışılmaktadır. POMC nöronlarının %40'ında bulunan insulin reseptörü aktivasyonu sonrası POMC nöronlarında fosfatidil-inozitol-3kinaz (PI3K) yolağı üzerinden POMC transkripsiyonu baskılanmaktadır. Fakat literatürde insülinin POMC nöronlarını depolarize ettiğini gösteren bir çalışma bulunmaktadır<sup>45</sup>. Hem leptin hem insulin reseptörü taşıyan POMC altgruplarında leptin ve insulin aynı hücre içi yolağı izleyerek (PI3K) Stat3 aktivasyonu ile POMC transkripsiyonunu arttırdığı bulunmuştur<sup>46</sup>. Bu sonuçlar farklı POMC alt popülasyonlarının aynı hormona farklı cevaplar üretebilecek hassas bir dengede olduğunu da göstermektedir.
- **Glukokortikoidler:** Adrenal korteksten salgılanan glukokortikoidlerin (kortizol veya kemirgenlerde kortikosteron) sentezi ve salgılanması, hem hipotalamik kortikotropin salgılatıcı faktör (CRH) hem de POMC nöronlarından salgılanan adrenokortikotropik hormon (ACTH) tarafından kontrol edilir. Glukokortikoidler, POMC nöronlarını, hipotalamik nöropeptitlerin doğrudan transkripsiyonel düzenlenmesi, merkezi melanokortin sistemindeki peptit sinyallemesinin duyarlılığının değiştirilmesi ve ARC nöronal aktivitesi üzerine etkisi dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla pozitif enerji dengesi yönünde destekleyebilir<sup>47,48</sup>. Kortikosteron, POMC nöronları üzerindeki sinaptik girdi organizasyonunda yaptığı değişiklikler yoluyla POMC nöron aktivasyonunu etkiler. Adrenal bez yoksunluğunda (ADX fare modeli), POMC nöronları üzerindeki inhibitor sinapslarda bir azalma görülmüş bunun da POMC nöronlarının eksitator sinaptik iletilerde bir artışa yol açtığını göstermiştir<sup>49</sup>. POMC geni, anoreksijenik peptit  $\alpha$ -MSH'yi kodlarken, aynı zamanda oreksijenik peptit  $\beta$ -endofin'i de kodlamaktadır<sup>50</sup>. POMC nöronları sürekli olarak endokannabinoidleri bazal koşullarda salgırlar. Endokannabinoid sistemi

(ECS), G proteinine bağı kanabinoid reseptör 1 ve 2 (CB1R, CB2R) aktivasyonu yoluyla biyolojik etkilerini sürdürür; her iki reseptör de POMC nöronlarında ifade edilir. Endokanabinoidler, ödüllendirici (hedonik) sistemi kontrol eder ve enerji alımını uyarır<sup>51,52</sup>. ECS, besin arama davranışının karmaşıklığını ve enerji depolama sürecini modüle ederek ekstrapotalamik nöronların aktivitesini düzenler<sup>53</sup> ve tüm vücut enerji durumu hakkında bilgi taşıyan diğer hormonları düzenleyerek sisteme katkı sunar<sup>54</sup>. POMC nöronlarının endokanabinoid reseptör uyarısı, presinaptik GABAerjik uyarıların baskılanarak (disinhibisyon) POMC nöron aktivasyonuna sebep olmakta ve  $\beta$ -endorfin salınımı aracılığıyla yeme alımını arttırmaktadır<sup>27</sup>.

- **Glikoz:** Glikoz, POMC nöronlarının önemli bir modülatörüdür<sup>55</sup>. POMC nöronları glikozun kandaki varlığını direkt olarak mitokondrilerin glikozu okside etmesi sonrası oluşan son ürün adenzin 3-fosfat (ATP) sayesinde aktive olan ATP-bağımlı potasyum ( $K^+$ ) kanalları (K-ATP)'nin kapanması sonrası hücre içi elektiriksel yükün değişmesiyle membran potansiyelinde meydana gelen değişmeden algılar. Fizyolojik olarak, glikoz seviyeleri yükseldiğinde (postprandiyal dönemde), POMC nöronal aktivitesi artar, böylece hepatik glikoz homeostazisi ve insülin duyarlılığının yanı sıra tokluk sinyalini ileten nöronal devrelerin aktivasyonu da belirlenir. Mitokondriyal glikoz oksidasyonu, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini de artırır<sup>56</sup>. Hücre dışında artan glikoz seviyeleri, hücre içinde artan ROS seviyeleri ile paralel olarak POMC nöronlarını uyarıcı etki eder ve tokluğu ortaya çıkarır. Dolayısıyla ROS, POMC nöron aktivitesinin modülatörü olarak işlev görebilir ve pozitif enerji dengesi sırasında artan seviyeleri tokluğa yol açabilir. ROS, çeşitli sinyal yollarını, iyon kanallarını, taşımayı, kinazları ve ubikuitinasyon/proteazom sistemlerini etkilediği bilinen oldukça reaktif moleküllerdir<sup>57</sup>. ROS, protein aktivitesini düzenlemek için geri dönüşümlü posttranslasyonel protein modifikasyonlarına neden olmaktadır. Fosfataz enzimleri ve iyon kanalları dahil olmak üzere hedef proteinlerin enzimatik ve aktivite seviyelerini değiştirebilir. Bu nedenle POMC nöronlarında glikoz oksidasyonu ve ROS üretimini teşvik eden her durum, KATP dahil olmak üzere iyon kanallarının aktivitesini etkileyerek POMC membran potansiyelini değiştirebilmektedir.
- **Yağ asitleri:** Yağ asitlerinin varlığı, glikoz ile aynı yolak üzerinden, K-ATP kanalının aktivasyonu üzerinden algılanır. Bu asitler ve daha spesifik olarak oleik

asit, POMC nöronlarının depolarizasyonunu tetikler ve gıda alımında azalmaya neden olur<sup>58</sup>. YYD tüketiminde ARC POMC nöronları üzerindeki inhibitör sinapslardaki (GABAerjik) önemli azalmaya bağlı olarak, sinapsların toplam sayısı azalır. Bu düşüş ARC POMC soması etrafında artan reaktif glia popülasyonu ile ilişkilidir<sup>59</sup>.

- **Amino asitler:** Amino asitler Rapamisin kompleksi 1'in (mTORC1) üzerinden algılanır. mTORC1 sinyalinin aktivasyonu gıda alımını azaltır<sup>60</sup>. Ancak mTOR sinyalinin uzun süreli aktivasyonu farklı bir etki ortaya çıkartmaktadır. POMC nöronlarında mTOR sinyal yolağının sürekli uyarımını sağlayan genetik bir fare modelinde daha yüksek vücut ağırlığı ve gıda alımı görülmektedir. Bu hayvanlarda mTOR sinyal yolağı inhibitörü olan rapamisin tedavisi, hiperfajiyi ve obeziteyi iyileştirmiştir<sup>61</sup>. MTOR'un bu etkilerinin yaşlanmaya bağlı obezite ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Özellikle, POMC nöronlarındaki mTOR sinyali yaşla artmakta ve POMC nöronlarının yaşlı farelerde elektriksel olarak uyarılabilirliği düşmektedir. Yaşlı farelerde rapamisin enjeksiyonu, POMC nöronlarının uyarılabilirliğini geri kazandırmakta başarılı olmuş ve hem gıda alımını hem de vücut ağırlığını düşürmüştür<sup>62</sup>.



**Şekil 2.4. POMC nöronal aktivitesini düzenleyen POMC protein işleme ve sinyal yolları.** ACTH, adrenokortikotropin; AMPK, 5a-adenozin monofosfat aktive edici kinaz; CLIP, kortikotropin benzeri ara lob peptidi; CPE, karboksipeptidaz E; DMH, hipotalamusun dorsomedial çekirdeği; ER, endoplazmik retikulum; FOXO, çatal uçlu transkripsiyon faktörü; InsR, insülin reseptörü; IRS, insülin reseptör

substratı; Jak, Janus kinaz; LepRb, leptin reseptörü; MSH, melanosit uyarıcı hormon; mTOR, rapamisinin memeli hedefi; nAChR, nikotinik asetilkolin reseptörü; fosfoinositol-3-kinazın p85/p110, p85 ve p110 alt birimi; PAM, peptidil a-amidleyici monooksijenaz; PC, prohormon dönüştürücü; PIP3, fosfatidilinositol3,4,5-trisfosfat; PLC $\gamma$ 1, fosfolipaz C gama 1; POMC, pro-opiomelanokortin; PPAR $\gamma$ , peroksizom proliferatörüyle aktifleştirilen reseptör gama; PRCP, prolilkarboksipeptidaz; ROS, reaktif oksijen türleri; STAT3, sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 3 aktivatörü; TRPC, geçici reseptör potansiyeli kanonik; UCP2, ayırma proteini 2. Şekil makaleden<sup>27</sup> alınmıştır.

## 2.2. Hipotalamus ve Obezite

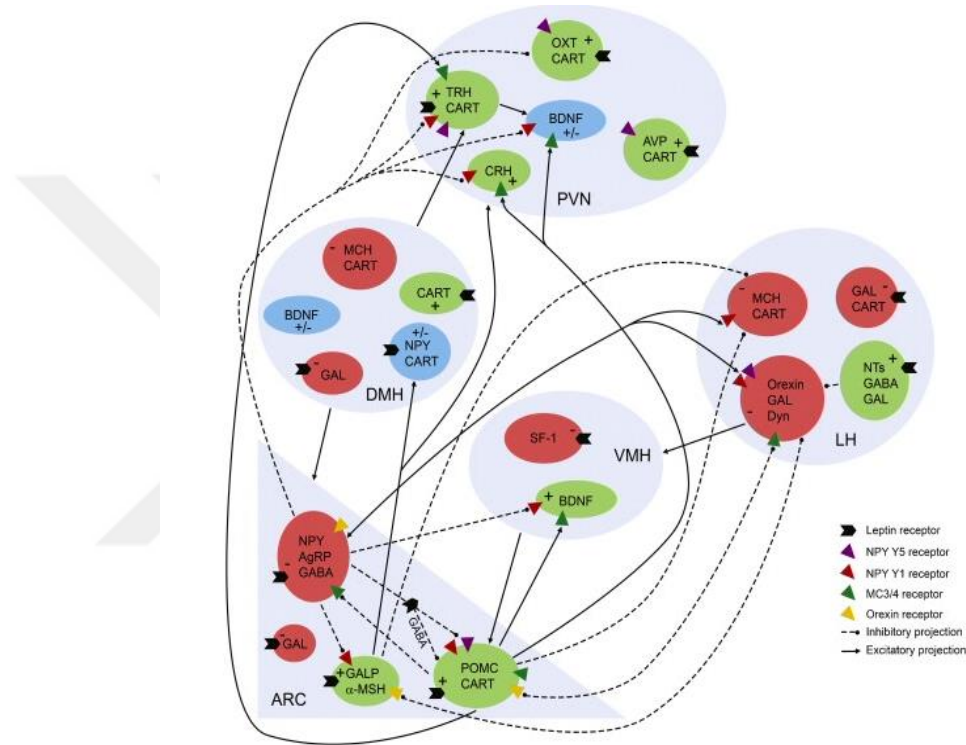
### 2.2.1. Leptin hormonu ve POMC ilişkisi

Leptin, Ob geni tarafından kodlanan ve yağ hücreleri tarafından salgılanan bir hormondur. Hipotalamusun ARN, VMH, DMH, PVN bölgesi dahil olmak üzere mediobasal hipotalamusun çeşitli bölgelerine etki ederek gıda alımını ve enerji harcamasını düzenler<sup>63</sup>. Leptin geni silinmiş fare modelinde yapılan çalışmalar bu hormonun hiperfaji, hiperglisemi, hiperinsülinemi üzerinden obezitenin gelişmesine katkıda bulunduğunu ortaya çıkartmıştır<sup>64</sup>. Leptin-melanokortin sistemi aldıkları bilgiler ve tüm projeksiyonlarıyla birlikte beslenme regülasyonundan sorumlu ana sistem olarak kabul edilmektedir. Leptin, etkisini reseptörünü taşıyan POMC nöronlarında doğrudan ve dolaylı olarak gösterir.

Doğrudan etki; Lepr-STAT3 yolu ve Jak2-fosfoinositol-3-kinaz (PI3K) – geçici reseptör potansiyeli kanonik (TRPC) kanal yolu üzerine doğrudan etki ederek POMC mRNA seviyelerinin artışına yol açar. Bu sinyal yollarına ek olarak leptin rapamisininin memeli hedefi (mTOR) yolunu ve adenosin mono fosfat (AMP) ile aktive olan protein kinazın (AMPK) aktivitesini de etkilemektedir. Hipotalamik AMPK'nin inhibisyonu, leptinin beslenme ve vücut ağırlığı üzerindeki etkisi için gerekli bir olaydır çünkü yapısal olarak aktif hipotalamik AMPK, anoreksijenik etkisini bloke eder<sup>65</sup>. Ayrıca mTOR yolağının aktivasyonu, leptinin hipotalamik AMPK aktivitesi, hipotalamik nöropeptit ekspresyonu, gıda alımı ve vücut ağırlığı üzerindeki etkileri için gerekli bir reaksiyon olan AMPK fosforilasyonunu da etkiler<sup>66</sup>.

Dolaylı etki; Leptin, POMC hücreleri üzerindeki sinaptik girdi organizasyonunu etkilemektedir. ARN'de bulunan oreksijenik NPY/ $\gamma$ -aminobütirikasit (GABA) nöronlarını doğrudan inhibe eden leptin, POMC hücreleri üzerindeki GABAerjik girdilerin sayısını azaltır<sup>12</sup>. Ek olarak, glial hücreler üzerindeki doğrudan etkisi yoluyla

leptin, POMC nöronlarının glial kapsamını da etkilemektedir. Astrositlerde Lepr'nin seçici olarak silinmesi, glial morfolojide değişikliğe neden olur ve glial kapsama alanında bir azalmaya ve POMC nöronları üzerindeki sinaptik girdilerde bir artışa neden olur<sup>67</sup>. Sonuç olarak, glial hücrelerde Lepr'nin seçici olarak silinmesiyle farelerde leptin kaynaklı beslenme baskılanması azalır; bu, glial hücrelerin hipotalamik sinaptik plastisitenin başlatılmasında ve leptin tarafından beslenmenin nöroendokrin kontrolünde aktif bir rol oynadığını gösterir.

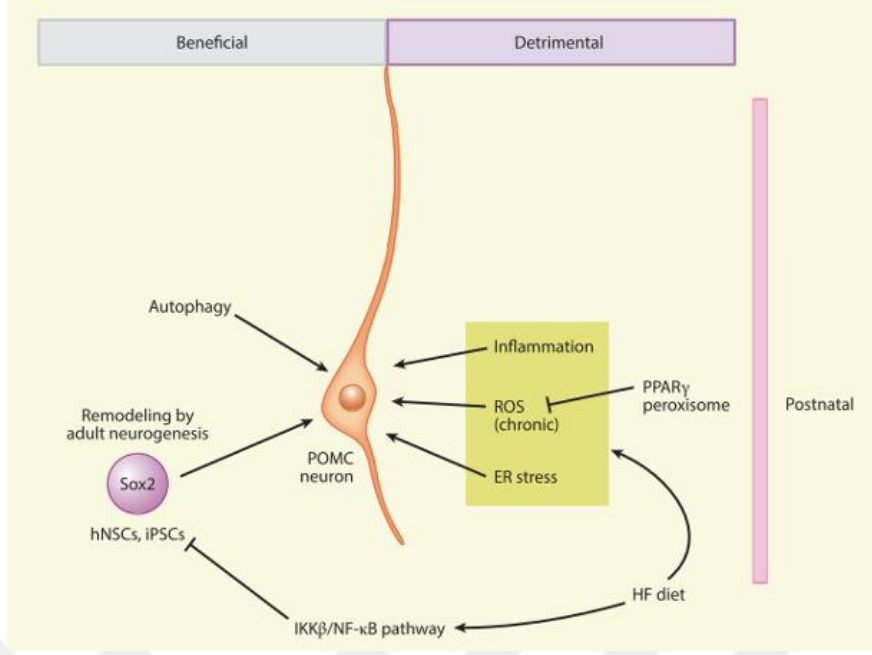


**Şekil 2.5. Leptinin hipotalamustaki fonksiyonel rolüne şematik gösterimi.** Kırmızı/'-': leptin tarafından inhibe edilen oreksijenik peptitler, yeşil/'+' : leptin tarafından uyarılan anoreksijenik peptitler, mavi/'+'/'-': bilinmiyor. Enerji dengesinde yer alan ekstra-hipotalamik projeksiyonlar gösterilmemiştir.  $\alpha$ -MSH, alfa-melanosit uyarıcı hormon; AgRP, agouti ile ilişkili peptid; ARC, arkuat çekirdek; AVP, arginin-vazopressin; BDNF, beyin kaynaklı nörotrofik faktör; CART, kokain ve amfetaminle düzenlenmiş transkript; CRH, kortikotropin salgılayan hormon; DMH, dorsomedial hipotalamus; Din, dinorfin; GABA,  $\gamma$ -aminobütirik asit; Gal, galanin; GALP, galanin benzeri peptid; LH, yan hipotalamus; MCH, melanin konsantrasyon edici hormon; NPY, nöropeptid Y; NT'ler, nörotensin; OKT, oksitosin; POMC, proopiomelanokortin; PVN, paraventriküler çekirdek; SF-1, steroidojenik faktör-1; TRH, tiroid salgılayan hormon; VMH, ventromedial çekirdek. Şekil makaleden<sup>68</sup> alındı.

### 2.2.2. Yüksek yağlı diyet ve obezite ilişkisi

Obezite, insülin direnci, tip 2 diyabet ve dislipidemi dahil olmak üzere metabolik sendromun temel nedenlerinden biridir. Obezitenin metabolik risk faktörlerini indüklediği veya kötüleştirdiği kesin mekanizmalar hala bilinmemekle birlikte, aşırı yağlanma, özellikle viseral yağ birikimi, insülin direnci ve anormal glikoz ve lipid metabolizmaları ile ilişkilidir<sup>69</sup>. Ayrıca yağ dokusundaki kronik düşük dereceli inflamasyon, insülin direnci ve metabolik sendromun patogenezinde katkıda bulunur<sup>69</sup>. Diyet türünün bileşimi, obezite ve buna bağlı metabolik hastalıkların gelişiminde önemli bir rol oynar<sup>70</sup>. Yağ oranı yüksek diyet türleri, enerji yoğunluğu bakımından makro besindir ve karbonhidrat veya proteinden daha az tokluğa neden olur<sup>70</sup>. YYD'nin uzun süre tüketilmesi hiperfajiye, vücut ağırlığı artışına, yağ birikimini indüklediği ve farelerde kan glikoz, insülin düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir<sup>71-73</sup>.

Harcanabilen enerjiden fazla tüketilen kalori alımı, yağlanma artışına ve obeziteye yol açar<sup>74</sup>. Kısa süreli YYD ile beslenmenin ilk adımı hipotalamusta meydana gelen inflamasyondur<sup>75</sup>. YYD tüketiminin birinci gününden itibaren hipotalamusta pro-inflamatuar sitokinlerin (tümör nekroz faktörü; TNF  $\alpha$  ve interlökin 6; IL6) sayıca arttığı gösterilmiştir<sup>76</sup>. Kronik tüketimi ise obeziteye yol açan hipotalamik inflamasyona sebep olmaktadır. Hipotalamusta astrositler ve mikroglia gibi iki ana tip glial hücre vardır<sup>77</sup>. Glial hücreler enerji dengesinin düzenlenmesi için vazgeçilmezdir. Kemirgenlerde mikroglia, YYD ile beslenmeyle aktive edilir<sup>78</sup>. Obezite, mikroglial hücre aktivasyonu mekanizması yoluyla nöroinflamatuvar aktivasyonun artmasıyla ilişkilendirilmiştir<sup>79</sup>. Son araştırmalar, YYD beslemesi altında ARC'daki mikroglia hücrelerinin sayısının arttığını göstermiştir<sup>80</sup>. YYD'in neden olduğu inflamatuvar yanıtta hipotalamik bölgede sızıntı yapan bir KBB gözlemlendi<sup>81</sup>. Sızıntının sebebinin hipotalamik bölgedeki perivasküler makrofajların, YYD tüketiminde bol miktarda indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) üretmesi olduğu ve ARC'da monosit türevi makrofajların yayılmasına yol açtığı bulunmuştur<sup>82</sup>. Beklendiği gibi, spesifik hipotalamik makrofaj iNOS inhibisyonu, obez farelerin ARC'ında astrositik lipid damlacıklarını ve makrofaj birikimini ve aktivasyonunu tamamen ortadan kaldırır. Bu da KBB harabiyetinin obezitenin hipotalamus üzerindeki ilerleyici inflamasyon etkisinde bir başlangıç basamağı olduğuna işaret eder.



**Şekil 2.6. YYD ile beslenmenin POMC nöronlarına zararlı etkileri.** POMC nöronları fizyolojik fonksiyonlarını otofaji ve yetişkin nörojenezi yoluyla sürdürürler. YYD diyetiyle beslenmenin neden olduğu inflamasyon, kronik ROS üretimi ve ER stresi, POMC fonksiyonlarını ve projeksiyonlarını bozar. ER, endoplazmik retikulum; HF diet, yüksek yağlı diyet; hNSC, hipotalamik nöral kök hücre; IKK $\beta$ , I $\kappa$ B kinaz  $\beta$ ; NF- $\kappa$ B, nükleer faktör- $\kappa$ B; iPSC, uyarılabilir pluripotent kök hücre; POMC, pro-opiomelanokortin; PPAR $\gamma$ , peroksisom proliferatörüyle aktiveleştirilen reseptör gama; ROS, reaktif oksijen türleri. Şekil makaleden alındı.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

Deneyler, Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde (YÜDETAM) ve Tıp Fakültesi Fizyoloji Ana Bilim Dalı Beyin Araştırmaları Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Deney protokolü Yeditepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu (YÜDHEK) tarafından onaylanmıştır.

#### 3.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada, 90 adet transgenik POMC-Cre (Jax. Lab. #010714) fareler kullanıldı. Bu fareler Jackson (Jax) Laboratuvarı (ABD)'den ithal edilmiş ve üretilmiştir. Deney hayvanları  $21 \pm 1$  °C ısı ve 12 saat aydınlık-karanlık programı olan ortamda barındırıldı. Farelere standart fare yemi (pelet) ve normal musluk suyu *ad libitum* verildi.

#### 3.2. Farelerin Üretim

Bu çalışmada kullanılan POMC-Cre transgenik fare hattı Jackson (Jax) Laboratuvarından 2 erkek ve 2 dişi fare olacak şekilde ithal edilmiştir. Jackson laboratuvarının önerdiği şekilde bu fareler C57B16/L (yabanıl tip) farelerle çiftleşme stratejisi uygulandı. Bu stratejiye uygun olarak iki dişi ve bir erkekten oluşan çiftleşme kafesi oluşturuldu. Sonrasında farelerin östrus siklüs takibi yapıldı ve gebe kalan fareler bireysel kafeslere alındı. Tüm bu POMC-Cre fare hattının üretimi ve bakımı YÜDETAM'da yapıldı.

#### 3.3. Genotipleme

Yeni doğan yavruların laktasyon dönemi beklendi ve 30. günde hayvanlar cinsiyetlerine göre ayrıldı. Otuzuncu günde yavruların kulaklarına küpe takılarak, kulak dokusu alındı. Kulak dokuları +4 °C'de DNase'den arındırılmış deney tüplerine alındı. Her bir örneğe 100 µl 25 mM NaOH/0.2 mM EDTA solüsyonundan eklendi. Bu örnekler 98 °C'de 60 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 4 °C'ye alınan dokular 100 µL 40 mM Tris-HCl solüsyonu ile 4000 rpm'de 3 dakika santrifüj (Mikrosantrifüj, Sigma 1-14) edildi. Hazırlanan solüsyon genotipleme için yeni tüplere aktarıldı.

#### 3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Agaroz Jel Elektrofrezisi

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) için aşağıda dizisi belirtilen primerler kullanılmıştır. Bu diziler Jackson Lab.' a ait POMC-Cre transgenik farelerin genotiplemesi için Cre varlığını saptamak üzere belirlenmiş dizilerdir. PZR optimizasyonu sonrası bu gen bölgeleri için aşağıdaki reaksiyon koşulları kullanılmıştır. Hazırlanan PZR karışımı

tüplere ayrı ayrı dağıtıldı ve DNA örnekleri yüklendikten sonra aşağıdaki PZR koşullarında reaksiyon başlatıldı.

**Tablo 3.1.** Genotipleme için kullanılan pzs solüsyonunun hazırlanması için kullanılan konsantrasyon ve hacim değerleri.

Mutant Gen için Reaksiyon Çözeltisi (A)	Final Konsantrasyon	12.5µl reaksiyon için gereken hacim (µl)
Taq 2X Master Mix (NEB kat. No: M0270L)	1X	6.25
Primer 1 *	0.25 µM	0.50
Primer 2 **	0.25 µM	0.50
ddH <sub>2</sub> O	-	3.25
DNA örneği	-	2

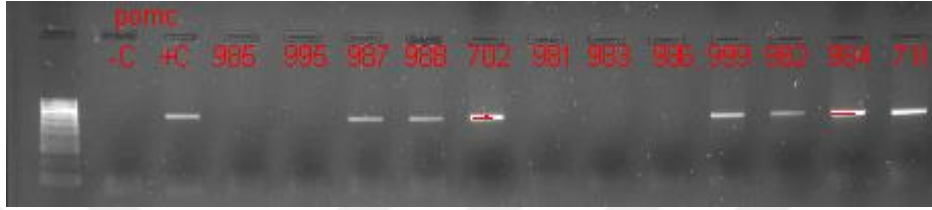
\* Primer 1 GCC AGC TAA ACA TGC TTC ATC Mutant Forward

\*\* Primer 2 ATT GCC CCT GTT TCA CTA TCC Mutant Reverse

**Tablo 3.2.** Genotipleme için kullanılan PZR koşulları.

Adım #	Sıcaklık (°C)	Süre	Notlar
1	95°C	30sn	
2	95°C	30 sn	10 Tekrar Döngüsü -0.5°C
3	65°C	15 sn	
4	68°C	1 dk	
5	95°C	30 sn	
6	60°C	20 sn	28 Tekrar Döngüsü
7	72°C	20 sn	
8	72°C	5 dk	
9	4°C	∞	

PZR ürünleri 1X TBE tamponu ile hazırlanan %2 agaroz jele yüklendi ve 200V'ta 1 dk yürütüldü. Bantlar UV altında incelendi ve büyüklük durumuna göre mutant (POMC-Cre geni taşıyan) veya yabancı tip fareler belirlendi. 750baz çifti görünenler pozitif (+C), mutant bant görüntülenemeyenler(-C) yabancı tip olarak ayrıldı. Sadece mutant olan yavrular deneylerde kullanılmak üzere ayrıldı. Aşağıda örnek bir jel görüntüsü bulunmaktadır:



Şekil 3.1. Agaroz jel (%2'lik) içerisinde yürütülmüş Cre pZR reaksiyon görüntüsü.

### 3.5. Cre rekombinaz Bağımlı AAV virüslerin İntrakraniyal Enjeksiyonu

İntrakraniyal enjeksiyonu için ABD de bulunan Addgene firmasından ([www.addgene.org](http://www.addgene.org)) pAAV-hSyn-DIO-hM3D(Gq)-mCherry ve AAV-CAG-Flex-GFP virüsleri satın alındı. Tercih edilen bu virüslerin genetik haritasında GFP ve mCherry geni ile Cre enziminin bağlandığı LoxP genlerini de içermesidir. Bu sistemin sunmuş olduğu avantaj Cre bağımlı transgenik fare hatlarında Cre rekombinat enzimini içeren spesifik nöronları işaretleyerek, bu nöronların GFP ve mCherry sentezlemesine olanak sağlamasıdır. Bu çalışmada POMC-Cre farelere bu virüsler enjekte edilerek POMC nöronlarının GFP ve mCherry ile işaretlenmesi gerçekleştirildi. Virüs enjeksiyonları stereotaksik (David Kopf) cihaz içerisinde izofluran gaz anestezisi kullanılarak yapıldı (Şekil 3.2). İntrakraniyal Enjeksiyonların yapım aşaması, fareler hafif izofluran anestezisi altında stereotaksik cihazına yerleştirildiler. Cihaza yerleştirildikten sonra, solunabilir oksijen ile %-2 izofluran uygulanarak fareler derin anestezide alındı. Gazlanma işlemi operasyon boyunca devam etti. Fareler derin anestezide girdiklerinden emin olduktan sonra tıraş makinası vasıtasıyla kafa derisi üzerindeki kılların kesimi gerçekleştirildi. Bu işlem bittikten sonra tıraş edilen kısım kulak pamuğu kullanılarak antiseptik uygulandı. Sonrasında farelerin kafa derisine makas ile kesi atıldı. Manipülasyon yapacağımız kısma soğuk Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ve serum fizyolojik uygulayarak kafasında bulunan

Bregma – Lambda noktalarının görünürlüğünü artırıldı. Elektrot tutucu ile fare Bregma-Lambda noktaları arası uzunluk ölçüldü. Hipotalamik ARC bölgesinin koordinat noktaları fare beyin atlasında belirtildiği gibi 1,35 mm posteriyor,  $\pm 0,35$  mm lateral ve 5,75 mm vertikal olarak belirlendi. Stereotaksik cihazına yerleştirilen her farenin Bregma-Lambda noktaları arasındaki mesafe ölçümü yapılarak, bu koordinatlara göre oranlaması yapıldı. Yeni oluşan enjeksiyon noktasına cerrahi matkap kullanılarak küçük bir delik açıldı. Beyin içi enjeksiyonlarda kullanılan mikro pipetlerin (Drummond Scientific, Wiretrol, Broomall-PA) uçlarının beyin dokusuna daha az zarar vermesi için pipet çekme cihazı (Narishige, Japonya) ile uçları daha ince ( $50\mu\text{m}$ ) çap genişliği olacak şekilde ayarlandı. İşleme uğramış pipetlerin içlerine mineral yağ ile dolduruldu ve mikro manipülatör cihazına yerleştirildi. Pipet içerisindeki mineral yağın bir kısmı dışarı çıkartılarak, yerine  $1,2\mu\text{l}$  virüs çekildi. Hipotalamik ARC bölgesine iki taraflı intrakraniyal olarak 300 nl virüs enjekte edildi. Her bir bölgeye enjeksiyon yapıldıktan sonra 15 dakika beklenildi. Tüm işlemler bittikten sonra kafa derisi 4.0 cerrahi iplikle dikiş atıldı. Dikiş sonrası manipülasyona uğrayan bölge tekrar antiseptik kullanılarak temizlendi.



Şekil 3.2. Stereotaksik cihaza yerleştirilen farede cam pipetle virüs enjeksiyonu.

### 3.6. Beyin Kesiti Hazırlanması

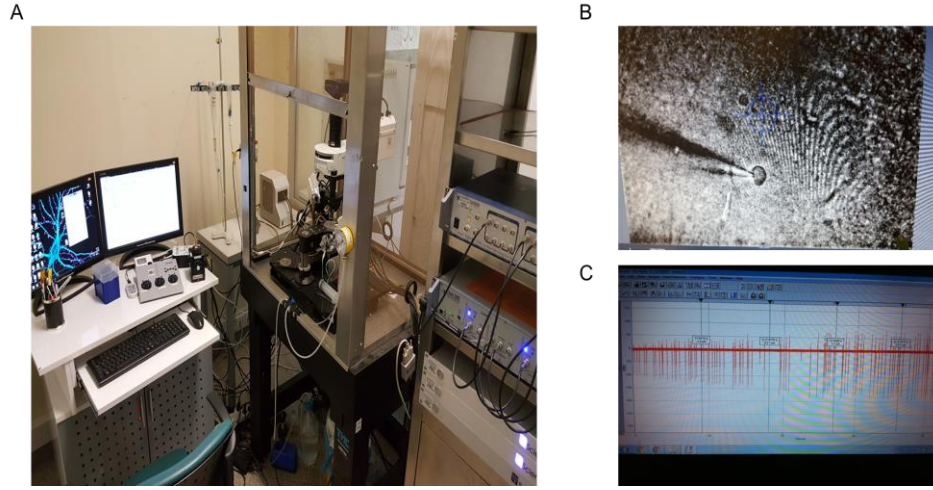
Virüsü enjeksiyonu yapılan POMC-Cre fareler uygun şekilde anestezi altında dekapite edildi. Fare beyinleri hızlı bir şekilde kesme (Cutting) solüsyonu içerisine aktarılarak vibratom (Campden Instruments 5100mz) cihazı ile 250  $\mu$ M kalınlığın da ARC'ın bulunduğu kesitler alındı (Şekil 3.3). Kesme (cutting) solüsyon içeriği: (92.0 mM NMDG, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 30.0 mM NaHCO<sub>3</sub>, 20.0 mM HEPES, 25.0 mM glikoz, 2.0 mM tiyoüre, 5.0 mM Na-askorbat, 3. mM Na-piruvat, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O ve 10.0 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O). Beyin dokuları kesim ve bekleme süreleri boyunca daima %95 O<sub>2</sub> /%5 CO<sub>2</sub> gazı ile müdahale edildi. Vibratom cihazı ile alınan kesitler, pastör pipet vasıtasıyla HEPES içeren yapay beyin omurilik solüsyonu (aCSF). HEPES- aCSF içeriği: (92.0 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 30.0 mM NaHCO<sub>3</sub>, 20.0 mM HEPES, 25.0 mM glikoz, 2.0 mM tiyoüre, 5.0 mM Na-askorbat, 3.0 mM Na-piruvat, 2.0 Mm CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O ve 2.0 mM MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O) aktarıldı. Kesitler bu solüsyon içerisinde en az 1 saat inkübe edildi. Daha sonra elektrofizyoloji banyosunda perfüze edilen kayıt solüsyonu içerisine aktarılarak, işaretlenmiş nöronlardan elektrofizyoloji patch clamp tekniği kullanılarak, gevşek kayıt (cell-attach) ve tüm hücre (whole cell) kayıtları alındı. Kayıt solüsyonu (recording aCSF içeriği): 124 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 24 mM NaHCO<sub>3</sub>, 12.5 mM glikoz, 5.0 mM HEPES, 2.0 Mm CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O ve 2.0 mM MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O) (Ting vd. 2018).



Şekil 3.3. Beyin kesitlerinin alınması.

### 3.7. Elektrofizyoloji kayıtları (Patch clamp)

Protokole uygun olarak hazırlanan fare beyin kesitleri, pastör pipet vasıtasıyla patch clamp (MultiClamp 700B Axon CNS) banyosuna yerleştirildi. Şekil 8’de Faraday kafesi içindeki cam pipet sistemi ve banyo, amplifikatörler ve kayıt sistemi görülmektedir. Elektrofizyoloji cihazının banyosunda daima kayıt solüsyonu gazlanarak perfüze edildi. Öncelikle hipotalamus ARC’ta lokalize olan ve GFP ile işaretlenmiş POMC nöronlarından gevşek kayıt tekniği ile popülasyon kayıtları alındı. Her fare beyin kesitlerinden yaklaşık 10 nöron kaydı alındı. Sonrasında cihazın banyosuna 100nM Leptin perfüze edilerek POMC nöronlarından aynı şekilde popülasyon kayıtları alındı. Bu teknikle alınan kayıtlarda (gevşek kayıt) pipetinin içerisinde kayıt solüsyonu bulunmaktadır ve pipet direnci 7-9 M $\Omega$  olacak şekilde ayarlandı. Gevşek kayıt tekniği ile alınan bu bulgular, POMC nöronlarının üzerinde oluşan ateşleme frekansının Leptin varlığında nasıl değiştiğinin göstermektedir. POMC nöronlarına gelen uyarıcı ve inhibisyon akımlarının ve Leptin hormonun bu akımlara olan etkisini ölçmek için elektrofizyoloji tüm hücre (whole-cell) kayıt tekniğini kullanıldı. Öncelikle hücre zarına sıkı şekilde mühür yapılarak, hücre zarının kırılması gerçekleştirildi. Diğer protokole benzer şekilde her beyin kesitinden kontrol kayıtları alındıktan sonra elektrofizyoloji banyosuna Leptin perfüze edildi. Uyarıcı post sinaptik akımların (sEPSC) kaydı alınması sırasında banyoda daima GABA<sub>A</sub> (50 $\mu$ M) antagonisti Picrotoxin kimyasalı bulunurken, inhibe post sinaptik akım (sIPSC) kayıt alma sırasında ise banyoda AMPA / kainate glutamat reseptör antagonisti ve NMDA reseptör antagonisti olan CNQX (10 $\mu$ M) ve AP5 (50 $\mu$ M) kimyasalı bulunarak hücreyi V=-65mV da kenetleyerek (Patch Clamp) kayıtlar alındı. Voltaj clamp (voltaj kısaç) kayıtları için kullanılan solüsyon içeriği: 125 CsCl mM, 5 NaCl mM, 10 HEPES mM, 0.6 EGTA mM, 4 Mg-ATP mM, 0.3 Na<sub>2</sub>GTP mM, 10 lidokain N-etil bromür (QX-314) mM, (pH 7.35 ve 290 mOsm-1). Current clamp (akım kısaç) kayıtları için kullanılan solüsyon içeriği: 125 potassium glukonat mM, 6.7 KCl mM, 10 HEPES mM, 1 EGTA mM, 4 Mg-ATP mM, 10 sodium fosfokreatin mM (pH 7.25; 290 mOsm-1). POMC nöronlarından alınan elektrofizyoloji kayıtların frekansı, peak amplitude (tepe genliği) değerlerini analiz etmek için Clampfit 10.7 programı kullanıldı.



**Şekil 3.4.** Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin Araştırmaları Laboratuvarı A) Elektrofizyoloji kayıt cihazı B) Kayıt pipetiyle nörona seal (mühürleme) yapılması C) Elektrofizyoloji kayıt örneği.

### 3.8. Beslenme Davranışı

Diyazn edilmiş reseptör aktivasyonu (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs-DREADDs) metodu kullanılarak kemogenetik olarak uyarılacak hayvanlar enjeksiyon sonrası iyileşme ve enfeksiyon süreleri (2 hafta) dolduktan sonra tekli (single house) metabolik kafeslere alındılar. Her grup kendi (enfeksiyon süresi dolduktan sonra) başlangıç süresi başından sonuna kadar, haftalık vücut ağırlığı takibi yapılarak ve kendi 3. ve 6. ayları hesaplanarak deneye alındı. Fareler sabah 07.00 akşam 19.00 olacak şekilde aydınlık ve karanlık periyotlara giriş yaparak 12 saat gündüz 12 saat gece şartlarında yaşamaktadır. Gruplarda zamana bağlı kullanılan yem %60 kkal yağ içeren EF D12492-(I); Ssniff diyetidir.

Davranış deneyleri 3 gün tekli kafese alıştırmaya, 3 gün serum fizyolojik etkisinde ve son 3 gün de klozapin n-oksitin (CNO; 3mg/kg) etkisinde olacak şekilde 9 gün sürdü. Deney sonrası bir gün ise davranış deney saatlerinde kan örneği alınması için ayrıldı. POMC-Cre farelere saat 18:30'da ip serum fizyolojik/CNO uygulandı. Deney günlerinde 18:00-23:00 arası yem tartımları yapıldı. Tüm deney hayvanlarının yemleri 18:30'da çekildi ve 19:00'da CNO bilinen aktivasyon süresi (30dk) geçtikten sonra gramajı bilinen yemler kafeslere kondu. Bir saat aralıklar ile 4 saatlik yem tartımları (20,21,22,23:00) alındı. Dokuz günlük deney ertesi gününde hala tekli kafeslerde olan farelerden deney saatinde (18:30'da) CNO uygulaması sonrası 200µl tokluk kan örneği jugular venden alınarak gruplar toplu kafeslerine geri kondular. Kan alım sırasında glikometre kullanılarak tam kandan glikoz miktarı ölçülerek not alındı. Kan yağı analizleri CNO varlığında tok

hayvanlardan alınan kan örneklerinden elde edilen serumlarda lipit parametre ölçümleri Yeditepe Üniversitesi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında gerçekleştirildi.



Şekil 3.5. Yeditepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Ana Bilim Dalı, Beyin Araştırmaları Beslenme Davranış Laboratuvarı.

### 3.9. Kardiyak Perfüzyon/Fiksasyon ile Deney Sonlandırma ve Postmortem Beyin Dokusunun Saklanması

İzofluoran ile anesteziye alınan hayvanın anestezisi doğrulandıktan sonra, farenin ekstremiteleri ve kuyrukları kesim paneline flaster ile sabitlendi. V kesi ile sternum kaldırılarak toraks boşluğu açıldı. Kalbin apeksinden kelebek iğne ile girilerek sol ventriküle dikkatli bir biçimde yerleştirildi. Daha sonra sağ atriyum kesildi ve üç yollu kanülden önce 5 dk süreyle heparinize serum fizyolojik verilerek perfüzyon yapıldı. Sağ atriyumdan akan sıvının berraklaştığı görüldüğünde kanülün vanası diğer girişe çevrilerek fosfat tamponu içinde % 4 paraformaldehit (PFA) çözeltisi verilmek suretiyle 5 dk süreyle perfüzyon fiksasyonu gerçekleştirildi. Hemen akabinde beyinler bütün olarak çıkartıldı ve % 4 PFA/ PBS çözeltisinde 4 saat 4°C’de inkübe edildi. Kaşık yardımıyla beyin bütünlüğüne hasar vermeden dokular % 30 sukroz/ PBS çözeltisine aktarıldı. Beyinler çökene kadar 4°C’de inkübe edildi. Sukroz solüsyonunda çöken beyinler PBS içerisine alınarak 5dk çalkalayıcı üzerinde yıkandı. % 0.4’lük agaroz jel

(Low Melting Point) hazırlandı. Beyinler oda ısısına soğutulmuş agaroz jel içerisine gömüldü ve donması için 4°C’de 1 saat inkübe edildi. Agarozla gömülü olarak çıkarılan beyinlerin etrafındaki fazla jel kesildi (Şekil 3.6) ve vibratomun doku plağı üzerine yapıştırıldı plak hızlıca 4°C’de soğutulmuş PBS içine alınarak vibratomda (Campden Instruments 5100 mz) 75 µm koronal kesitler alındı. PBS içine toplanan kesitler tüm beyinden örneklemeler yapılarak polilizin kaplı lamlara alındı. Flouromount kapatma solüsyonu ile kesitler kapatıldı.



Şekil 3.6. Agarozla gömülü beyin dokusundan vibratom kullanılarak kesit alınması.

### 3.10. ELİSA Yöntemiyle Serum Leptin Analizi

Serum Leptin seviyelerinin ölçümü için ticari olarak satılan 96 kuyucuklu ELISA kiti (Elabscience, E-EL-M3008, ABD) kullanıldı. Derin dondurucuda (-80 °C) bekletilen serum örnekleri ve test kiti deneye başlamadan yarım saat önce oda sıcaklığına alındı. Deneye dahil edilen örnekler kit içerisinde bulunan standart ve örnek seyreltme solüsyonu ile 1:20 oranında seyreltildi. Kit içerisinde bulunan 20 ng Leptin içerisine 1 ml standart ve örnek seyreltme solüsyonu eklendi. Bu ana stoktan seri seyreltme işlemi ile her seferinde 1:1 oranında seyrelterek 6 adet daha seyreltilmiş standart solüsyonu hazırlandı. Standart ve örnek seyreltme solüsyonu “blank” solüsyonu olarak kullanıldı. Tüm standartlardan ve örneklerden ikişer kuyucuğa, her bir kuyucuğa 100 µl hacimde olacak şekilde 96 kuyucuklu plakaya koyuldu. Plaka üzeri jelatin ile kapatılıp 37 °C’de 90 dakika inkübasyona alındı. Sonrasında kuyucuklar boşaltılarak, yıkama yapılmadan kuyucuklara 100 µl Biotinli Antibody solüsyonu eklenerek plaka jelatin ile kapatıldı ve 37 °C’de 60 dakika inkübasyona alındı. Sonrasında kuyucuklar boşaltılarak kit içerisinde bulunan yıkama solüsyonundan 350 µl eklenerek 1 dk boyunca 3 defa yıkama işlemi yapıldı.

Kuyucuklara 100 µl HRP Konjuge solüsyonu eklenerek plakala jelatin ile kapatıldı ve 37°C’de 30 dakika inkübasyona alındı. Sonrasında kuyucuklar boşaltılarak kit içerisinde bulunan yıkama solüsyonundan 350 µl eklenerek 1 dk boyunca 5 defa yıkama işlemi yapıldı. Kuyucuklara 90 µl substrat solüsyonu eklenerek plaka jelatin ile kapatıldı ve 37 °C’de 15 dakika inkübasyona alındı. Sonrasında kuyular boşaltılmadan üzerine 50 µl Stop solüsyonu eklenerek 37°C’de 450 nm dalga boyunda Optical Density (OD) ölçümü yapıldı.

### **3.11. C-Fos İmmünohistokimyasal Boyama**

CNO uygulamasından sonra aktif nöronları saptamak için alıcı bölümlerde c-Fos protein tayini yapıldı. Kesitler %3 sığır serumu ve % 0.3 Triton-X-100 (Sigma, T9284-12) 1X PBS (Invitrogen, 00-3002) içeren bir blokaj solüsyonunda 90dk inkübe edildi. C-Fos antikoru (Abcam, ab190289) 1: 2000 oranında % 3lük sığır serumu içinde hazırlandı. Dokular gece boyunca 4 °C’de sallanmaya bırakıldı. Kesitler, ikinci antikor uygulamasından önce 15 dakika boyunca 3 kez 1X PBS ile yıkandı. İkincil antikor 1: 1000 oranında Goat anti-Rabbit Alexa Fluor 488 (Invitrogen, A11008) antikoru, 1X PBS, % 0.3 Triton-X-100’den oluşur. Kesitler, sekonder antikor solüsyonunda (ışıkta kaçınmak için) alüminyum folyo ile 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Dokular 3 kez 15 dakika boyunca 1X PBS ile yıkandı, daha sonra lamlara alındı, kurutuldu ve montaj ortamı (Sigma, F4680-2ml) ile lamel ile kaplandı.

### **3.12. Konfokal Mikroskopisi**

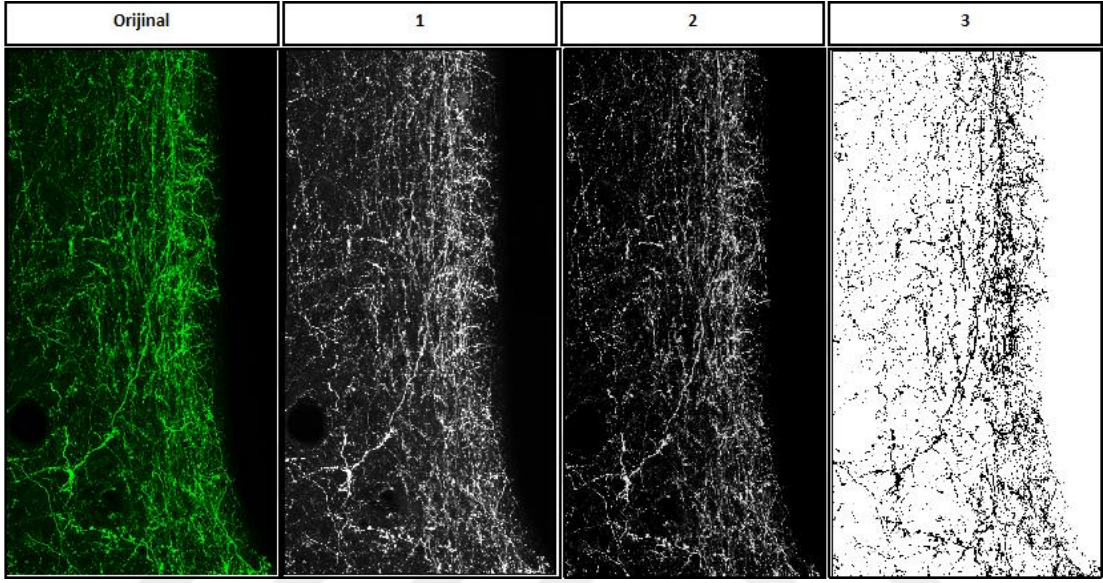
Enjeksiyon ve projeksiyon bölgeleri konfokal mikroskopta (Carl Zeiss Model: LSM700; yazılım: ZEN 2011, ver 8.0) 63X yağ immersion objektifi kullanılarak görüntülendi. Görüntüler Image J yazılımı kullanılarak Z stack çekimler üç boyutlu hale getirilerek paraventricüler çekirdek (PVN), stria terminalisin yatak çekirdeği (BNST) ve lateral hipotalamus (LH) bölgesinden dendritik diken, sinaptik terminal, aksonal uzantı ve enjeksiyon bölgesindeki enfekte olmuş nöron sayısı bakımından kantitatif olarak değerlendirildi.

### **3.13. Morfolojik Analiz**

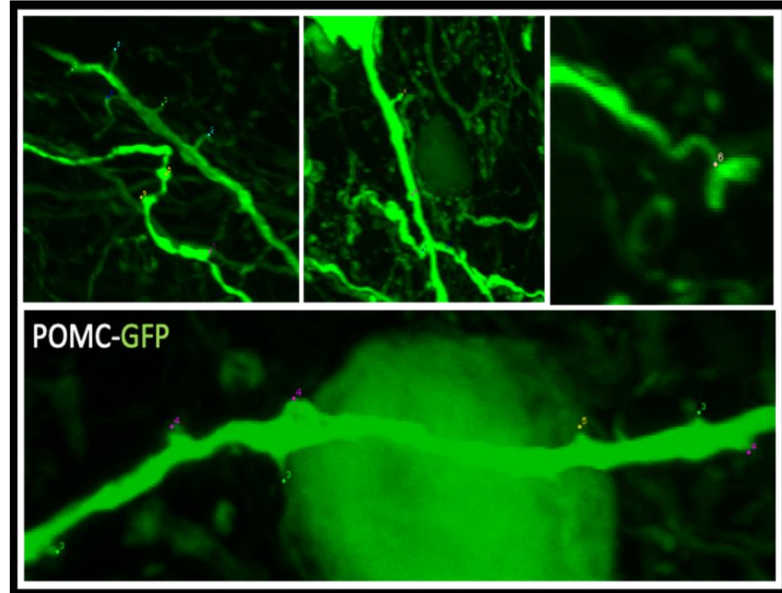
#### **3.13.1. Dendrit ve aksonal sayımlar**

Konfokal mikroskobu ile 63X objektif ile (derin görüntüleme -Z stack- bölge tarayarak birleştirme – tile scan- yapılarak) 63X immersiyo n yağ ile büyütme kullanılarak) çekilen

görüntüler BNST, LH ve PVN alanları için iki kesitten ‘‘IMAGE J’’ programı ile otomatik olarak sayıldı. Programda açılan görüntüler 8 bit’e çevrildi. Arka plan ışıklarının uzaklaştırılması için arka plan karartma yapıldı. Işımların otomatizasyonu için görüntüler ikili koda dönüştürüldü. Daha sonra tanımlı partikülleri sayma kısmından, program var olan ışımları otomatik olarak saydı ve sonuç ekranında çıkan sayılar not alındı.



Şekil 3.7. Image J programı analizinin farklı aşamalarda gösterilmesi.



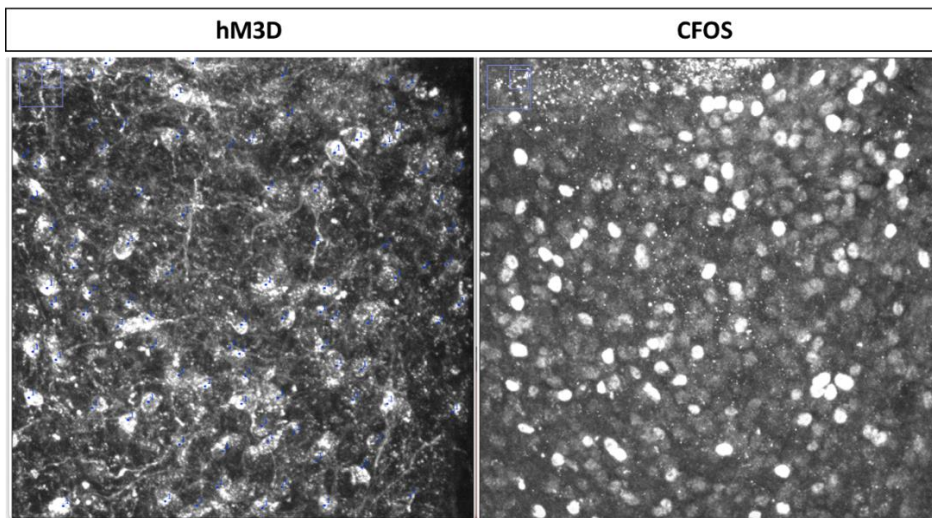
Şekil 3.8. POMC-GFP ifadeli bir somadan çıkan dendritik dikenlerin sayımının yapıldığı konfokal mikroskopi görüntüsü (63X).

### 3.13.2. *C-Fos* immünofloresan görüntülerin Image J programı ile analizi

Görüntülenen hayvanlar her gruptan iki slays (enfeksiyon merkezi olmasına dikkat edilerek seçilmiş) olacak şekilde örneklenmiştir. Her slays sağ ve sol olmak üzere 2 figürden oluşmaktadır. Sayım IMAGE J programında %75 büyütme ile üçüncü ventrikülün hemen yanı ARC odaklı yapılmıştır. Konfokal görüntülerinden yeşil, kırmızı ve sarı floresan ışına yapan nöronlar sayıldı. Kırmızı; enfekte olmuş aktivasyon virüsü taşıyan nöronları ifade ederken, yeşil; cfos aktivasyonu gösteren nöronları işaretlemektedir. Sarı ise her iki rengi de yansıtan örtüşen alanları göstermektedir. Sayımlarda sarı, renkli versiyondan, kırmızı ve yeşil, renksiz ve IMAGE J programının kanal ayırma özelliği kullanılarak yapılmıştır. Konfokal görüntüleri üzerinden yapılan sayım sonrası analiz için aktif nöron sayısının (yeşil) enfekte nöron sayısına (kırmızı) oranı kullanılarak, olası enfeksiyon farklarının normalize edilmesi amaçlanmıştır. Renksiz versiyonda hM3D yoğunluğu virüsün hücrelerdeki farklı yoğunluğunun her zaman yeterli görünmemesi ve dokunun derininde kalan nöronların da görünme kalitesinin düşmesi sebebiyle sarı versiyonda sayılan değerler eğer kırmızıdan fazla ise eksik hM3D varlığı sarı hücre sayısından yararlanılarak excel üzerinde düzeltilmiştir. Renksiz versiyonda bazı nöronlar görünmemekte fakat renklide sarı çerçeveli cfos aktif hücrelerin varlığı görülmüş ve bu nöronlar da aktif POMC olarak kabul edilmiştir. Programda izlenen adımlar sırasıyla aşağıdaki gibidir.

Renk kanallarının ayrılması için izlenen sıra; Image> Color > Split channels

Sayım için izlenen sıra; Plugins> Analyze > Cell counter

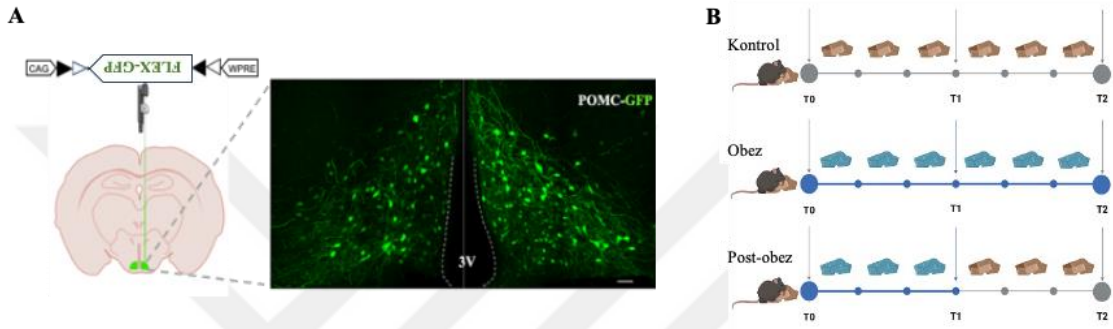


Şekil 3.9. Image J programında aktif ve enfekte nöronların ayrı kanallarda gösterimi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Yüksek Yağlı Diyetin POMC Nöron Anatomisine Anatomik Etkisi

POMC-Cre farelerin ARC'ta lokalize olan POMC nöronlarının işaretlenmesi amacıyla POMC-ARC koordinatlarına intrakraniyal AAV-CAG-Flex-GFP virüs enjeksiyonu yapıldı. Farelere iyileşme ve enfeksiyon süresi olarak kabul edilen iki hafta beklenildikten sonra Şekil 4.1'de gösterilen protokol şeması uygulanmaya başlandı.

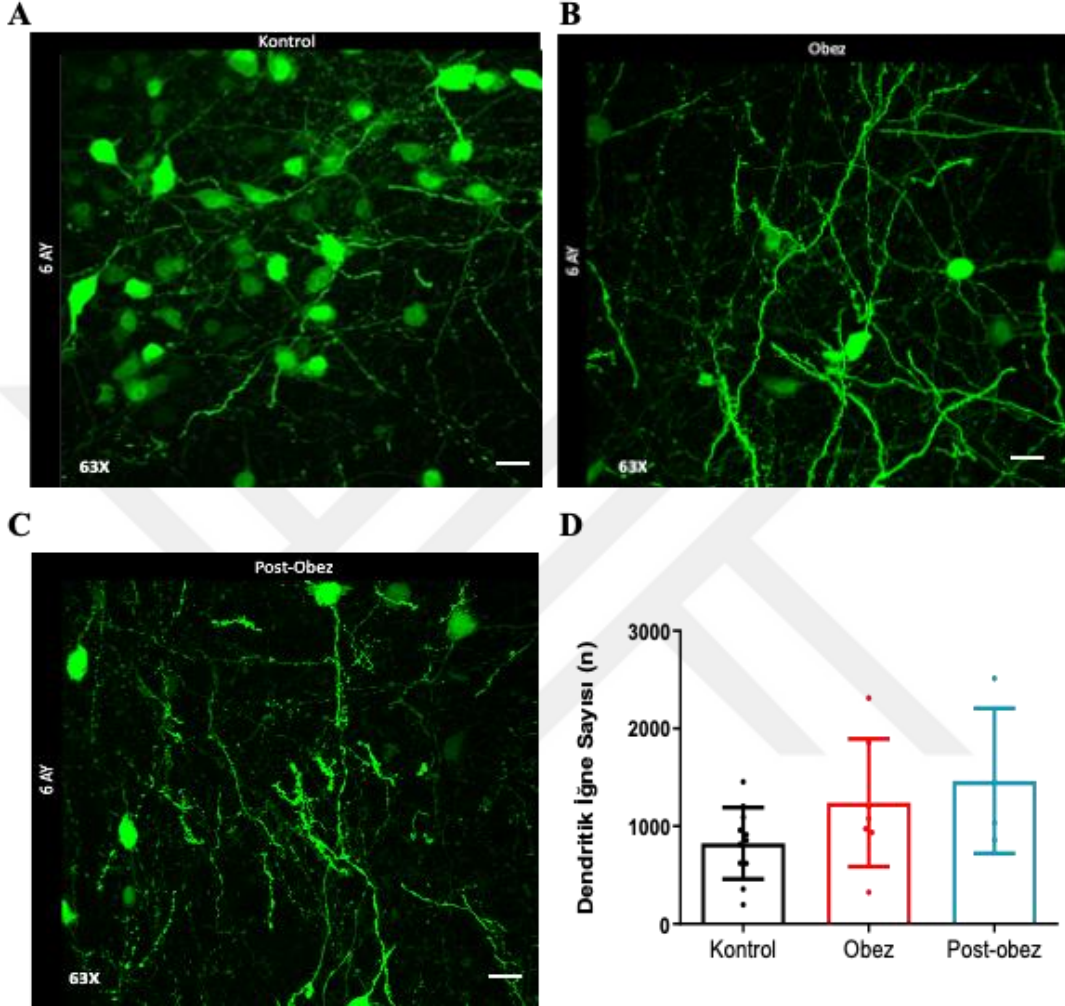


**Şekil 4.1. POMC-ARC nöronlarının hedeflenmesi ve deney gruplarının oluşumu**

- A) ARC intrakraniyal enjeksiyon şematik görüntüsü ve AAV-FLEX-GFP ile enfekte olmuş POMC nöronlarının temsili konfokal mikroskopi görüntüsü (63X; Ölçek çubuğu: 200  $\mu$ m). B) Grupların beslenme değişimlerinin yapılacağı ve örneklerin toplanacağı deney zaman planının şematik gösterimi. Mavi pellet - YYD; kahverengi pelletler-standart diyet; T0-deney başlangıcı; T1-T0+3 ay ; T2- T0+6ay süreyi ifade etmektedir.

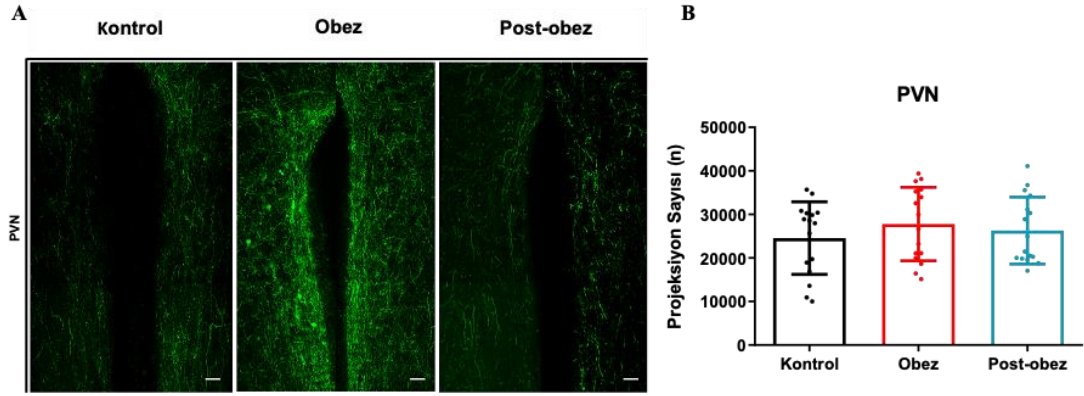
Gruplar Şekil 4.1'de açıklanan şekilde farklı zamanlarda farklı diyet tiplerine maruz bırakıldı. Tablodaki zaman sütununda yer alan T0 beyin içi virüs enfeksiyonu sonrası 3. haftayı, T1 enjeksiyon sonrası 14. haftayı ve T2 24.haftayı ifade etmektedir. Kontrol grubu 6 ay süreyle standart diyet tüketirken, obez grup 6 ay süreyle YYD tüketmiş ve post obez grup 3 ay süreyle YYD tüketmiş, ardından 3 ay boyunca standart diyet tüketmiştir. ARC POMC nöronlarının hem PVN, BNST ve LH bölgelerine yapmış olduğu projeksiyonlardaki hem de dendritik diken sayısındaki YYD'e bağlı değişiklikleri saptamak konfokal mikroskopisinden faydalandık. YYD tüketen ve tüketmeyen gruplarda enfekte POMC nöron sayısına bağlı görüntülenen dendritik iğne sayısı oranında

ve projeksiyon bölgelerine giden aksonal yoğunluğunda anlamlı bir fark yoktur (Şekil 4.2-5).



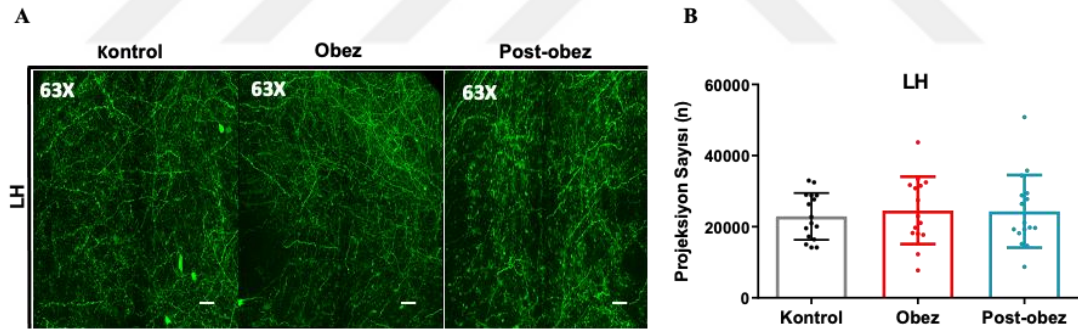
**Şekil 4.2. Kronik YYD'nin POMCARC dendritik iğne sayısına etkisi**

A) Kontrol grubuna ait POMC-GFP enfeksiyonlu somaların ve dendritlerin 6. ay representatif konfokal mikroskopi görüntüsü (63X; Ölçek çubuğu: 200  $\mu$ m) B) Obez grubuna ait POMC-GFP enfeksiyonlu somaların ve dendritlerin 6. ay representatif konfokal mikroskopi görüntüsü (63X). C) Post-obez grubuna ait POMC-GFP enfeksiyonlu somaların ve dendritlerin 6. Ay konfokal mikroskopi görüntüsü (63X). D) POMC-GFP enfeksiyonlu somaların dendritik iğne sayısı (kontrol n=9081 diken; n=11 fare, obez n=8681 diken; n=7 fare, post-obez n=5852 diken; n=4 fare) Veriler ortalama  $\pm$  standart sapmadır. İstatistiksel analiz: Tek yönlü ANOVA ve Tukey'in çoklu karşılaştırma testi.



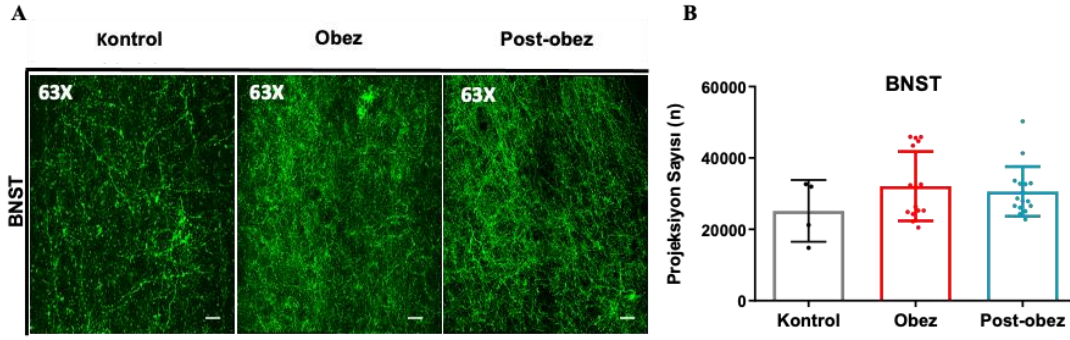
**Şekil 4.3. Kronik YYD'nin POMC-ARC → PVN projeksiyon sayısına etkisi**

A) POMC-ARC nöronlarından PVN'e projeksiyon yapan aksonların 6. ay konfokal görüntüsü (63X; Ölçek çubuğu: 200  $\mu$ m) B) POMC-GFP enfeksiyonlu somalardan PVN'e projekte eden akson sayısı (6.Ay kontrol, obez ve post-obez; n=4 fare). Veriler ortalama  $\pm$  standart sapmadır. İstatistiksel analiz: Tek yönlü ANOVA ve Tukey'in çoklu karşılaştırma testi.



**Şekil 4.4. Kronik YYD'nin POMC-ARC → LH projeksiyon sayısına etkisi**

A) POMC-ARC nöronlarından LH'e projeksiyon yapan aksonların 6. ay konfokal görüntüsü (63X; Ölçek çubuğu: 200  $\mu$ m). B) POMC-GFP enfeksiyonlu somalardan LH'e projekte eden akson sayısı (6.Ay kontrol, obez ve post-obez n=4 fare). Veriler ortalama  $\pm$  standart sapmadır. İstatistiksel analiz: Tek yönlü ANOVA ve Tukey'in çoklu karşılaştırma testi.

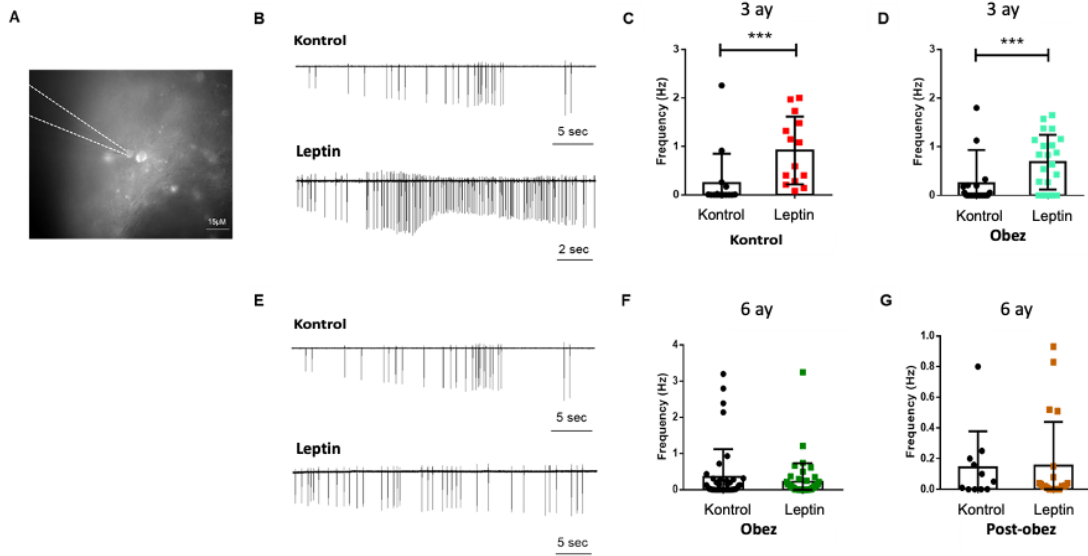


Şekil 4.5. Kronik YYD'nin POMC-ARC → BNST projeksiyon sayısına etkisi

A) POMC-ARC nöronlarından BNST'ye projeksiyon yapan aksonların 6. ay konfokal görüntüsü (63X; Ölçek çubuğu: 200  $\mu$ m). B) POMC-GFP enfeksiyonlu somalardan BNST'ye projekte eden akson sayısı (6.Ay kontrol, obez ve post-obez; n=4 fare). Veriler ortalama  $\pm$  standart sapmadır. İstatistiksel analiz: Tek yönlü ANOVA ve Tukey'in çoklu karşılaştırma testi.

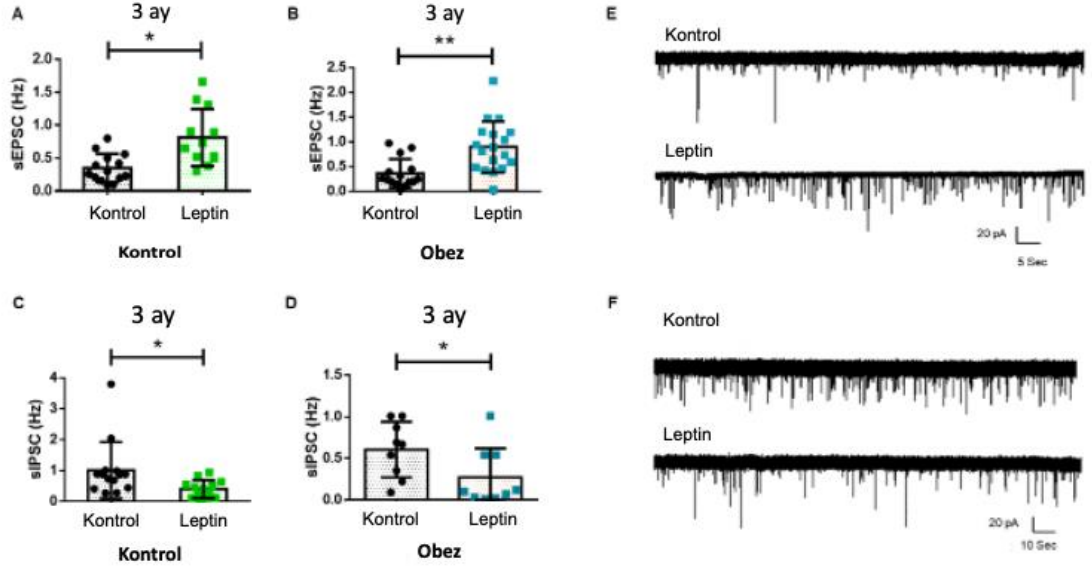
#### 4.2. Yüksek Yağlı Diyetin POMC Nöronlarının Elektrofizyolojik Özelliklerine Etkisi

POMC-Cre farelerde ARC-POMC nöronları FLEX-GFP ile işaretlendi. ARC-POMC nöronlarından gevşek bağlanma (loose seal) tekniğiyle hücrelerde oluşan aksiyon potansiyel akımlarının kaydı alındı. Leptinin POMC nöronlarında ateşleme frekansını arttırdığı bilinmektedir<sup>11</sup>. 3 ay boyunca standart diyet ile beslenen kontrol grubunda ve YYD ile beslenen obez grubunda hücre atım frekansının leptin ve salin varlığındaki ateşleme frekansları karşılaştırıldığında, her iki grupta da leptin, ARC-POMC nöronlarının ateşleme frekansını arttırdı (Şekil 4.6). Bu bulgu 3 aylık yüksek yağlı diyet tüketiminin, POMC nöronlarının leptine verdiği ateşleme cevabını değiştirmedeğini göstermektedir.



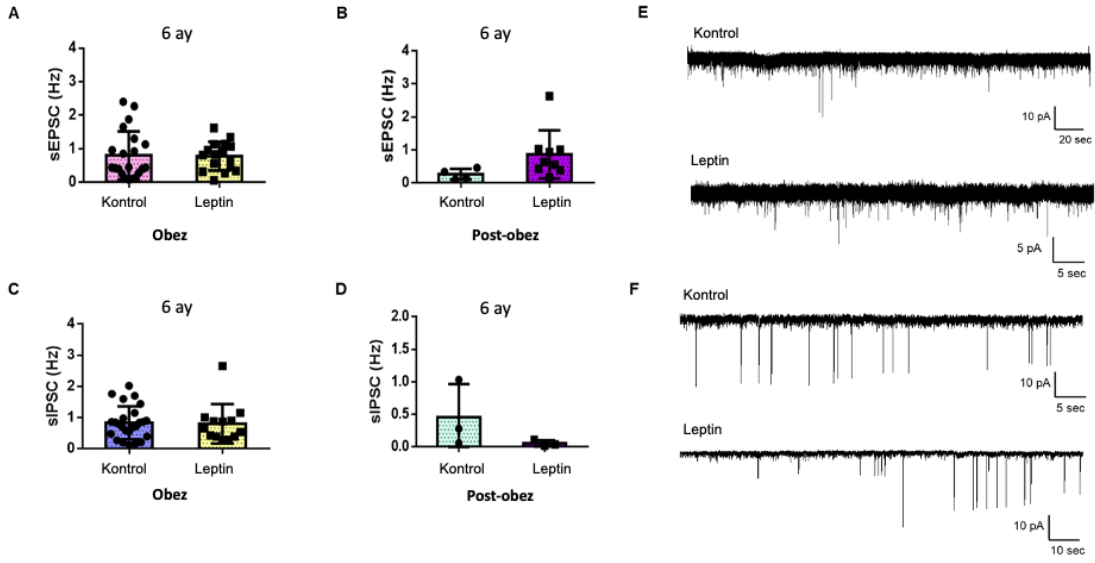
**Şekil 4.6. Kronik YYD'nin POMC-ARC nöronlarının leptinle indüklenmiş frekansına etkisi** A) Bir POMC nöronundan gevşek bağlanma (loose seal) kaydını gösteren temsili görüntü B) Temsili gevşek bağlanma kaydı, POMC eksprese eden hücrelerin Leptin'e yama-kenetleme yoluyla elektriksel tepkisini incelemek için kullanıldı. C-D) Popülasyon kayıtlarına göre 3 aylık standart diyet ve obez grup POMC-Cre farelerde "cell attach" kayıtlarının frekans grafiği (n=3 fare). F-G) Post-obez ve obez grup POMC-Cre farelerin ARC POMC nöronlarından alınan popülasyon kayıtlarına göre frekans grafiği (5 obez fare n=91, 2 post-obez fare n=32). Veriler ortalama  $\pm$  standart sapmadır. İstatistiksel analiz: bağımlı Student's t-testi parametrik olmayan Kolmogorov-Smirnov; \*\*\*p<0.001.

Leptinin postsinaptik akımlar üzerine olan düzenleyici etkisinin 3 ay YYD ile beslenmeden etkilenip etkilenmediğini görmek için kontrol ve obez grup hayvanlardan tam yama kısılacı "whole cell" tekniği ile ARC POMC nöronlarına gelen spontan uyarıcı postsinaptik akım (sEPSC) ve spontan inhibe postsinaptik akım (sIPSC) kayıtları alındı. 3 ay standart ve yüksek yağlı diyet tüketen kontrol ve obez grupların POMC nöronlarından alınan kayıtlarda leptinin POMC nöronlarında eksitator (uyarıcı) akımı her iki grupta da anlamlı derecede arttırdığı ve POMC nöronlarının uyarılabilirliğine pozitif katkı sağladığı gösterildi (Şekil 4.7.) İnhibitör (baskılayıcı) akım üzerine leptin etkisi her iki grupta da anlamlı derecede azaldı (Şekil 4.7).



**Şekil 4.7. Kronik YYD'nin 3. ay sonunda kontrol ve obez gruplarda POMC-ARC nöronlarına gelen spontan uyarıcı ve inhibe edici akımlardaki leptin regülasyonuna etkisi.** A-B) Kontrol ve obez hayvanlarda leptinin sEPSC frekansı üzerindeki etkileri. Kontrol (kontrol n=14 nöron, leptin n=12 nöron) ve obez (kontrol n=15 nöron, leptin n=18 nöron) n=3 fare. C-D) Leptinin kontrol ve obez hayvanlarda sEPSC frekansı üzerine etkileri. Kontrol (kontrol n=14 nöron, leptin n=13 nöron) ve obez (kontrol ve leptin n=9 nöron) n=3 fare. E-F) sIPSC ve sEPSC için temsili gevşek bağlanma kaydı. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapmadır. İstatistiksel analiz: : bağımlı Student's t-testi; \* $p < 0,05$  ve \*\* $p < 0,01$ .

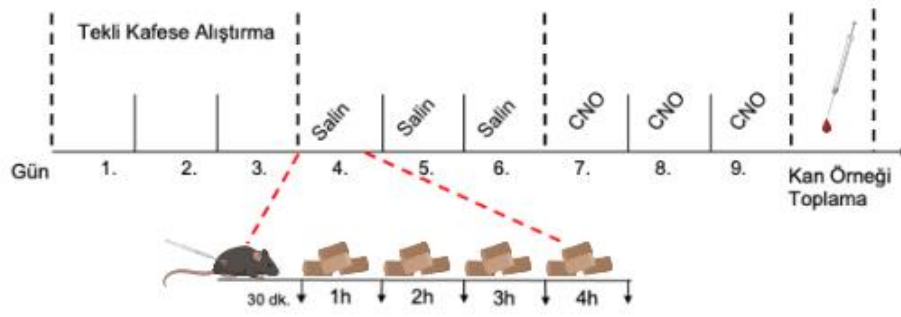
Altıncı ay sonunda obez ve post-obez gruplarından alınan elektrofizyoloji kayıtlarında leptin hormon cevabı değerlendirildi. Leptin hormonu, hem obez hem de post-obez gruplarda POMC nöron aksiyon postansiyel akımlarını değiştirmede (Şekil 4.6). Bu gruplarda leptin, spontan uyarıcı ve inhibe edici post sinaptik akımlar üzerinde de etki göstermedi (Şekil 4.8). Fakat anlamlı olmasa da uyarıcı akımlarda post-obez grubunda kontrol grubuna benzeyen bir artış ve inhibe edici akımlarda ise bir azalış görüldü. Bu sonuçlar POMC nöronlarının kronik yüksek yağlı diyete maruz kalması sonucu leptine duyarsızlaştığını ortaya koymaktadır. Aynı şekilde post-obez gruplarda leptine cevabın iyileşme sürecine benzer olduğu görülmektedir.



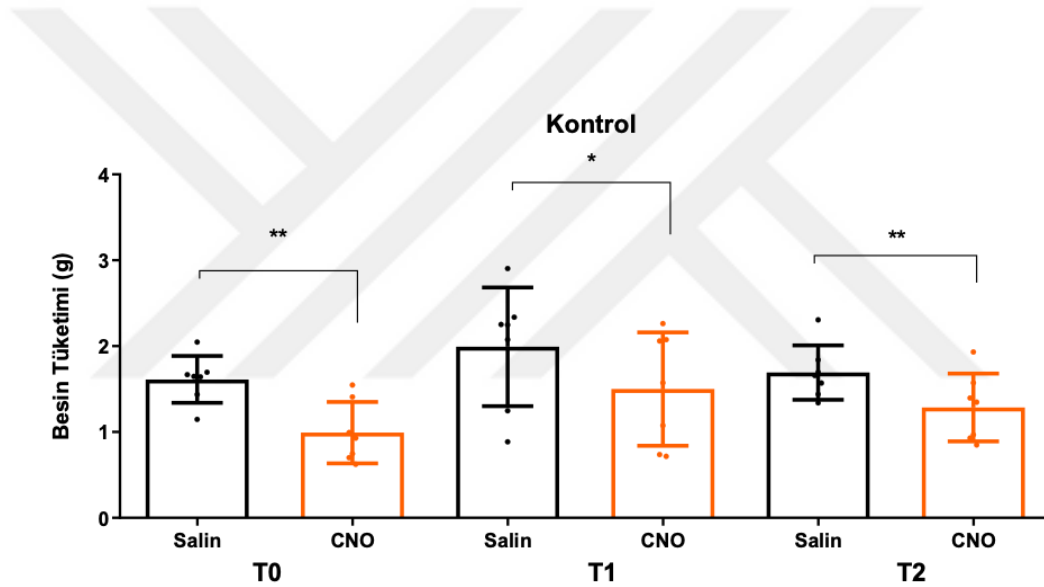
**Şekil 4.8. Kronik YYD'nin 6.ay sonunda obez ve post-obeز gruplarında POMCARC nöronlarına gelen spontan uyarıcı ve inhibe edici akımlardaki leptin regülasyonuna etkisi** A-B) Obez ve post-obeز gruplarında leptinin sEPSC frekansı üzerindeki etkileri. Obez (kontrol n=21 nöron, leptin n=16 nöron; 3 fare) ve post-obeز (kontrol n=4 nöron, leptin n=9 nöron; 2 fare) C-D) Obez ve post-obeز grupta leptinin sIPSC frekansı üzerine etkileri. Obez (kontrol n=25 nöron, leptin n=13 nöron; n=3 fare ve post-obeز (kontrol n=3 nöron, leptin n=3 nöron; 2 fare; E-F) sIPSC ve sEPSC için temsili gevşek bağlanma kaydı. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapmadır. İstatistiksel analiz: bağımlı Student's t-testi.

### 4.3. Yüksek Yağlı Diyetin POMC Nöron Davranışsal Özelliklerine Etkisi

Kemogenetik teknik olan diyazn edilmiş reseptör aktivasyon (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs -DREADDs) metodu kullanılarak POMC nöronlarının uyarılması gerçekleştirildi. Literatürde bilindiği gibi POMC nöronlarının kemogenetik uyarılması sonrası farelerde besin tüketim miktarları anlamlı derece azalır<sup>10</sup>. Şekil 4.9'da davranış deneyinin basamakları şematik olarak gösterilmektedir. POMC-Cre dişi ve erkek farelerde, standart diyet tükettiklerinde POMC aktivasyonunda anoreksijenik yanıt ürettiler. Standart diyetle beslenen kontrol grubunun besin tüketimi, tüm deney zamanlarında anlamlı derecede azaldı (şekil 4.10).



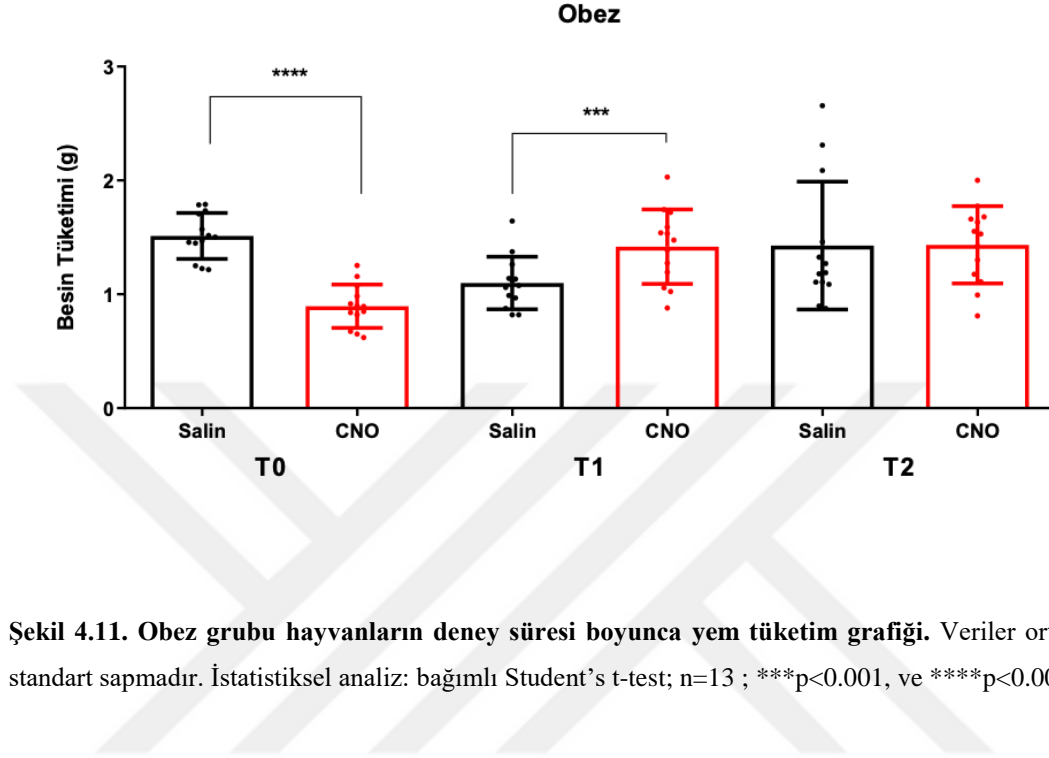
Şekil 4.9. Yeme davranışı deney programının şematik gösterimi.



Şekil 4.10. Kontrol grubu hayvanlarının deney süresi boyunca yem tüketim grafiği. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapmadır. İstatistiksel analiz: bağımlı Student's t-test ; n=7 ; p<0.05 ve p<0.01.

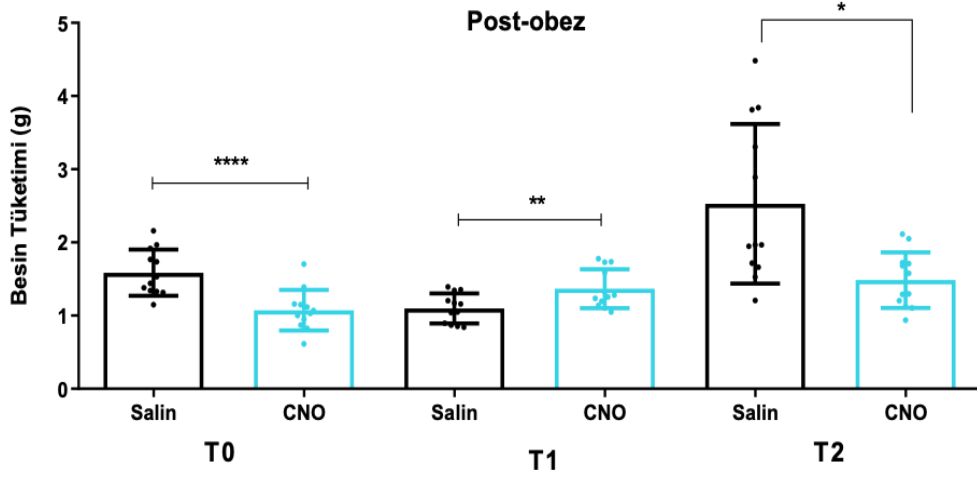
Obez gruptaki farelerde, POMC nöron aktivasyonu sonrası besin alımını düşü (T0; şekil 4.11). Yağlı diyet sonrası gelişen adaptasyonlar sonucu, POMC nöronları CNO tepkisi hızlı gıda alımını tetikledi (T1; şekil 4.11). POMC nöron aktivasyonu kronik YYD tüketimi sonrasında besin alımını baskılayıcı rolünü, besin alımını arttırıcı olarak değiştirmiş, fizyolojik dengeyi negatif enerji dengesi yönünde kaydırmıştır. T2 zamanında POMC aktivasyonu sonrası besin alımında anlamlı bir değişme olmadı.

POMC nöronları uyarılabilirliğinin obez grupta T2 döneminde düşük olduğu c-Fos boyamasındaki sonuçlarla (şekil 4.17) desteklenmektedir.

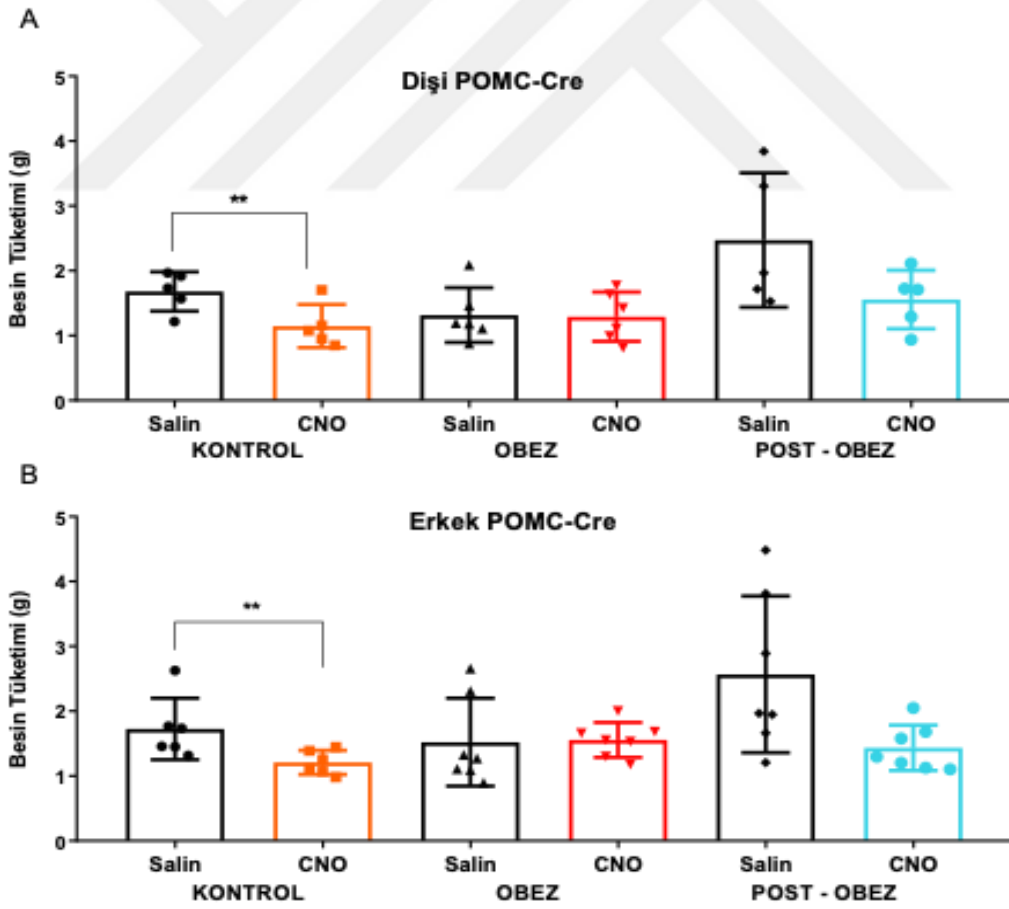


Şekil 4.11. Obez grubu hayvanların deney süresi boyunca yem tüketim grafiği. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapmadır. İstatistiksel analiz: bağımlı Student's t-test; n=13 ; \*\*\*p<0.001, ve \*\*\*\*p<0.0001.

POMC nöron aktivasyonu, post-obez grubunda T0 zamanında besin alımını azalttı (şekil 4.12). Post-obez grup, diyet tipine bağlı değişikliklerin kalıcılığının test edildiği gruptur. T1 zamanında 3 aylık süreyle YYD'e maruz kalan grupta besin alımı POMC aktivasyonunda anlamlı derecede artış gösterdi. T2 zamanında aynı hayvanların 3 aylık süreyle standart diyet ile beslenmesi sonucu POMC aktivasyonu sonucu besin alımı anlamlı derecede azaldı (şekil 4.12). Davranış deney sonuçları arasındaki en çarpıcı bulgu obez ve kontrol grubun 6. ayda da bir önceki deneyde gösterdiği yanıtı sürdürürken, post-obez grup POMC aktivasyonunda 3.ayda gösterdiği oreksijenik yanıtı uzaklaşarak tam tersi bir yanıt göstermesidir. Bu bulgu post-obez grubundaki davranışın beslenme tipine bağlı olduğunu kanıtlar niteliktedir. Diyet tipine bağlı değişen davranışsal yanıtın geri döndürülebildiğinin gösterilmesi POMC nöronlarının fizyolojik özelliklerinin kalıcı hasara uğramadığına işaret etmektedir.



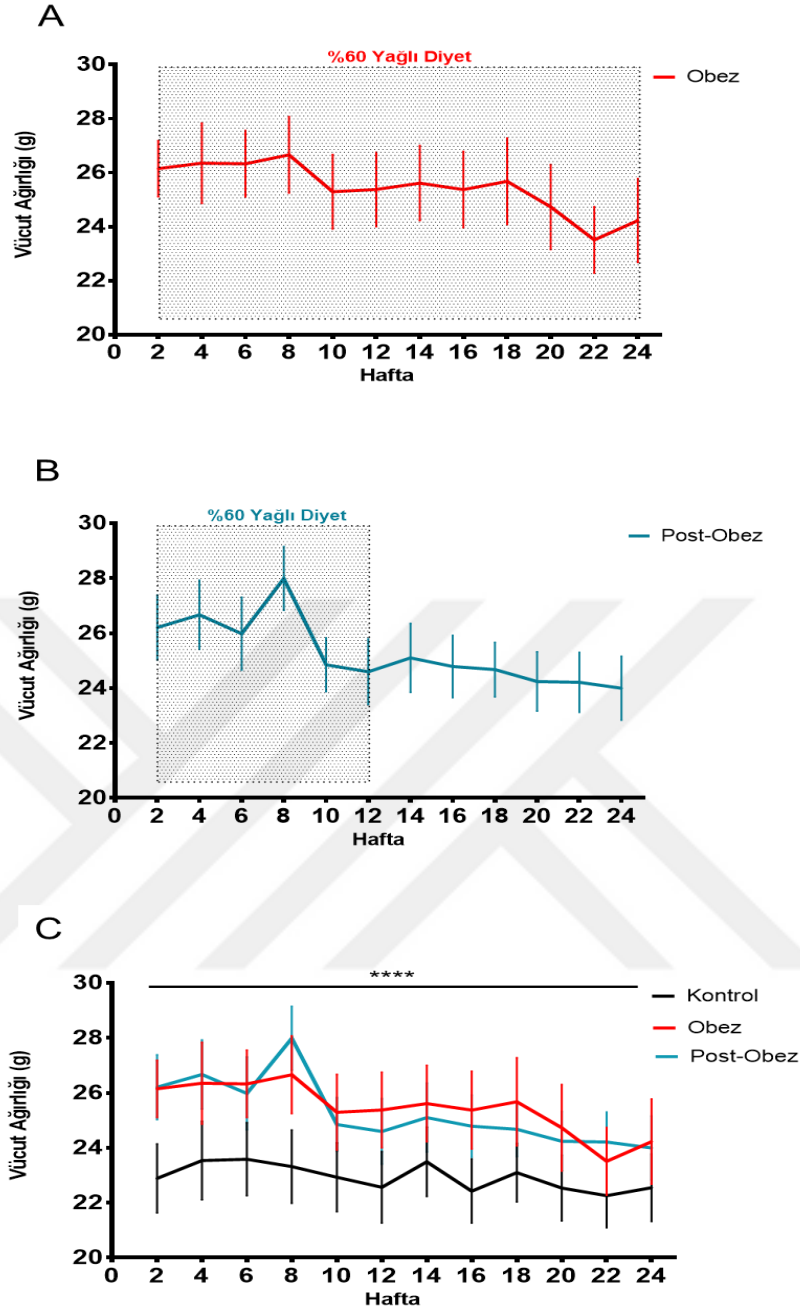
Şekil 4.12. Post-obez grubu hayvanların deney süresi boyunca yem tüketim grafiği. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapmadır. İstatistiksel analiz: bağımlı Student's t-test; n=12 ; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 ve \*\*\*\*p < 0.0001.



**Şekil 4.13. Altıncı ay sonunda tüm grupların cinsiyete göre yem tüketim grafiği.** A) Tüm gruplardaki dişi farelerin diyet tüketim grafiği (kontrol n=5, obez n=6, post-obez n=5 fare) B) Tüm gruplardaki erkek farelerin diyet tüketim grafiği (kontrol n=6, obez n=7, post-obez n=7) fare). Veriler ortalama  $\pm$  standart sapmadır. İstatistiksel analiz: bağımlı Student's t-test.  $p < 0,01$ .

#### **4.4. Vücut Ağırlık Takibi**

Deney grubu fareler besin alımlarıyla birlikte 6 ay boyunca haftalık vücut ağırlığı takipleri yapıldı. Grupların sonuçları analiz edildiğinde obez ve post-obez grubun ilk 3 ay YYD ile beslenirken vücut ağırlığı anlamlı derecede arttı. Son 3 ayda her iki grupta vücut ağırlığı azalırken kontrol grubu vücut ağırlığı ortalaması aynı kaldı. (Şekil 4.13). Çeşitli araştırmalar, YYD'in farelerde hiperfajiye, hipertrigliseridemiye, hiperglisemiye veya hiperinsülinemiye neden olmadığını göstermiştir<sup>83,84</sup>. Obez grupta 3 ay ile 6 ay arası elde ettiğimiz bulgularda POMC nöronlarında leptin direnci gelişti ve POMC nöronları CNO ile uyarılabilirliğini kaybetti. POMC-Cre farelerde gelişen metabolik değişikliklerin obez ve post-obez gruplarda ağırlık kaybına katkıda bulunmuş olabileceği düşünülmektedir.



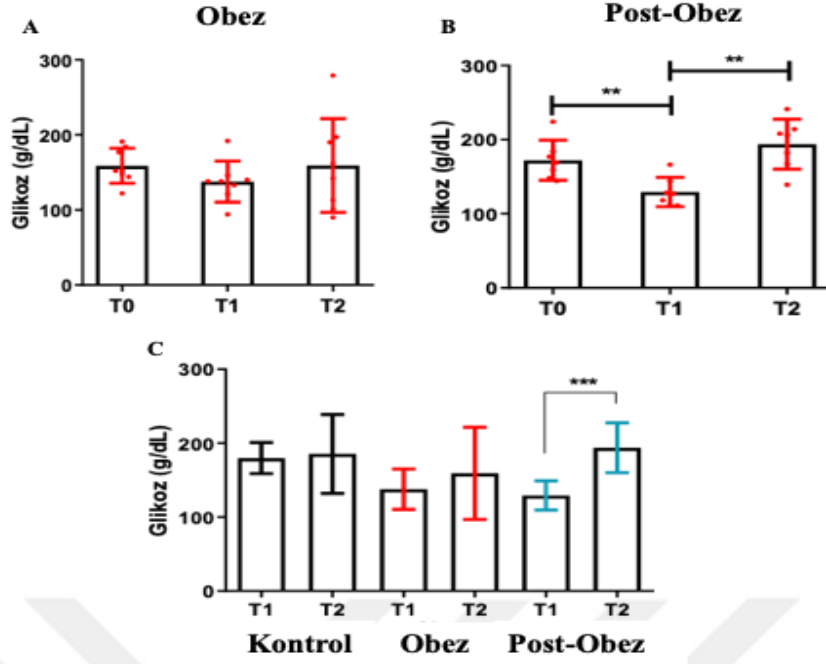
**Şekil 4.14. Davranış grubu POMC-Cre farelerin zamana göre vücut ağırlığı grafikleri.** A) Obez grubun ortalama vücut ağırlığının zamana ve besin türüne bağlı değişim grafiği. B) Post-obez grubun ortalama vücut ağırlıklarının YYD ve standart yem tüketim sırasındaki değişim grafiği. C) Kontrol, obez ve post-obez grupların 24 hafta süresince ortalama vücut ağırlığı grafiği. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapmadır. İstatistiksel analiz: Tek yönlü ANOVA ve Tukey'in çoklu karşılaştırma testi; \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

## 4.5. Kanda ölçülen parametreler

Tüm gruplardan glikoz, leptin, kolestrerol, yüksek (high density lipoprotein - HDL), düşük (low density lipoprotein - LDL) ve çok düşük (very low density lipoprotein - VLDL) yoğunluklu lipoprotein seviyeleri ve trigliserid ölçümleri yapıldı.

### 4.5.1. Glikoz

ARC POMC nöronları kan glikoz değerlerinden etkilenir ve glikoz homeostazında dengeleyici rol oynar<sup>85</sup>. Düşük kan glikoz değerleri POMC ARC nöron atım sayısını yükseltirken, POMC ARC nöronlarının inhibe edilmesi kan glikoz seviyelerinde düşüğe sebep olur ve besin alımını tetikler<sup>86</sup>. POMC nöron aktivasyonunun hepatik glikonegenezi belirli enzim aktivasyonları üzerinden aktive ettiği bilinmektedir<sup>87</sup>. YYD tüketimi ise hepatik glikoz alımını arttırarak, laktat üretimini arttırır ve bu mekanizma karaciğer kanserinin metabolik durumuna benzerlik gösterir<sup>88</sup>. Bu tezde YYD etkisindeki POMC nöronlarının aktivasyonu sonrası kan glikoz değerlerine bakıldı. Kan glikoz değerleri, kontrol ve obez grubunda kan glikoz değerleri istatistiksel olarak farklı değildi. Ancak post-obez grubunda ilk 3 ay süre zarfında YYD ile beslenirken kan glikoz değeri düşmüş, aynı grup farelerde standart diyetle birlikte kan glikoz değerleri istatistiksel olarak arttı (Şekil 4.15). Bu sonuç YYD'nin kan glikozunu düşürme etkisini destekliyor olsa da aynı etki obez grupta görülmedi.

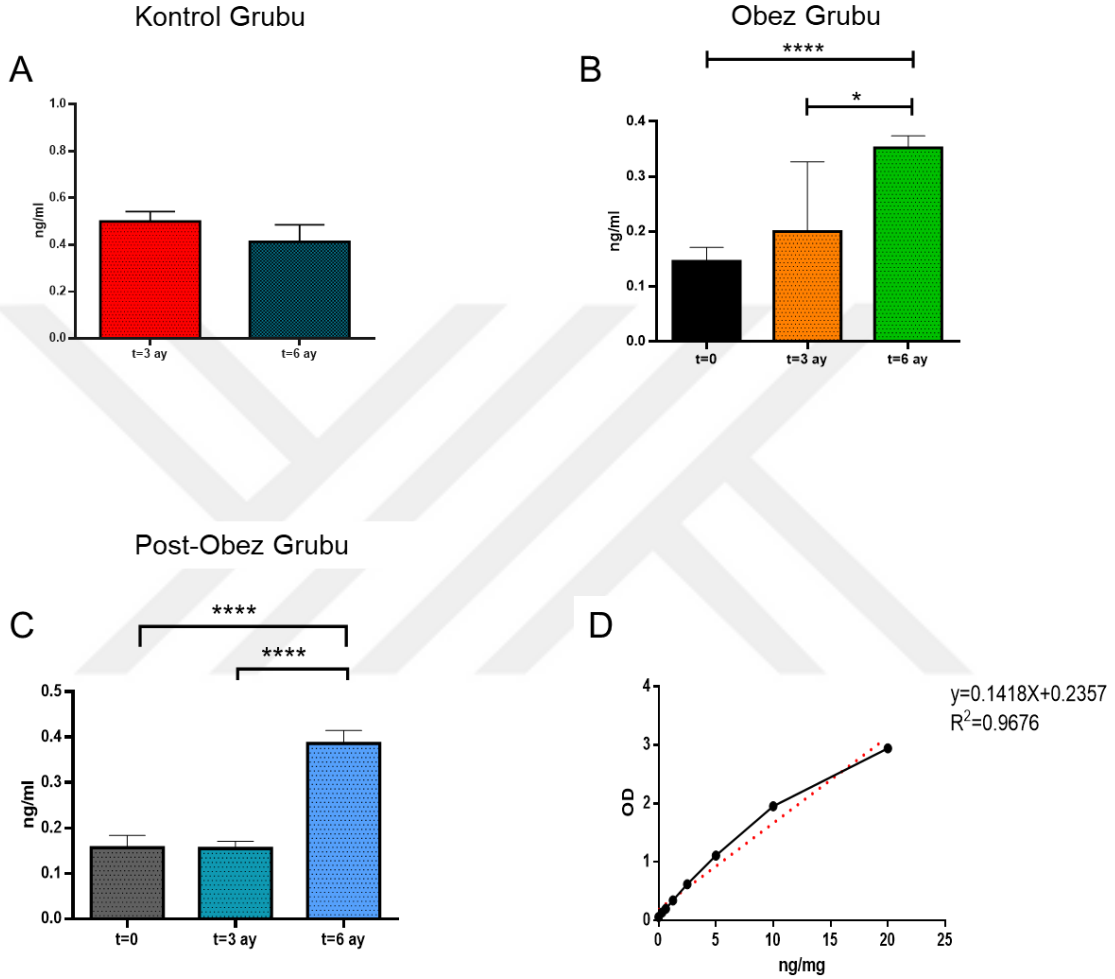


**Şekil 4.15. Tüm gruplarda kan glikoz seviyeleri** A-B) Obez ve post-obez gruplarının zaman bağlı kan glikoz grafikleri. C) tüm grupların T1 ve T2 dönemlerinde kan glikozu değişim grafiği (kontrol n=7, obez n=8, post-obez n=7) Veriler ortalama  $\pm$  standart sapmadır. İstatistiksel analiz: Tek yönlü ANOVA ve Tukey'in çoklu karşılaştırma testi; \*\*p<0.001, \*\*\*p<0.0001.

#### 4.5.2. Leptin

Grupların zamana ve diyet türüne bağlı olarak değişen leptin seviyelerine bakıldığında, standart diyetle beslenen farelerde zamana bağlı leptin seviyesi değişmedi. Obez ve post-obez grubu farelerde zamana bağlı olarak leptin seviyeleri anlamlı artış görüldü (Şekil 4.16). Obez grubunda bu artış 6. aya doğru her ölçümde anlamlı derecede arttı. Post-obez grubunda leptin seviyesi ise ilk iki ölçümde aynı kalan leptin seviyesi 6. ay verilerinde anlamlı derecede birden iki kat yükselme gösterdi. Altıncı ay sonunda tüm grupların leptin seviyeleri (0.4ng/mL) aynıydı. Obez ve post-obez grubu 3. ay leptin seviyesi (0.2ng/mL) kontrol grubunun yarısıdır. YYD tüketiminin bir sonucu olarak ele alındığında bu veri için POMC nöron aktivasyonu ile leptin seviyesi birlikte değerlendirildiğinde; kandaki yarı yarıya düşük leptin seviyesi ve 3. ayda görülen leptine duyarsızlıkla ilişkilendirilebilir. Fakat 6. ay sonunda leptin seviyelerinin kontrol grubu seviyelerine yükselme sebebi nöronlarda ya da metabolik sistemde bir kompensasyon mekanizmasının devreye girmiş olabileceğini düşündürebilir. Post-obez grupta tek değişken besin tipiyken T2 zamanında kan leptin seviyesinin kontrolle aynı düzeye

çıkması, kan leptin seviyesi ve besin tipinin direkt ilişkilendirilebilmesine olanak sağlıyor. Ek olarak obez ve post-obez gruplarda vücut ağırlığı da aynı zaman aralığında (3. aydan 6. aya kadar) düşüş göstermiştir. Leptin seviyesindeki bu artışa, besin alımını regüle eden homeostatik ve hedonik nöron ağlarda meydana gelen değişikliklerin sebep olmuş olabilir.

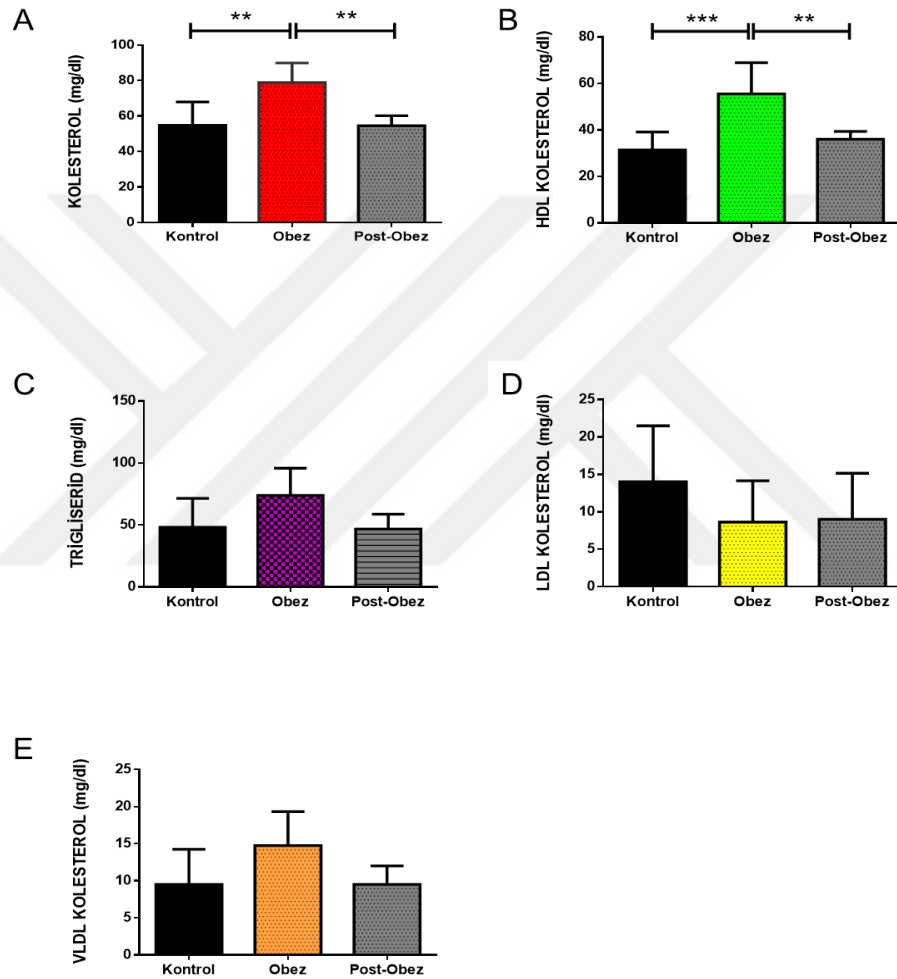


**Şekil 4.16. Tüm gruplarda serum leptin seviyeleri** A-B-C) Kontrol, obez ve post-obez gruplarının zaman bağlı leptin grafikleri. D) Serum Leptin seviyelerini ölçmek için ELISA deneylerinde oluşturulan standart eğri grafiği (kontrol n=7, obez n=8, post-obez n=7, Veriler ortalama ± standart sapmadır. İstatistiksel analiz: Tek yönlü ANOVA ve Tukey'in çoklu karşılaştırma testi; \* p<0.05, \*\*\*\*p<0.0001).

#### 4.5.3. Kolesterol

Uygulamış olduğumuz besin türünün cinsi ve uygulama sürelerinin farelerde oluşturması muhtemel metabolik değerlerindeki değişikliklerini daha da irdelemek için kan örneklerinden kolesterol, HDL, LDL ve VLDL ve trigliserid değerleri ölçüldü (Şekil

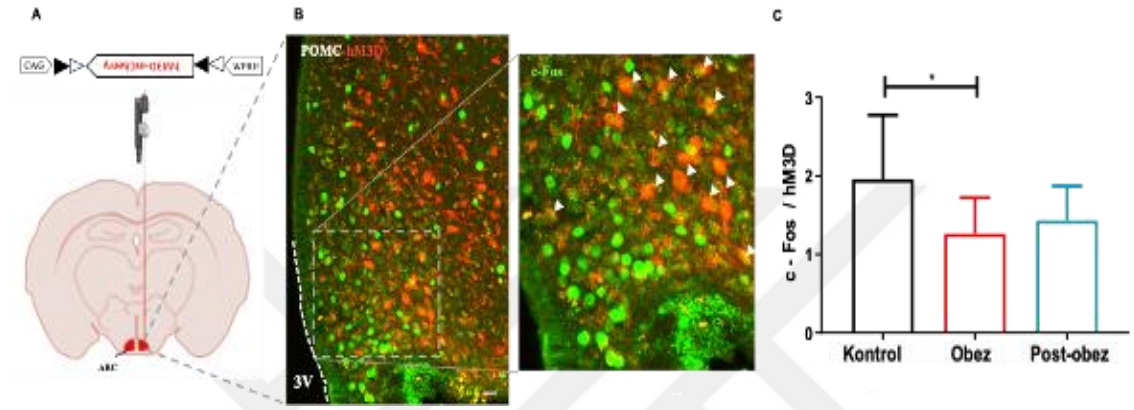
4.17). Altıncı ay sonunda elde edilen bulgular, obez grupta kolesterol seviyesi ve HDL kolesterol seviyeleri anlamlı derecede artarken, aynı grup fareleri standart diyete maruz bırakıldığında ise kolesterol ve HDL kolesterol seviyeleri kontrol grubuna yaklaştı. Trigliserid ve VLDL seviyeleri kolesterol ile benzer bir grafik gösterse de gruplar arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık yoktur. Serum LDL seviyeleri kontrol grubunda diğer gruplara kıyasla yüksek olsa da istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı fark bulunamadı.



**Şekil 4.17. Altıncı ay sonunda tüm gruplardan bakılan lipit sonuçları.** A) Tüm grupların Kolesterol sonuç grafiği (kontrol n= 6, obez n= 8, post-obez n=6 fare) B) Tüm grupların HDL Kolesterol sonuç grafiği. C) Trigliserid sonuç grafiği. D) LDL Kolesterol sonuç grafiği. E) VLDL sonuç grafiği (kontrol n=7, obez n=8, post-obez n=7, Tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey'in çoklu karşılaştırma testi; \*p<0.05, \*\*p<0.001.

#### 4.6. İmmünohistokimyasal *c-Fos* boyaması

POMC nöronlarının enjeksiyon ve *c-Fos* immünohistokimyasal boyaması sonrası görüntüsü şekil 4.18'dedir. Gruplar arası CFOS / hM3D oran grafiği enfeksiyon miktarını tüm hayvanlar için normalize etmekte kullanıldı. Aktivasyon miktarının POMC nöron yoğunluğuna oranı obez grupta kontrol gruba göre anlamlı derece azalmıştır. Post-obez grup ise kontrol grubuyla istatistiksel olarak farksızdır. Diyet değişikliği sonucu bu farkın kapandığı söylenebilir.



**Şekil 4.18. YYD'nin POMCnöron aktivitesi üzerindeki etkisi** A) ARC intrakraniyal AAV-hM3D-mCherry enjeksiyon şematik görüntüsü B) AAV-FLEX-hM3D ile enfekte olmuş POMC nöronlarının *c-Fos* immünohistokimyasal boyanmış temsili konfokal mikroskopi görüntüsü.(63X; Ölçek çubuğu: 50µm.) C) ARC'deki *c-Fos*-pozitif hücrelerin sayısının hM3D ile enfekte olmuş POMC hücrelerine oranı (kontrol n =8, obez n =15, obez sonrası n =12 fare).Veriler ortalama ± standart sapmadır. İstatistiksel analiz: Tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey'in çoklu karşılaştırma testi; \*p <0,05.

## 5. TARTIŞMA

Bu tezde homeostatik anoreksijenik etkiden sorumlu ARC'de POMC nöronlarında diyete bağlı değişiklikler araştırılmıştır. ARC-POMC nöronları, BNST, LH ve PVN bölgelerine projeksiyon yapar<sup>89</sup>. Çalışmamızda POMC-Cre fareler farklı süreler boyunca (3-6 ay) YYD'ye maruz bırakılmış ve deney süresinin bitiminde ARC POMC nöronlarının LH, PVN ve BNST bölgelerine yapmış olduğu aksonal projeksiyonlar ve dendritik iğne sayılarının morfolojisi konfokal mikroskobunda incelenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda YYD maruziyetinden kaynaklanan reaktif astrogliosisin POMC hücre gövdelerindeki toplam sinaptik girdi sayısını azalttığı gösterilmiştir<sup>59</sup>. Bizim çalışmamızda bu bulguların aksine YYD ile beslenen POMC-Cre farelerde dendritik sonların sayısında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı. Çalışmamızın sonuçlarına göre uzun süreli YYD ile beslenme, ARC'deki POMC nöronlarının enerji metabolizmasında kritik öneme sahip olan bu bölgelere yapmış olduğu aksonal projeksiyon yoğunluğunu değiştirmemektedir.

Leptin, melanokortin sistemindeki ARC-POMC nöronlarının aktive edilmesinde rol oynar<sup>11</sup>. POMC nöronlarının temel elektrofizyolojik özellikleri ve leptin ile uyarılabilen POMC-ARC nöronlarının oranı (%25) erkek ve dişi farelerde benzerdir<sup>89</sup>. Kronik YYD tüketimi, POMC nöronlarında leptin uyarılarına yanıt verme yeteneğini ortadan kaldırmıştır<sup>90</sup>. Bir başka çalışmada leptin direncinin hem kısa süreli (6 gün)<sup>14</sup> hem de uzun süreli (12 hafta) YYD ile beslenen farelerde geliştiği gösterilmiştir. Uzun süre YYD sonrası ARC POMC nöronlarının elektrofizyolojik aktiviteleri ilk kez bu çalışmada incelendi. Leptin duyarlılığının kaybı kısa süreli YYD tüketimini takiben bozulan kalsiyum dengesi ile ilişkilendirilmiştir<sup>16</sup>. Bu tezde 6 ay boyunca YYD ile beslenen, obesite gelişmiş farelerden oluşan obez grup ile 3 ay YYD, son 3 ay standart yemle beslenen post-obez grubu farelerde POMC nöronlarının leptin hormonuna verilen hücresel cevap elektrofizyoloji grubunda karşılaştırmalı olarak incelendi. Çalışmamızın sonuçlarına göre obez grubun POMC nöronlarının leptine cevabı 12. haftada devam ederken 24. haftada bu cevap kaybolmaktadır. Post-obez grubunda 24. Haftada POMC nöronları kontrol grubu ile kıyaslandığında leptin varlığında anlamlı bir artış göstermemiştir.

Leptinin POMC nöronun üzerindeki post-sinaptik akımlardaki düzenleyici etkisi, POMC nöronlarının aktivasyonunda rol alır. POMC-ARC nöronlarına gelen inhibitör postsinaptik

akımların (IPSC) sıklığı ve genliğinin 3 günlük kısa süreli YYD ile beslenme sonucunda arttığı gösterilmiştir<sup>17</sup>. Bu projede, bu bulguyla paralel olarak uzun dönem YYD tüketiminde de leptin hormonu POMC nöronlarına gelen uyarıcı post sinaptik akım frekansını artırırken, inhibe post sinaptik akım frekansını düşürdüğü gösterildi. Ancak bu farelerden alınan post-sinaptik akımlar kontrol grubuna farelerden alınan post-sinaptik akımlarla benzerlik göstermektedir. Elde etmiş olduğumuz verilere bakıldığında post-obeze grubunda uyguladığımız üç aylık standart diyetle dönüş protokolü POMC nöronlarında leptin hormonuna karşı oluşturulan dirençte tek başına iyileştirici bir etki göstermediği yorumu yapılabilir. Alınan sonuçtaki iyileşme trendini geciktiren unsur hem somatik hem inflamasyon sebepli olabilir.

Son yıllarda keşfedilen POMC nöronlarının heterojen yapısı, kurulacak hipotezlerin belirli bir reseptörü taşıyan nöron alt popülasyonları üzerine ya da belirli nörotransmitterlerin salınımı üzerinden oluşturulan nöron alt gruplarını hedeflemeyi gerekli kıldı. Bu tezde kullanılan fare modelinde tanımlanan tüm alt POMC popülasyonları aynı anda uyarıldığı için üretilen sonuçlar spesifik hangi alt-popülasyondan toplandı belirlenememiştir. Fakat POMC-Cre fare modeliyle ilişkili sınırlamalara rağmen<sup>21,91,92</sup>, bu tez çalışması POMC nöronlarının YYD maruziyeti ile kronik aktivasyonunun tüm alt popülasyonlardaki adaptasyonlar sonucunda oreksijenik davranışa yol açtığını orataya koymuştur.

POMC nöronlarının heterojen yapısı ve cinsiyete dayalı farklı hormonal ve metabolik düzenlemeleri, belirlenen bulguların cinsiyete özgü test edilmesini gerektirir<sup>7</sup>. 5-HT<sub>2</sub>CR içeren ARC POMC alt popülasyonunun sadece erkek farelerde tüm vücut enerji dengesini, vücut ağırlığını ve yağlanmayı düzenlemek için yeterli olduğu gösterildi<sup>93</sup>. Kronik YYD'nin neden olduğu oreksijenik davranış ve bu davranışın post-obeze grupta ortadan kaybolması, her iki cinsiyette de gözlemlendi.

POMC nöronlarındaki CB<sub>1</sub>R aktivasyonu gıda alımını artırır<sup>44</sup>. YYD'nin neden olduğu leptin direnci, periferik CB<sub>1</sub>R blokajı yoluyla tersine çevrilebilir<sup>94</sup>. Bu çalışmalar ışığında CB<sub>1</sub>R taşıyan POMC nöronlarının aktivasyonu aşırı yemeye sebep olurken, inhibisyonu leptin direncine çözüm olabiliyorsa homeostatik beslenme düzenlenmesinde her ikisinin de birlikte dengede kalmasının önemli olduğu söylenebilir. YYD'ye kronik maruz kalmanın POMC nöron alt popülasyonlarındaki dengeyi değiştirmiş olabileceği ileri

sürülebilir. Bu tez çalışmasında elde edilen en önemli verilerden biri de kronik YYD'in neden olduğu beslenme davranışının uzun vadede geri döndürülebilir olduğudur.

Klasik leptin-melanokortin modelinin aksine, POMC ARC LEPR(+) nöronlarının homeostatik gıda alımıyla ilişkili olmadığı ancak glikoz homeostazisinin düzenlenmesinde rol oynadığı kesin olarak tespit edilmiştir<sup>34</sup>. Faelerde YYD ile uzun süreli beslenmenin hiperfajiye, vücut ağırlığı artışına yol açtığı, yağ birikimini indüklediği, ve kan glikoz ve insülin düzeylerini artırdığı gösterilmiştir<sup>71-73</sup>. Aksine çalışmamızın sonuçları 24 hafta boyunca YYD ile beslenen grup ile kontrol grubu arasında kan şekeri seviyelerinde anlamlı bir fark olmadığını ortaya koydu. Bununla birlikte, ortaya çıkan kanıtlar POMC nöronlarının oldukça heterojen olduğunu ve diğer nöron alt tiplerinin metabolik stres altında işlevlerini üstlenebileceğini göstermektedir<sup>7</sup>.

YYD tüketiminin en belirgin sonuçları olarak ağırlık artışı ve yükselen leptin düzeyleri dikkat çekmektedir<sup>95</sup>. Bu tezde, literatüre bilgilerine benzer olarak obez grupta serum leptin seviyesi, HDL ve kolesterol seviyesi anlamlı derecede arttı. Kontrol grubunda leptin seviyesi değişiklik göstermezken, post-obez grubunda serum leptin seviyesi zaman içinde (3-6 ay) anlamlı derecede artış gösterdi. YYD tüketen obez ve post-obez gruplarında vücut ağırlığı kaybı oldu. Yapılan bazı çalışmalarda YYD beslenen farelerde hiperfaji, hipertrigliserolemi, hiperglisemi veya hiperinsülinemiye neden olmadığı gösterilmiştir<sup>83,84</sup>. Kronik yağlı beslenmeden kaynaklanan metabolik değişikliklerin obez ve obez sonrası gruplarda vücut ağırlığında düşüşe katkıda bulunmuş olabileceği düşünülmektedir. POMC nöronlarındaki heterojenlik, uzun süreli YYD tüketimi bağlamında da karmaşık sonuçlar doğurur<sup>7,34</sup>. Çalışmamızın sonuçları kronik beslenme değişikliklerini takiben POMC nöron davranışındaki değişikliklerin normal kalori ve yağ içeriğine dönüşle düzeltilebileceğini, ancak bu leptinle ilişkili olmadığını göstermektedir.

C-Fos nöron aktivasyonunun erken bir belirteci olarak kabul görmektedir. Kısa süre içinde nörondan salgılanır ve aktif nöronları görüntüleyebilmek için yeterlidir. C-Fos boyamasının değerlendirilmesinde unutulmaması gereken konu aktif nöronlar sadece POMC nöron aktivasyonu sebebiyle olmayabilir, beyindeki total aktivasyonun bir görüntüsüdür. Bu sebeple analiz yaparken aktif tüm nöron sayımı (c-Fos-yeşil), enfekte nöron sayısına (kırmızı-hM3D-mCherry) bölündü. Böylece veriler davranış deneyi sırasında POMC aktivasyonuna bağlı ARC aktivasyonunda POMC nin rolü hakkında bize bağlı bir değer vermiştir. ARC-POMC nöronlarına direkt inhibe edici etkisi olduğu

bilinen ARC-PNOC nöronlarının sadece 3 gün süreli YYD tüketimi sonrası aktive olduğu FOS mRNA seviyesinde gösterilmiştir<sup>17</sup>. Bu tezde kontrol grubunun CNO sonrası-cFOS pozitif nöron/hM3D enfekte POMC nöron oranı, obez gruptan anlamlı derecede yüksek bulundu. Yirmi dört haftalık POMC nöron aktivasyonunun YYD sonrası aktivasyonunun düştüğü ve post-obez grupta aktivasyonun geri kazanıldığı gösterilmiştir.

Davranış deneylerinde obez grup-oreksijenik yanıtının, daha az POMC nöron aktivasyonunun hedef bölgelerde yeterli aksonal uyarı yoğunluğuna ulaşamamasından kaynaklandığı ya da kısmen bu cevapta etkili olduğu ileri sürülebilir. YYD, leptine gelişen cevapsızlık ve davranışın değişmesiyle POMC nöronlarının hem uyarılabilirliğini hem de (alınan davranış sonuçlarına dayanarak) tüm sistemdeki etki değerini değiştirmiştir. Post-obez grubu ve kontrol grubu arasında anlamlı bir değişiklik olmaması ise bu etki kaybının standart diyet tüketimine geçilerek geri çevrilebileceğini göstermektedir. Kronik YYD tüketimi sonucu fizyolojik ve moleküler yolaklarda meydana gelen değişikliklerin de tezdeki bulguları desteklemiş olduğu unutulmamalıdır. Fizyolojik sistemlerde yapılan tek bir değişikliğin (bu tezde besin tipidir) bir çok sistemik sonucu olabilir. POMC nöronlarında olabilecek popülasyonel dengesizlikleri, sistemlerin plastisitesini ve düzenleyicilerini araştırmak, obezite gibi metabolik hastalıklarla mücadelede uygulanabilir bir yaklaşım olabilir.

## 6. KAYNAKLAR

1. Yanovski SZ, Yanovski JA. Long-term drug treatment for obesity: a systematic and clinical review. *JAMA*. 2014;311(1):74–86. doi:10.1001/JAMA.2013.281361
2. WHO Regional office for Europe. *WHO European Regional Obesity Report 2022.*; 2022. <http://apps.who.int/bookorders>.
3. Woessner MN, Tacey A, Levinger-Limor A, Parker AG, Levinger P, Levinger I. The Evolution of Technology and Physical Inactivity: The Good, the Bad, and the Way Forward. *Front Public Heal*. 2021;9:655491. doi:10.3389/FPUBH.2021.655491
4. Udio C, De Souza T, Araujo EP, vd. Consumption of a Fat-Rich Diet Activates a Proinflammatory Response and Induces Insulin Resistance in the Hypothalamus. 2005. doi:10.1210/en.2004-1520
5. Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D. Hypothalamic IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B and ER Stress Link Overnutrition to Energy Imbalance and Obesity. *Cell*. 2008;135(1):61–73. doi:10.1016/J.CELL.2008.07.043
6. de Oliveira Neves VG, de Oliveira DT, Oliveira DC, vd. High-sugar diet intake, physical activity, and gut microbiota crosstalk: Implications for obesity in rats. *Food Sci Nutr*. 2020;8(10):5683–5695. doi:10.1002/fsn3.1842
7. Quarta C, Claret M, Zeltser LM, vd. POMC neuronal heterogeneity in energy balance and beyond: an integrated view. *Nat Metab*. 2021;3(3):299–308. doi:10.1038/s42255-021-00345-3
8. Atasoy D, Betley JN, Su HH, Sternson SM. Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature*. 2012;488(7410):172–177. doi:10.1038/NATURE11270
9. Aklan I, Sayar Atasoy N, Yavuz Y, vd. NTS Catecholamine Neurons Mediate Hypoglycemic Hunger via Medial Hypothalamic Feeding Pathways. *Cell Metab*. 2020;31(2):313-326.e5. doi:10.1016/j.cmet.2019.11.016
10. Sufyan Vohra M, Benchoula K, Serpell CJ, Eng Hwa W. AgRP/NPY and POMC neurons in the arcuate nucleus and their potential role in treatment of obesity. *Eur J Pharmacol*. 2022;915:174611. doi:10.1016/j.ejphar.2021.174611
11. MA C, JL S, M R, vd. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a

- neural network in the arcuate nucleus. *Nature*. 2001;411(May):480–484.  
doi:10.1038/35078085
12. Pinto S, Roseberry AG, Liu H, vd. Rapid Rewiring of Arcuate Nucleus Feeding Circuits by Leptin. *Science (80- )*. 2004;304(5667):110–115.  
doi:10.1126/SCIENCE.1089459
  13. Vong L, Ye C, Yang Z, Choi B, Chua S, Lowell BB. Leptin action on GABAergic neurons prevents obesity and reduces inhibitory tone to POMC neurons. *Neuron*. 2011;71(1):142–154. doi:10.1016/J.NEURON.2011.05.028
  14. Münzberg H, Flier JS, Bjørbæk C. Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology*. 2004;145(11):4880–4889. doi:10.1210/EN.2004-0726
  15. JD K, NA Y, S J, vd. Microglial UCP2 Mediates Inflammation and Obesity Induced by High-Fat Feeding. *Cell Metab*. 2019;30(5):952-962.e5.  
doi:10.1016/j.cmet.2019.08.010
  16. Elmquist JK, Paeger L, Pippow A, vd. Energy imbalance alters Ca<sup>2+</sup> handling and excitability of POMC neurons. doi:10.7554/eLife.25641.001
  17. Jais A, Paeger L, Sotelo-Hitschfeld T, Wunderlich FT, Kloppenburg P, Bréuning Correspondence JC. PNOC ARC Neurons Promote Hyperphagia and Obesity upon High-Fat-Diet Feeding. doi:10.1016/j.neuron.2020.03.022
  18. Qi Y, Lee NJ, Ip CK, vd. AgRP-negative arcuate NPY neurons drive feeding under positive energy balance via altering leptin responsiveness in POMC neurons. *Cell Metab*. 2023;35(6):979-995.e7. doi:10.1016/J.CMET.2023.04.020
  19. Nakamura K, Nakamura Y. Hunger and Satiety Signaling : Modeling Two Hypothalamomedullary Pathways for Energy Homeostasis. 2018;1700252:1–8.  
doi:10.1002/bies.201700252
  20. Chen R, Wu X, Jiang L, Zhang Correspondence Y. Single-Cell RNA-Seq Reveals Hypothalamic Cell Diversity. *Cell Rep*. 2017;18:3227–3241.  
doi:10.1016/j.celrep.2017.03.004
  21. Lam BYH, Cimino I, Poxel-Wolf J, vd. Heterogeneity of hypothalamic pro-opiomelanocortin-expressing neurons revealed by single-cell RNA sequencing.

- Mol Metab.* 2017;6(5):383–392. doi:10.1016/J.MOLMET.2017.02.007
22. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nat* 1994 3726505. 1994;372(6505):425–432. doi:10.1038/372425a0
  23. Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the Regulation Review of Energy Balance total fast of approximately 150 days! This impressive energy reserve is due both to the high energy content of triglycerides versus polysaccharides, and the fact. *Cell.* 2001;104:531–543.
  24. Leptin Activates Hypothalamic CART Neurons Projecting to the Spinal Cord.
  25. Broberger C, Johansen J, Johansson C, vd. The neuropeptide Yagouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice (arcuate nucleuscoexistencefeedingmelanocortinparabrachial nucleus). *Neurobiology.* 1998;95:15043–15048. www.pnas.org. Erişim Eylül 1, 2023.
  26. Cone RD. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci.* 2005;8(5):571–578. doi:10.1038/NN1455
  27. Toda C, Santoro A, Kim JD, Diano S. POMC Neurons: From Birth to Death. *Annu Rev Physiol.* 2017;79:209–236. doi:10.1146/ANNUREV-PHYSIOL-022516-034110
  28. Haskell-Luevano C, Monck EK. Agouti-related protein functions as an inverse agonist at a constitutively active brain melanocortin-4 receptor. *Regul Pept.* 2001;99(1):1–7. doi:10.1016/S0167-0115(01)00234-8
  29. Aponte Y, Atasoy D, Sternson SM, Y A, D A, SM S. AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nat Neurosci.* 2011;14(3):351. doi:10.1038/NN.2739
  30. Horvath TL, Naftolin F, Kalra SP, Leranath C. Neuropeptide-Y innervation of beta-endorphin-containing cells in the rat mediobasal hypothalamus: a light and electron microscopic double immunostaining analysis. *Endocrinology.* 1992;131(5):2461–2467. doi:10.1210/ENDO.131.5.1425443
  31. C Z, J Z, Q F, vd. Acute and long-term suppression of feeding behavior by

- POMC neurons in the brainstem and hypothalamus, respectively. *J Neurosci*. 2013;33(8):3624–3632. doi:10.1523/JNEUROSCI.2742-12.2013
32. Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Grüters A. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet*. 1998;19(2):155–157. doi:10.1038/509
  33. Lavoie O, Michael NJ, Caron A. A critical update on the leptin-melanocortin system. *J Neurochem*. 2023;165(4):467–486. doi:10.1111/jnc.15765
  34. Biglari N, Gaziano I, Schumacher J, vd. Functionally distinct POMC-expressing neuron subpopulations in hypothalamus revealed by intersectional targeting. *Nat Neurosci*. 2021;24(7):913–929. doi:10.1038/S41593-021-00854-0
  35. Tecott LH, Sun LM, Akana SF, vd. Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT<sub>2C</sub> serotonin receptors. *Nat* 1995 3746522. 1995;374(6522):542–546. doi:10.1038/374542a0
  36. Heisler LK, Cowley MA, Tecott LH, vd. Activation of central melanocortin pathways by fenfluramine. *Science (80- )*. 2002;297(5581):609–611. doi:10.1126/SCIENCE.1072327/SUPPL\_FILE/HEISLERSOM.PDF
  37. Lam DD, Przydzial MJ, Ridley SH, vd. Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> Receptor Agonist Promotes Hypophagia via Downstream Activation of Melanocortin 4 Receptors. *Endocrinology*. 2008;149(3):1323–1328. doi:10.1210/EN.2007-1321
  38. Sohn JW, Xu Y, Jones JE, Wickman K, Williams KW, Elmquist JK. Serotonin 2C Receptor Activates a Distinct Population of Arcuate Pro-opiomelanocortin Neurons via TRPC Channels. *Neuron*. 2011;71(3):488–497. doi:10.1016/J.NEURON.2011.06.012
  39. Xu Y, Berglund ED, Sohn JW, vd. 5-HT<sub>2C</sub>Rs expressed by pro-opiomelanocortin neurons regulate insulin sensitivity in liver. *Nat Neurosci*. 2010;13(12):1457–1459. doi:10.1038/NN.2664
  40. D’Agostino G, Lyons D, Cristiano C, vd. Nucleus of the Solitary Tract Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> Receptors Modulate Food Intake. *Cell Metab*. 2018;28(4):619-630.e5. doi:10.1016/J.CMET.2018.07.017
  41. Georgescu T, Lyons D, Doslikova B, vd. Neurochemical characterization of

- brainstem pro-opiomelanocortin cells. *Endocrinol (United States)*. 2021;161(4):1–13. doi:10.1210/ENDOCR/BQAA032
42. Wang D, He X, Zhao Z, vd. Whole-brain mapping of the direct inputs and axonal projections of POMC and AgRP neurons. *Front Neuroanat*. 2015;9(MAR):1–17. doi:10.3389/fnana.2015.00040
43. Campbell JN, Macosko EZ, Fenselau H, vd. A molecular census of arcuate hypothalamus and median eminence cell types. *Nat Neurosci* 2017 203. 2017;20(3):484–496. doi:10.1038/nn.4495
44. Koch M, Varela L, Kim JDJG, vd. Hypothalamic POMC neurons promote cannabinoid-induced feeding. *Nature*. 2015;519(7541):45–50. doi:10.1038/nature14260
45. Qiu J, Zhang C, Borgquist A, vd. Insulin excites anorexigenic proopiomelanocortin neurons via activation of canonical transient receptor potential channels. *Cell Metab*. 2014;19(4):682–693. doi:10.1016/J.CMET.2014.03.004
46. Benite-Ribeiro SA, Rodrigues VA de L, Machado MRF. Food intake in early life and epigenetic modifications of pro-opiomelanocortin expression in arcuate nucleus. *Mol Biol Rep*. 2021;48(4):3773–3784. doi:10.1007/s11033-021-06340-x
47. Kim JD, Leyva S, Diano S. Hormonal regulation of the hypothalamic melanocortin system. *Front Physiol*. 2014;5(Nov). doi:10.3389/FPHYS.2014.00480
48. Dallman MF, Akana SF, Strack AM, vd. Chronic stress-induced effects of corticosterone on brain: direct and indirect. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1018:141–150. doi:10.1196/ANNALS.1296.017
49. Gyengesi E, Liu ZW, D’Agostino G, vd. Corticosterone regulates synaptic input organization of POMC and NPY/AgRP neurons in adult mice. *Endocrinology*. 2010;151(11):5395–5402. doi:10.1210/EN.2010-0681
50. Dutia R, Meece K, Dighe S, Kim AJ, Wardlaw SL.  $\beta$ -Endorphin antagonizes the effects of  $\alpha$ -MSH on food intake and body weight. *Endocrinology*. 2012;153(9):4246–4255. doi:10.1210/EN.2012-1166

51. DiPatrizio N V., Piomelli D. The thrifty lipids: endocannabinoids and the neural control of energy conservation. *Trends Neurosci.* 2012;35(7):403–411. doi:10.1016/J.TINS.2012.04.006
52. DiPatrizio N V., Piomelli D. Intestinal lipid-derived signals that sense dietary fat. *J Clin Invest.* 2015;125(3):891–898. doi:10.1172/JCI76302
53. Parsons LH, Hurd YL. Endocannabinoid signalling in reward and addiction. *Nat Rev Neurosci.* 2015;16(10):579–594. doi:10.1038/NRN4004
54. Tasker JG. Rapid glucocorticoid actions in the hypothalamus as a mechanism of homeostatic integration. *Obesity (Silver Spring).* 2006;14 Suppl 5. doi:10.1038/OBY.2006.320
55. Parton LE, Ye CP, Coppari R, vd. Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature.* 2007;449(7159):228–232. doi:10.1038/NATURE06098
56. Diano S, Liu ZW, Jeong JK, vd. Peroxisome proliferation-associated control of reactive oxygen species sets melanocortin tone and feeding in diet-induced obesity. *Nat Med.* 2011;17(9):1121–1128. doi:10.1038/NM.2421
57. Sena LA, Chandel NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell.* 2012;48(2):158–167. doi:10.1016/J.MOLCEL.2012.09.025
58. Jo YH, Su Y, Gutierrez-Juarez R, Chua S. Oleic acid directly regulates POMC neuron excitability in the hypothalamus. *J Neurophysiol.* 2009;101(5):2305–2316. doi:10.1152/JN.91294.2008
59. Horvath TL, Sarman B, García-Cáceres C, vd. Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(33):14875–14880. doi:10.1073/PNAS.1004282107
60. Cota D, Proulx K, Blake Smith KA, vd. Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science.* 2006;312(5775):927–930. doi:10.1126/SCIENCE.1124147
61. Mori H, Inoki K, Münzberg H, vd. Critical role for hypothalamic mTOR activity in energy balance. *Cell Metab.* 2009;9(4):362–374. doi:10.1016/J.CMET.2009.03.005

62. Yang SB, Tien AC, Boddupalli G, Xu AW, Jan YN, Jan LY. Rapamycin ameliorates age-dependent obesity associated with increased mTOR signaling in hypothalamic POMC neurons. *Neuron*. 2012;75(3):425–436. doi:10.1016/J.NEURON.2012.03.043
63. Li Z, Kelly L, Heiman M, Greengard P, Friedman JM. Hypothalamic Amylin Acts in Concert with Leptin to Regulate Food Intake. *Cell Metab*. 2016;23(5):945. doi:10.1016/J.CMET.2016.04.014
64. Coleman DL, Hummel KP. The influence of genetic background on the expression of the obese (ob) gene in the mouse. *Diabetologia*. 1973;9(4):287–293. doi:10.1007/BF01221856/METRICS
65. Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa H, vd. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nat* 2004 4286982. 2004;428(6982):569–574. doi:10.1038/nature02440
66. Dagon Y, Hur E, Zheng B, Wellenstein K, Cantley LC, Kahn BB. Cell Metabolism p70S6 Kinase Phosphorylates AMPK on Serine 491 to Mediate Leptin's Effect on Food Intake. doi:10.1016/j.cmet.2012.05.010
67. Kim JG, Suyama S, Koch M, vd. Leptin signaling in astrocytes regulates hypothalamic neuronal circuits and feeding. *Nat Neurosci*. 2014;17(7):908–910. doi:10.1038/nn.3725
68. van Swieten MMH, Pandit R, Adan RAH, van der Plasse G. The neuroanatomical function of leptin in the hypothalamus. *J Chem Neuroanat*. 2014;61:207–220. doi:10.1016/j.jchemneu.2014.05.004
69. Jung UJ, Choi MS. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci*. 2014;15(4):6184–6223. doi:10.3390/IJMS15046184
70. Rolls BJ, Hammer VA. Fat, carbohydrate, and the regulation of energy intake. *Am J Clin Nutr*. 1995;62(5 Suppl). doi:10.1093/AJCN/62.5.1086S
71. Savastano DM, Covasa M. Nutritional Neurosciences Adaptation to a High-Fat Diet Leads to Hyperphagia and Diminished Sensitivity to Cholecystokinin in

- Rats 1. *J Nutr.* 2005;135:1953–1959.
72. Buettner R, Newgard CB, Rhodes CJ, O’Doherty RM. Correction of diet-induced hyperglycemia, hyperinsulinemia, and skeletal muscle insulin resistance by moderate hyperleptinemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000;278(3). doi:10.1152/AJPENDO.2000.278.3.E563
73. Leibowitz SF, Dourmashkin JT, Chang GQ, vd. Acute high-fat diet paradigms link galanin to triglycerides and their transport and metabolism in muscle. *Brain Res.* 2004;1008(2):168–178. doi:10.1016/j.brainres.2004.02.030
74. Reilly AM, Zhou S, Panigrahi SK, vd. Gpr17 deficiency in POMC neurons ameliorates the metabolic derangements caused by long-term high-fat diet feeding. *Nutr Diabetes.* 2019;9(1). doi:10.1038/s41387-019-0096-7
75. Thaler JP, Yi CX, Schur EA, vd. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest.* 2012;122(1):153–162. doi:10.1172/JCI59660
76. Waise TMZ, Toshinai K, Naznin F, vd. One-day high-fat diet induces inflammation in the nodose ganglion and hypothalamus of mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;464(4):1157–1162. doi:10.1016/J.BBRC.2015.07.097
77. Cai D, Khor S. “Hypothalamic Microinflammation” Paradigm in Aging and Metabolic Diseases. *Cell Metab.* 2019;30(1):19–35. doi:10.1016/J.CMET.2019.05.021
78. Gao Y, Ottaway N, Schriever SC, vd. Hormones and diet, but not body weight, control hypothalamic microglial activity. *Glia.* 2014;62(1):17–25. doi:10.1002/GLIA.22580
79. Cope EC, Lamarca EA, Monari PK, vd. Microglia Play an Active Role in Obesity-Associated Cognitive Decline. *J Neurosci.* 2018;38(41):8889–8904. doi:10.1523/JNEUROSCI.0789-18.2018
80. André C, Quevedo OG, Rey C, vd. Inhibiting Microglia Expansion Prevents Diet-Induced Hypothalamic and Peripheral Inflammation. *Diabetes.* 2017;66(4):908–919. doi:10.2337/DB16-0586

81. Ramalho AF, Bombassaro B, Dragano NR, vd. Dietary fats promote functional and structural changes in the median eminence blood/spinal fluid interface-the protective role for BDNF. doi:10.1186/s12974-017-1046-8
82. Lee CH, Kim HJ, Lee YS, vd. Hypothalamic Macrophage Inducible Nitric Oxide Synthase Mediates Obesity-Associated Hypothalamic Inflammation. *Cell Rep.* 2018;25(4):934. doi:10.1016/J.CELREP.2018.09.070
83. Do GM, Oh HY, Kwon EY, vd. Long-term adaptation of global transcription and metabolism in the liver of high-fat diet-fed C57BL/6J mice. *Mol Nutr Food Res.* 2011;55 Suppl 2(SUPPL. 2). doi:10.1002/MNFR.201100064
84. Kalupahana NS, Voy BH, Saxton AM, Moustaid-Moussa N. Energy-restricted high-fat diets only partially improve markers of systemic and adipose tissue inflammation. 2011;19(2):245–254. doi:10.1038/OBY.2010.196
85. Parton LE, Ye CP, Coppari R, vd. Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature.* 2007;449(7159):228–232. doi:10.1038/NATURE06098
86. Üner AG, Keçik O, Quaresma PGF, vd. Role of POMC and AgRP neuronal activities on glycaemia in mice. *Sci Rep.* 2019;9(1):1–14. doi:10.1038/s41598-019-49295-7
87. Kwon E, Joung HY, Liu SM, Chua SC, Schwartz GJ, Jo YH. Optogenetic stimulation of the liver-projecting melanocortinergeric pathway promotes hepatic glucose production. *Nat Commun.* 2020;11(1):1–13. doi:10.1038/s41467-020-20160-w
88. Broadfield LA, Duarte JAG, Schmieder R, vd. Fat induces glucose metabolism in nontransformed liver cells and promotes liver tumorigenesis. *Cancer Res.* 2021;81(8):1988–2001. doi:10.1158/0008-5472.CAN-20-1954
89. Srour N, Lavoie O, Khouma A, vd. Electrophysiological comparison of definitive pro-opiomelanocortin neurons in the arcuate nucleus and the retrochiasmatic area of male and female mice. *Neuroscience.* 2023. doi:10.1016/j.neuroscience.2023.08.024
90. Paeger L, Pippow A, Hess S, vd. Energy imbalance alters Ca<sup>2+</sup> handling and

- excitability of POMC neurons. *Elife*. 2017;6:1–21. doi:10.7554/eLife.25641
91. Padilla SL, Carmody JS, Zeltser LM. POMC-expressing progenitors give rise to antagonistic neuronal populations in hypothalamic feeding circuits. *Nat Med*. 2010;16(4):403–405. doi:10.1038/nm.2126
  92. Padilla SL, Reef D, Zeltser LM. Defining POMC neurons using transgenic reagents: Impact of transient POMC expression in diverse immature neuronal populations. *Endocrinology*. 2012;153(3):1219–1231. doi:10.1210/en.2011-1665
  93. Burke LK, Doslikova B, D’agostino G, vd. Sex difference in physical activity, energy expenditure and obesity driven by a subpopulation of hypothalamic POMC neurons. doi:10.1016/j.molmet.2016.01.005
  94. Tam J, Szanda G, Drori A, vd. Peripheral cannabinoid-1 receptor blockade restores hypothalamic leptin signaling. *Mol Metab*. 2017;6(10):1113–1125. doi:10.1016/J.MOLMET.2017.06.010
  95. Lin S, Thomas TC, Storlien LH, Huang XF. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. *Int J Obes*. 2000;24:639–646. www.nature.com/ijo. Erişim Temmuz 12, 2023.

## **7.İntihal Raporu İlk Sayfası**

# 1. Özgeçmiş

## Kişisel Bilgiler

Adı	Özge	Soyadı	Başer
-----	------	--------	-------

## Öğrenim Durumu

Derece	Alan	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora	FİZYOLOJİ	YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ	2023
Yüksek Lisans	FİZYOLOJİ	YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ	2018
Lisans	BİYOLOJİ	HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ	2013
Lise	MF	BAHÇELİEVLER ANADOLU LİSESİ	2008

\*Başarılmış birden fazla sınav varsa (KPDS, ÜDS, TOEFL; EELTS vs), tüm sonuçlar yazılmalıdır

Bildiği Yabancı Dilleri	Yabancı Dil Sınav Notu (#)
İNGİLİZCE	86,25

## İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
TEKNİK UZMAN	YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ	2019-DEVAM EDİYOR

## Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
OFFİCE Programları	ÇOK İYİ
Analiz Programları (SPSS, GraphPad)	İYİ

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

## Bilimsel Çalışmaları

### SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Ongel M. E., Yildiz C., Baser O., Yilmaz B., Özilgen M. (2023). Thermodynamic assessment of the effects of intermittent fasting and fatty liver disease diets on longevity. *Entropy*, 25(2), 227.

### Diğer dergilerde yayımlanan makaleler

Milicevic K.D., Zhu M.H., Barbeau B.L., Baser O., Erol Z.Y., Liu L.X., Lin M.Z., Antic S.D. (2023) Imaging of Evoked Cortical Depolarizations Using Either ASAP2s, or  $\text{chR2-EYFP}$ , or  $\text{ChR2-EYFP}$ , or Di-4-Anepps, or Autofluorescence Optical Signals. JIN. (accepted paper)

Yavuz Y., Baser O., Atasoy D., Yılmaz B. (2023). Investigation of electrical activity of hypothalamic arcuate nucleus cholinergic neurons in fasting and fed state in ChAT-Cre transgenic mice. Ann Med Res 2023;30(4):504–507

### Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (*Proceedings*) basılan bildiriler

**Baser O.**, Yavuz Y., Ağuş S., Özgün H.B., Özen D. O, Yapar I., Atasoy,D., Yılmaz B. (2020). Effects of chronic high fat diet on electrophysiological and morphological properties of POMC neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. Neuroendocrinology, V111, Issue: 1, Page 51. 4th International Congress of Turkish Neuroendocrinology Society, 26-28 November 2020, Istanbul (Online), PC-24. (Best Poster Award)

Ağuş S, Eyuboğlu S, Solak H, Bilgin VA, Yavuz Y, Akkaya H, **Başer Ö**, Kutlu S, Bingöl CA, Atasoy D and Yılmaz B. (2018). Chronic Manipulation of Arcuate Kisspeptin Neurons in A1–42 Induced Mouse Model of Alzheimer’s Disease. 3rd International Congress of Turkish Neuroendocrinology Society, 29 June-1 July 2018. Neuroendocrinology 2018; 107 (suppl 1): 1–40  
DOI:10.1159/000493383, OC-014.

Eyuboğlu S, Ağuş S, **Başer Ö**, Atasoy D and Yılmaz B. (2017). Chemogenetics modulation of kisspeptin neuron activity and its role in anxiety behavior in mice. FEPS Kongresi, Vienna University, 13-15 Eylül 2017, Viyana, Avusturya, Acta Physiologica, Volume 221, Supplement S713.

### Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

1. Özen D.Ö, Yavuz Y, **Başer O**, Yılmaz B. (2022, November) Investigation of the Effects of Hypothalamic Paraventricular Oxytocin Neurons on Hypofrontality in the Prefrontal Cortex in Male Transgenic Mice. 47rd Turkish Physiology Congress, 1-4 November, Antalya, SS025, p30

2. Özgün H.B, Yavuz Y, **Başer O**, Erdoğan C.S, Gören H., Yılmaz B. (2022, November). Investigation of the Circadian Electrical Activity Cycle of Hypothalamic Arcuate Nucleus POMC Neurons in POMC-Cre Transgenic Mice. 47rd Turkish Physiology Congress, 1-4 November, Antalya, PS031, p63

3. <b>Baser, O.</b> , Yavuz, Y., Agus, S., Ozgun, H. B., Ozen, D. O., Atasoy, D., & Yilmaz, B. (2022, February). Chronic High Fat Diet Causes Electrophysiological Changes in POMC Neurons in the Hypothalamic Arcuate Nucleus. <i>Acta Physiologica</i> (Vol. 234, Pp. 41-41).
4. <b>Başer Ö</b> , Yavuz Y, Ağuş S, Özen DÖ, Özgün HB, Cıvaş CC, Atasoy D and Yılmaz B. (2021). Effects of chronic high-fat diet on the role and morphological features of POMC neurons in the hypothalamic arcuate nucleus in feeding behavior. 19th National Neuroscience Congress, Online, 21-23 November 2021, SS-72.
5. <b>Başer Ö</b> , Yavuz Y, Ağuş S, Özgün HB, Özen DÖ, Atasoy D and Yılmaz B. (2021). Chronic high-fat diet alters the electrophysiological properties of POMC neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. 47rd Turkish Physiology Congress, Online, 8-10 October 2021, SS-59.
6. <b>Baser O</b> , Eyuboglu S, Agus S, Yavuz Y, Bilgin VA, Topcu IC, Civas CC, Atasoy D, Yilmaz B. Investigation of the effect of kisspeptin neurons in the arcuate nucleus on the spatial learning and memory in Alzheimer's disease by pharmacogenetic methods. <i>International Journal of Experimental &amp; Clinical Anatomy</i> . 2019; 13
7. S Agus, CC Civas, S Eyuboglu, Y Yavuz, <b>O Baser</b> , IC Topcu, VA Bilgin, D Atasoy, B Yilmaz. 2019/9/1. Effects of Optogenetic and Chemogenetic Manipulations of Hypothalamic Kisspeptin Neurons on Hippocampal Astrocytes in Kiss-Cre Mice. <i>Acta Physiologica</i> , Volume 227,138-139.
8. Ağuş, S., <b>Başer, Ö.</b> , Topçu, I. C., Cıvaş, C. C., & Yılmaz, B. (2019). M. Gazi Yaşargil: Man of the century (1950-1999). <i>Anatomy: International Journal of Experimental &amp; Clinical Anatomy</i> , 13.
9. Agus S, Civas CC, Eyuboglu S, Yavuz Y, <b>Baser O</b> , Topcu IC, Bilgin VA, Atasoy D, Yilmaz B. Effects of Optogenetic and Chemogenetic Manipulations of Hypothalamic Kisspeptin Neurons on Hippocampal Astrocytes in Kiss-Cre Mice. <i>ACTA PHYSIOLOGICA</i> . 2019; 227:138-139
10. Agus S, Eyuboglu S, Solak H, Bilgin VA, Yavuz Y, Akkaya H, <b>Baser O</b> , Kutlu S, Bingöl CA, Atasoy D, Yilmaz B. Chronic manipulation of arcuate kisspeptin neurons in a (1-42) induced mouse model of alzheimer's disease. Karger, 2018
11. Agus S, Eyuboglu S, Solak H, Bilgin VA, Yavuz Y, Akkaya H, <b>Baser O</b> , Kutlu S, Bingöl CA, Atasoy D, Yilmaz B. Effects of chronic modulation of kiss1 neurons on catecholamine levels in experimental alzheimer disease's model. Willey, 2018
12. Eyuboglu S, Agus S, Yavuz Y, <b>Baser O</b> , Alkaç Üİ, Atasoy D, Yılmaz B. Functional and anatomical characterisation of kisspeptin neurons and synaptic connections in KissCre-GFP mice. Willey, 2017

13. Eyuboğlu S, Ağuş S, Yavuz Y, <b>Başer </b> , İşoğlu Alkaç , Atasoy D and Yılmaz B. (2017). Functional and anatomical characterisation of kisspeptin neurons and synaptic connections in KissCre-GFP mice. 43rd Turkish Physiology Congress, Pamukkale University, 7-10 September Denizli. Acta Physiologica, Volume 221, Supplement S714, OC04.
14. <b>Başer </b> , Yavuz Y, Bilgin V A, Cebecioğlu U, Eyuboğlu S, Atasoy D and Yılmaz B. (2017). Role and electrophysiological analysis of appetite circuits of ChAT neurons in the arcuate nucleus. 43rd Turkish Physiology Congress, Pamukkale University, 7-10 September Denizli, PC062, p79.
15. Gler S, Yavuz Y, Eyuboğlu S, <b>Başer </b> , Atasoy D, Yılmaz B. (2017). Transgenik Farelerde Paraventriküler ekirdekte Bulunan Oksitosin Nöronlarının İncelenmesi. 15. Ulusal Sinirbilim Kongresi, Sakarya Üniversitesi, 7-10 Mayıs. PS024.

#### **Diğer (Görev Aldığı Projeler/Sertifikaları/dlleri)**

86081, Exosome Project Collaboration with Linköping University
AUTOIGG Project Collaboration with Connecticut Health Center
118S245, Kronik Yüksek Kalorili Diyetin Mediobazal Hipotalamik Tokluk Sinir Ağlarının İşleyişine Etkisi, 1001- Araştırma, Burslu, Yürürlükte, ARDEB, SBAG- Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 19.12.2018- 21.08.2020, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.11.2018- 01.11.2021.
Poster First Prize, 3rd International Turkish Neuroendocrinology Society Congress (29 June-01 July 2018)
115S327, Kisspeptin-GPR54 Sistemi ve Luteinizan Hormonun Alzheimer Hastalığı Patogenezindeki Rollerinin Transgenik Fare Modellerinde Optogenetik ve Farmakogenetik Yöntemlerle Araştırılması, 1001- Araştırma, Burslu, Sonuçlandı, ARDEB, SBAG- Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 13.06.2016- 01.10.2018, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.10.2015- 01.10.2018.
Poster Third Prize, 43rd National Physiology Congress (07-10 September 2017)
214S361, Neuronal Origins of Morbid Obesity Based on Prader-Willi Syndrome