

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

**TRANSGENİK FARE KİSSPEPTİN
NÖRONLARINDA ERKEN DÖNEM SOSYAL
İZOLASYON İLİŞKİLİ FONKSİYONEL ve
AKSONAL PLASTİSİTENİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

SAMİ AĞUŞ

DANIŞMAN

Prof. Dr. BAYRAM YILMAZ

İstanbul-2021

TEZ ONAYI FORMU

Kurum : Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program : Fizyoloji
Tez Başlığı : Transgenik Fare Kisspeptin Nöronlarında Erken Dönem Sosyal İzolasyon İlişkili Fonksiyonel ve Aksonal Plastisitenin Araştırılması.
Tez Sahibi : Sami AĞUŞ
Sınav Tarihi : 25.02.2021

Bu çalışma jürimiz tarafından kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı, Adı-Soyadı (Kurumu)
Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Bayram YILMAZ (Yeditepe Üniversitesi-Fizyoloji)
Tez danışmanı:	Prof. Dr. Bayram YILMAZ (Yeditepe Üniversitesi-Fizyoloji)
Üye:	Prof. Dr. Güler ÖZTÜRK (İstanbul Medeniyet Üniversitesi-Fizyoloji)
Üye:	Prof. Dr. Sinan CANPOLAT (Fırat Üniversitesi-Fizyoloji)
Üye:	Doç. Dr. Mehtap KAÇAR (Yeditepe Üniversitesi-Fizyoloji)
Üye:	Doç. Dr. Burcu GEMİCİ BAŞOL (Yeditepe Üniversitesi-Fizyoloji)

ONAY

Bu tez Yeditepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun 01/ 03/2021 tarih ve 2021/02-44 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Bayram YILMAZ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

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

25.02.2021

Sami AĞUŞ

İTHAF

Eşim *Elif*, Kızım *Zeynep Naz* ve Oğlum *Ömer Selim*’e

TEŞEKKÜR

Ekibinde olmakla gurur duyduğum, bilimsel anlamda fikir dünyamın oluşmasında en büyük katkısı olan, bu zorlu yolda vazgeçmeyi hiç bir zaman düşünmeme mücadele etmeyen, laboratuvarında her daim standartlarımızı yüksek tutmamızı sağlayan ve hedefimizi hep daha yükseğe taşıyan, hem laboratuvarında hem hayatta maddi ve manevi desteğini her zaman hissettiğim, kıymetli bilim insanı ve danışmanım Prof. Dr. Bayram YILMAZ'a;

İhtiyacım olan her an fikirlerine danıştığım, çalışmalarımı büyük bir zevkle tartıştığım başta Fizyoloji anabilim dalından Doç. Dr. Mehtap KAÇAR ve Doç. Dr. Burcu GEMİCİ BAŞOL, Histoloji anabilim dalından Doç. Dr. Aylin YABA UÇAR olmak üzere Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nin tüm öğretim üyelerine;

Hayatta abiliğini ve arkadaşlığını yürekten hissettiğim, tezimin fikir olarak gelişmeye başlamasından itibaren, son veriyi alana kadar desteğini hep gördüğüm, birlikte çalışmaktan keyif aldığım, Dr. Volkan Adem BİLGİN ve Ar. Gör. Yavru YAVUZ'a;

Yeditepe Üniversitesi Beyin Araştırmaları Ekibinde birlikte çalışmakla yine çok keyif aldığım, çalışmamın davranış deneylerinde yardımcı olan Dr. İrem YAPAR'a, ve ihtiyacım olduğu her anda yanımda olan arkadaşlarım Ar. Gör. M. Sinem ETHEMOĞLU, Ar. Gör. Cihan ERDOĞAN, Ar. Gör. Özge BAŞER, Ar. Gör. H. Buğra ÖZGÜN ve diğer tüm ekip arkadaşlarıma, deney hayvanı temini ve bakımı konusunda desteklerini esirgemeyen Dr. Vet. Engin SÜMER ve teknisyen Ramazan GÜNEYLİ ve tüm YÜDETAM ekibine, tezimi hazırlarken ve sunarken yardımcı olan Sağlık Bilimleri Enstitüsü sekreteri Hasan KOÇ ve çalışma arkadaşlarına;

Bir tütün tarlasında beni dünyaya getirip bu günlere gelmemi sağlayan, hakkını hiç bir zaman ödeyemeyeceğim annem Fatma AĞUŞ ve babam Şaban AĞUŞ'a, bu zorlu süreçte en büyük desteğini gördüğüm sevgili eşim Elif AĞUŞ'a, güzel ablalarım Remziye ve Sabiha AĞUŞ'a, değerli abim Mehmet AĞUŞ'a, canım kardeşim Hüseyin AĞUŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU	ii
BEYAN	iii
İTHAF	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
SEMBOLLER ve KISALTMALAR LİSTESİ	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1. Adolesan Dönem ve Sosyal İzolasyon	3
2.2. Kisspeptin ve Puberte	4
3. GEREÇ ve YÖNTEM	11
3.1. Kullanılan Deney Hayvanı	11
3.1.1. Deney Grupları ve Deney Planı	11
3.1.2. Farelerin Polimeraz Zincir Reaksiyon ile Cre Genotiplerinin Belirlenmesi	12
3.2. Deney Modelinin Oluşturulması (PWSI)	15
3.3. Davranış Deneyleri	15
3.3.1 Lokomotor Aktivite Davranış Takibi	16
3.3.2. Beslenme Davranış Takibi	22
3.3.3. Yükseltilmiş Artık Labirent Tesi	22
3.4. Stereotaksik İntra-Hipotalamik AAV Enjeksiyonları	23
3.5. Kisspeptin Nöronlarının Elektrofizyolojik Özelliklerinin Araştırılması	26
3.5.1. Ex-vivo Beyin Kesitlerinin Hazırlanması	26
3.5.2. Spontane Aksiyon Potansiyel Kaydının Alınması	28
3.6. ARC KNDy İmmünfloresan Boyama	29

3.7. Kisspeptin Nöronlarının Aksonal Uzantılarının Görüntülenmesi	30
3.7.1. Beyin Kesitlerinin Hazırlanması	31
3.7.2. Beyin Kesitlerinin Görüntülenmesi ve Analizi	31
4. BULGULAR	32
4.1. Erken Dönem Sosyal İzolasyonun Lokomotor Aktivite Üzerine Etkisi	32
4.2. Erken Dönem Sosyal İzolasyonun Beslenme Davranışı Üzerine Etkisi	37
4.3. Erken Dönem Sosyal İzolasyonun Anksiyete Üzerine Etkisi	40
4.4. Erken Dönem Sosyal İzolasyonun ARC Kisspeptin Nöronlarının Elektrofizyolojik Özelliklerine Etkisi	41
4.5. Erken Dönem Sosyal İzolasyonun ARC Bölgesindeki KNDy Üzerine Etkisi	44
4.6. Erken Dönem Sosyal İzolasyonun ARC Kisspeptin Nöronlarının Projeksiyonlarına Etkisi	48
5. TARTIŞMA	51
6. KAYNAKLAR	56
7. EKLER	62
7.1. Etik Kurul Kararı	62
7.2. İntihal Raporu İlk Sayfası	63
7.3. Öz Geçmiş	64

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3.1. Çalışmada oluşturulan deney grupları ve hayvan sayıları.	12
Tablo 3.2. Kiss:Cre ⁺ farelerin genotiplenmesinde kullanılan Cre primer dizileri	13
Tablo 3.3. Kiss:Cre ⁺ farelerinin genotiplenmeleri için PZR karışımı	13
Tablo 3.4. Kiss:Cre ⁺ farelerinin genotiplenmeleri için PZR termal döngü koşulları	14
Tablo 3.5. Hareket sensöründen alınan verilerin ikili kod olarak alınmasını sağlayan Aruino yazılım kodu.	18
Tablo 3.6. Elektrofizyoloji deneylerinde kullanılan aCSF solüsyon içerikleri	27
Tablo 3.7. İmmünfloresan boyamalarda kullanılan primer antikorlar.	30
Tablo 4.1. İzole ve sosyal gruplardaki dişi farelerin 12 saatlik (gündüz-gece) kafes içi lokomotor aktivite ortalamaları.	34
Tablo 4.2. İzole ve sosyal gruplardaki erkek farelerin 12 saatlik kafes içi lokomotor aktivite ortalamaları.	35
Tablo 4.3. İzole ve sosyal gruplardaki dişi farelerin 24 saat boyunca tükettikleri yem miktarı	37
Tablo 4.4. İzole ve sosyal gruplardaki erkek farelerin 24 saat boyunca tükettikleri yem miktarı	37
Tablo 4.5. İzole ve sosyal gruplardaki dişi farelerin 24 saat boyunca yem tüketirken oluşan toz miktarı	39
Tablo 4.6. İzole ve sosyal gruplardaki erkek farelerin 24 saat boyunca yem tüketirken oluşan toz miktarı	39
Tablo 4.7. İzole ve sosyal gruptaki farelerin Yükeltilmiş Artı Labirent testinde labirentin açık ve kapalı kollarında geçirdikleri süre	40
Tablo 4.8. İzole ve sosyal grup farelerin hipotalamik ARC bölgesinde KNDy immünfloresan boyaması floresan yoğunlukları.	46

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Dişi farede Arkuat Çekirdekte pubertal gelişim süresince Kisspeptin nöron popülasyonunun immünreaktivite tekniği ile gösterimi	6
Şekil 2.2. Erkek ve dişi farelerde AVPV’de pubertal gelişim süresince Kisspeptin nöron sayısının değişimi	6
Şekil 2.3. Kisspeptin nöronlarının GnRH nöronları ile ilişkisi ve HPG aksındaki rolü	8
Şekil 3.1. Çalışma planı ve zaman akışı.	12
Şekil 3.2. Kiss:Cre ⁺ farelerinin genotiplmelerinde elde edilen PZR jel görüntüsü.	14
Şekil 3.3. PWSI modeli oluşturulan kafes sistemleri	15
Şekil 3.4. Lokomotor ve beslenme davranışlarının takip edildiği davranış kafesleri	16
Şekil 3.5. Lokomotor ve beslenme davranışlarının takip edildiği kafes sistemleri	17
Şekil 3.6. Davranış kafeslerine monte edilen kamera ve PIR sensörleri, sensörün bağlı olduğu Arduino elektronik kart bağlantısı ve kameradan alınan kafes görüntüsü	17
Şekil 3.7. Arduino yazılımı ile hareket sensörlerinden elde edilen ikili kod verileri temsili görüntüsü	19
Şekil 3.8. Bir fareden 24 saat boyunca alınan 86400 adet veri 15 dakika / 12 saat lik segmentlere çevrildi.	20
Şekil 3.9. Arduino verilerinden oluşturulan “aktogram” örneği.	21
Şekil 3.10. Anksiyete deneyinde kullanılan yükseltilmiş artı labirenti.	23
Şekil 3.11. Cre enzimi varlığında Cre-Lox sisteminin çalışma mekanizması.	24
Şekil 3.12. a- AAV enjeksiyonlarında kullanılan stereotaksik sistem. b- Hipotalamik arkuat çekirdeğe AAV bilateral enjeksiyon.	25

Şekil 3.13. Elektrofizyoloji sistemi	38
Şekil 4.1. İzole ve sosyal gruptaki dişi ve erkek farelerin gündüz ve gece kafes içi lokomotor aktivitelerini gösteren ısı haritaları.	32
Şekil 4.2. İzole ve sosyal gruptaki erkek ve dişi farelerin gündüz ve gece kafes içi lokomotor aktivitelerini gösteren aktogram grafiği.	33
Şekil 4.3. Gruplar arası kafes içi lokomotor aktivite ortalaması karşılaştırmaları	36
Şekil 4.4. Gruplar arası yem tüketim ortalamaları karşılaştırması	38
Şekil 4.5. Gruplar arası yem tüketirken oluşan toz miktarı ortalamaları karşılaştırması	39
Şekil 4.6. Yükseltilmiş artı labirent testi ısı haritası	40
Şekil 4.7. Yükseltilmiş artı labirent testinde izole ve sosyal gruptaki farelerin labirentin kollarında geçirdikleri süreler	41
Şekil 4.8. Hipotalamik ARC Kisspeptin nöronlarından aksiyon potansiyel kaydı	41
Şekil 4.9. İzole gruptaki dişi fare ARC Kisspeptin nöronlarından alınan aksiyon potansiyel kaydı örneği	42
Şekil 4.10. Sosyal gruptaki dişi fare ARC Kisspeptin nöronlarından alınan aksiyon potansiyel kaydı örneği.	42
Şekil 4.11. İzole ve Sosyal gruptaki farelerin ARC Kisspeptin nöronlarının spontan ateşleme frekansları	43
Şekil 4.12. İzole ve Sosyal gruptaki farelerin cinsiyete göre ARC Kisspeptin nöronlarının spontan ateşleme frekansları.	43
Şekil 4.13. İzole gruptaki farelerde hipotalamik ARC bölgelerinde Kisspeptin, Nörokinin ve Dinorfin immünfloresan boyamaları	44
Şekil 4.14. Sosyal gruptaki farelerde hipotalamik ARC bölgelerinde Kisspeptin, Nörokinin ve Dinorfin immünfloresan boyamaları.	45

Şekil 4.15. İzole ve Sosyal grup farelerin hipotalamik ARC bölgelerinde	
Kisspeptin İmmü floresan boyaması floresan yoğunluğu	46
Şekil 4.16. İzole ve Sosyal grup farelerin hipotalamik ARC bölgelerinde Nörokinin B	
İmmü floresan boyaması floresan yoğunluğu	47
Şekil 4.17. İzole ve Sosyal grup farelerin hipotalamik ARC bölgelerinde	
Dinorfin İmmü floresan boyaması floresan yoğunluğu	47
Şekil 4.18. İzole ve sosyal gruptaki farelerin hipotalamik ARC bölgesinde bulunan	
Kisspeptin nöronlarının aksonal uzantılarının hipotalamusta yayılımı	49
Şekil 4.19. İzole ve sosyal gruptaki farelerin hipotalamik ARC Kisspeptin	
nöronlarının AVPV bölgesine yaptığı aksonal projeksiyonlar	50

SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ARC	Arkuat Çekirdek
AAV	Adone Associated Virüs
AVPV	Anteroventral Periventricular
HPG	Hipotalamo-Hipofizo-Gonadal
PWSI	Emzirme Sonrası Sosyal İzolasyon
GFP	Green Floresan Protein
POA	Preoptik Alan
GnRH	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
KNDy	Kisspeptin/Nörokinin B/Dinorfin
ME	Median Eminens
LH	Lüteinleştirici Hormon
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PIR	Pasif Kızılötesi
aCSF	yapay omur ilik sıvısı

ÖZET

Ağuş, S. (2021). Transgenik Fare Kisspeptin Nöronlarında Erken Dönem Sosyal İzolasyon İlişkili Fonksiyonel ve Aksonal Plastisitenin Araştırılması. Yeditepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji ABD, Doktora Tezi. İstanbul

Bu çalışmada adolesan dönemde maruz kalınan sosyal izolasyon stresinin, hipotalamik Arkuat Çekirdeğinde (ARC) bulunan Kisspeptin nöronlarının fonksiyonlarının ve aksonal uzantılarının nasıl etkilendiği araştırıldı. Bu amaçla Kiss:Cre transgenik fare hattı kullanıldı. Post-natal 21. günde (P21) fareler 3 haftalık sosyal izolasyona alındı. Bu dönemde fareler opak kafeslerde tek başına yaşarken sosyal gruptaki fareler normal kafeslerde üçerli gruplar halinde yaşatıldı. İzolasyon sonrasında farelerin lokomotor aktiviteleri, beslenme davranışları ve anksiyeteleri gözlemlendi. Kisspeptin nöronlarını görüntüleyebilmek için farelerin hipotalamik ARC bölgelerine GFP-Adone Associated Virüs (AAV) enjeksiyonu yapıldı. Bu farelerin ARC Kisspeptin nöronlarından elektrofizyoloji kaydı alındı. Projeksiyon analizi yapabilmek için ARC Kisspeptin nöronlarının aksonal uzantıları konfokal mikroskopta görüntülendi. ARC bölgesinde Kisspeptin, NörokininB ve Dinorfin nöropeptid ifadesi immünfloresan tekniği kullanılarak incelendi.

Davranış deneylerinden elde edilen sonuçlara bakıldığında gece fazında izole gruptaki dişilerin diğer gruplardan daha aktif olduğu ($p<0.005$) erkeklerde ise sosyal gruptaki farelerin izole gruptakilerden daha aktif olduğu görüldü. Beslenme davranışlarında gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi. Yükseltilmiş artı labirent testinde izole gruptaki farelerin daha anksiyetik olduğu görüldü ($p<0.05$). Sosyal gruptaki farelerin ARC Kisspeptin nöronlarının aksiyon potansiyel frekanslarının izole gruptaki farelere göre daha yüksek olduğu ($p<0.001$), sosyal gruptaki dişi farelerin aksiyon potansiyel frekanslarının izole gruptaki dişi ve erkek farelere göre daha yüksek olduğu ($p<0.001$) görüldü. İmmünfloresan sonuçlarına bakıldığında izole gruptaki farelerin ARC bölgelerinde Dinorfin miktarının sosyal gruptan daha fazla olduğu ($p<0.05$) görüldü. Nörokinin B miktarının izole gruptaki farelerde, Kisspeptin miktarının ise sosyal gruptaki farelerde daha fazla olduğu gözlemlendi ancak istatistiksel anlamlılık görülmedi. Aksonal projeksiyon analizlerine bakıldığında sosyal gruptaki farelerin hipotalamik ARC Kisspeptin nöronlarının Anteroventral Periventricular (AVPV) bölgeye izole gruptakilere

göre daha yoğun projeksiyon yaptığı gözlemlendi. Beynin diğer bölgelerine yapılan ARC Kisspeptin aksonal projeksiyonları için gruplar arasında bir fark görülmedi.

Elde edilen bu bulgulara göre ergenlik döneminde maruz kalınan sosyal izolasyonun farelerin lokomotor ve anksiyete davranışlarını etkilediği ve Kisspeptin nöronlarının fonksiyonlarını baskıladığı görüldü.

Anahtar Kelimeler: Sosyal İzolasyon, Kisspeptin, Elektrofizyoloji, Davranış Deneyleri,



ABSTRACT

Ağuş, S. (2021). Investigation of Functional and Axonal Plasticity in Kisspeptin Neurons Following Early Social Isolation in Transgenic Mice. Yeditepe University, Institute of Health Science, Department of Physiology, PhD Thesis. İstanbul

In this study, it was investigated how the stress of social isolation in adolescence affects the functions and axonal projections of Kisspeptin neurons in the hypothalamic Arcuate Nucleus (ARC). For this purpose, the Kiss: Cre transgenic mouse line was used. On the post-natal 21st day (P21), the mice were placed in social isolation for 3 weeks. During this period, mice were living alone in opaque cages, while mice in the social group were kept alive in groups of three in normal cages. Locomotor activities, feeding behavior and anxiety of mice were observed after isolation. GFP-Adone Associated Virus (AAV) was injected into the hypothalamic ARC regions of mice to visualize the kisspeptin neurons. Electrophysiology was recorded from ARC Kisspeptin neurons of these mice. Axonal projections of ARC Kisspeptin neurons were viewed under the confocal microscop. Kisspeptin, NeurokininB and Dynorphine neuropeptides expression in the ARC region was examined using the immunofluorescence technique.

Looking at the results obtained from the behavioral experiments, it was seen that females in the isolated group were more active than the other groups in the nocturnal phase ($p < 0.005$), and the mice in the social group were more active than those in the isolated group. There was no significant difference in feeding behavior between the groups. Mice in the isolated group were found to be more anxious in the elevated plus maze test ($p < 0.05$). It was observed that the action potential frequencies of ARC Kisspeptin neurons of mice in the social group were higher than the mice in the isolated group ($p < 0.001$), and the action potential frequencies of female mice in the social group were higher than that of female and male mice in the isolated group ($p < 0.001$). When the immunofluorescence results were examined, it was seen that the amount of Dynorphine in the ARC regions of the mice in the isolated group was higher than the social group ($p < 0.05$). It was observed that the amount of Neurokinin B was higher in mice in the isolated group and the amount of Kisspeptin in mice in the social group, but statistical significance was not observed. When axonal projection analyzes were examined, a more intense projection of hypothalamic ARC Kisspeptin neurons in social group mice was observed to the Anteroventral Periventricular (AVPV) region compared to those in the isolated

group. There was no difference between groups for ARC Kisspeptin axonal projections to other parts of the brain.

According to these findings, it was observed that social isolation exposed during adolescence affected the locomotor and anxiety behavior of mice and suppressed the functions of Kisspeptin neurons.

Key Words: Social Isolation, Kisspeptin, Electrophysiology, Behavioral Experiments



1. GİRİŞ ve AMAÇ

Adolesan (ergenlik) bireylerin yaşam döngülerinde kapsamlı nöronal ve davranışsal değişikliklerin ortaya çıktığı; bireylerin bilişsel, duygusal ve sosyal gelişim kazandıkları önemli bir evredir (1). Hipotalamo-Hipofiz-Gonadal (HPG) aksın aktive olduğu puberte başlangıcı da adolesan dönemin bir parçası olduğu gibi bireyin erişkin dönemini etkileyecek diğer endokrin mekanizmalar da bu adolesan dönemde gelişmeye devam etmektedir. Kemirgenlerle yapılan çalışmalarda bu dönemde maruz kalınan sosyal stres faktörlerinin depresyon, anksiyete ve ödül mekanizması ilişkili davranışları etkilediği görülmüştür (2). Bu çalışmalarda öne çıkan stresör modeli ise kemirgenlerin adolesans dönem boyunca tek başına yaşadığı emzirme sonrası sosyal izolasyon (PWSI) modelidir. Bu modelde beyin dokusundaki hormonal mikro-çevrenin ve monoaminerjik sinyal yollarının etkilendiği görülmüştür (1-2)

Kisspeptin ilk olarak bir tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanan KISS-1 geninin peptit ürünüdür. Kisspeptin GPR54 reseptörünün bir agonistidir. Kisspeptin/GPR54 sistemi HPG aksının aktive olması için gerekli düzenleyicilerinden biri olduğu bilinmektedir. Kisspeptin nöronları çoğunlukla hipotalamusun ARC ve AVPV çekirdeklerinde lokalize olmuşlardır (3). Kisspeptin salgılayan nöronlar başta HPG aksındaki hormonların kontrolü olmak üzere puberteye giriş, cinsel davranışlar, gebelikte oksitosin salgısının düzenlenmesi, besin alımının zamanlaması ve lokomotor aktivitenin sirkadiyen regülasyonu gibi bir çok mekanizmada önemli rol oynamaktadır. Bu düzenlenmelerin bir çoğunu da ko-lokalize olduğu Nörokinin B ve Dinorfin nöropeptidleri ve bunların reseptörleri (Sırasıyla, NK3R ve KOR) aracılığıyla gerçekleştirmektedir (4). Kisspeptin nöronları HPG aksı ile ilişkili fizyolojik ve çevresel değişikliklere yanıt oluşturmakta Nörokinin B ve Dinorfin aracılığı ile diğer beyin bölgelerinden aferent girdileri almak için ideal bir istasyon (hub) konumundadır (5).

Nörokinin B'nin izolasyon stres faktörleri altında farklı beyin bölgelerinde mRNA ve peptit düzeyinde artış ve anlamlı davranış değişiklikleri gözlemlenmesine rağmen, bu ilişki tam olarak açıklanamamıştır. Nörokinin B ile yakın ilişkide olmasına rağmen Kisspeptin nöronlarının stres davranışındaki rolü henüz literatürde açıklanamamıştır. Erken dönemde izolasyon stresine maruz kalmış bireylerin erişkinlik dönemlerinde görülen HPG aksıyla ilişkili davranış değişiklikleri de göz önünde bulundurulduğunda erken dönem izolasyon stresi ile Kisspeptin nöronlarının fonksiyonel ve aksonal projeksiyonlarının incelenmesine ihtiyaç vardır.

Bu tez çalışmasında Cre-rekombinaz enzimini sentezleyecek şekilde dizayn edilmiş Kiss-Cre transgenik fareler kullanılmıştır. Bu sayede Hipotalamik ARC bulunan Kisspeptin nöronları Green Floresan Protien (GFP) trasgenini içeren non-patojen AAV ile enfekte edilerek, bu nöronların soma ve aksonal uzantılarında GFP üretmesi sağlanmıştır. Böylelikle Kisspeptin nöronlarının yaptığı nöronal projeksiyonlar spesifik olarak takip edilmiştir. Bu işaretleme yöntemi bu nöronlardan spesifik elektrofizyolojik kayıt alınmasına da imkan sağlamaktadır. Ayrıca bu nöronlarda ve aksonal projeksiyon yaptıkları bölgede NKB ve Dinorfin için immünfloresan boyama yapılarak bu nöronların stres koşulları altındaki fonksiyonel değişimleri incelenmiştir. Post mortem deneyler yapılmadan önce erken dönem sosyal izolasyona maruz bırakılan farelerin kafes içi lokomotor ve yeme davranışları da çalışmaya özel tasarlanan kafesler ve bu kafeslere entegre edilen hareket sensör ve kamera sistemleri ile takip edilmiştir.

Bu tez çalışmasında, ergenlik döneminde maruz kalınan sosyal izolasyon stresinin Kisspeptin nöronlarının elektrofizyolojik fonksiyonlarını etkileyip etkilemediği, Kisspeptin nöronlarının nöropeptit salınımını ve bu nöronların beynin farklı bölgelerine yaptığı projeksiyonları değiştirip değiştirmediğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Erken dönem sosyal izolasyon modeli oluşturularak puberteye geçişte kritik role sahip Kisspeptin nöronlarının fonksiyonlarının ve aksonal projeksiyonlarının nasıl etkilendiği ilk defa olarak incelenmiştir. Davranış deneylerinde kullanılan teknikler ise bu alanda çalışma yapan araştırmacılar için davranış laboratuvarlarında kullanılan karmaşık ve pahalı sistemlere alternatif daha basit ve ucuz teknik sunmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Adolesan Dönem ve Sosyal İzolasyon

Bireyler çocukluktan erişkinliğe geçerken cinsel olgunluğun yanı sıra ebeveynlerinden bağımsız kendi hayatlarını kurabilmeleri için gerekli bilişsel, duygusal ve sosyal becerilerini geliştirirler (1). Bu gelişmelerin görüldüğü dönem “ergenlik” ya da “adolesan” olarak isimlendirilir (6). Adolesan, bireylerin yaşam döngülerinde kapsamlı nöronal ve davranışsal değişikliklerin ortaya çıktığı; bilişsel, duygusal ve sosyal gelişim kazandıkları önemli bir evredir (7).

Bu dönem bireylerin ailelerinden bağımsız olarak sosyal çevreleriyle etkileşime girerek bir arayış içerisinde oldukları ve bu sebeple sosyal stres faktörlerine daha duyarlı oldukları bir dönemdir. (1) Adolesan dönemin yaş ile tanımlanması toplumlara göre farklılık gösterebilmektedir. Bireyler adolesan dönemdeki davranışlarından tamamiyle sorumlu tutulmayıp vasilerinin kontrolünde yaşamaktadırlar. Adolesan dönemde çeşitli çevresel etkilerle gerçekleştirilen madde bağımlılığı gibi kötü davranışlar erişkin dönemde kazanılmış bir alışkanlık olarak ortaya çıkmaktadır (8). Bu sebeple adolesan dönemde sigara ve alkol kullanımı gibi davranışlar otoriteler tarafından sınırlandırılmaktadır.

Uyuşturucu madde bağımlılığı, alkol ve sigara kullanımı, sağlıklı beslenememe gibi çevresel faktörlerden farklı olarak adolesan dönemde bireylerin maruz kaldığı sosyal izolasyona bağlı stres uyaranlarının da erişkin dönemdeki birçok davranışı etkilediği bildirilmiştir (9-10). 2020 yılının başına kadar sosyo ekonomik koşullara bağlanabilecek olan sosyal izolasyon, 2020 yılının başında Covid-19 salgınından dolayı ilan edilen pandemi sebebiyle tüm dünya genelinde milyonlarca insanı etkileyen zorunlu sosyal izolasyon (forced social isolation) olarak ifade edilmiş ve toplum sağlığını etkileyen en önemli stres kaynakları arasında gösterilmeye başlanmıştır (11-12).

Farelerde yapılan çalışmalarda adolesan döneme denk gelen emzirme sonrasında (Postnatal 21. gün) 1 haftadan fazla süren sosyal izolasyon modelinde dikkat azalması, sosyal bağlanmada azalma ve koşullu korku hafızasında gerileme gibi davranış bozuklukları görülmüştür (13). Yine bu dönemde maruz kalınan sosyal stres faktörlerinin depresyon, ankisyete ve ödül mekanizması ilişkili davranışları etkilediği gösterilmiştir. (14)

Farelerde yapılan bir çalışmada P21 sonrası iki hafta süren sosyal izolasyonun “resident-intruder assay” olarak isimlendirilen bir sosyal etkileşim deneyinde agresif davranışları arttırdığı, korku öğrenme/hafıza davranışının modellendiği “looming disk” ve “fear conditioning” testlerinde donma hareketini arttırdığı, “açık alan” ve “yükseltilmiş arti” testlerinde de anksiyetik davranışları arttırdığı gözlemlenmiştir (15).

Ergenlik döneminde etkili olan stres faktörlerinin yetişkinlikte sebep olduğu en kritik durumlardan bir tanesi de madde bağımlılığıdır. Adolesan dönemde sosyal izolasyon stresine maruz bırakılan farelerde “şartlandırılmış” ve “ödüllü” tercih testleriyle bu modelin madde bağımlılığındaki etkisi test edilmiştir (16). P21-P42 günleri arasında izole olan farelerin kokain ve amfetamin psikostimülanlarına bağımlılığı sosyal gruptaki farelerle karşılaştırıldığına dramatik bir şekilde arttığı görülmüştür (17). Bu durumun opioidlerle karşılaştırılması için yapılan çalışma sayısının çok az olduğu bildirilmiştir (1). Sosyal izolasyonun madde bağımlılığı ile ilgili ilişkisi beyindeki mezolimbik dopamin sistemlerinin adolesan dönemdeki gelişimi ile ilgili olduğu ifade edilmektedir. (18)

Adolesan dönemde maruz kalınan izolasyon stres faktörlerinin beyin dokusundaki hormonal mikro-çevreyi ve monoaminerjik sinyal yollarını etkilediği görülmüştür. Adolesan dönemde stres ile indüklenmiş kortizol seviyelerinde artışın gösterildiği çalışmalar mevcuttur (19). Amigdala, hipokampus ve prefrontal korteks gibi birçok nörotransmitter ve sinyal yolağı sisteminin bulunduğu beyin bölgelerinin glukokortikoid reseptörlerini adolesan dönemde çok yüksek seviyelerde ifade ettiği bilinmektedir (20). Bu durumun hem adolesan hem de erişkin dönemde beyni stres uyaranlarına daha da duyarlı hale getirdiği ifade edilmektedir (21).

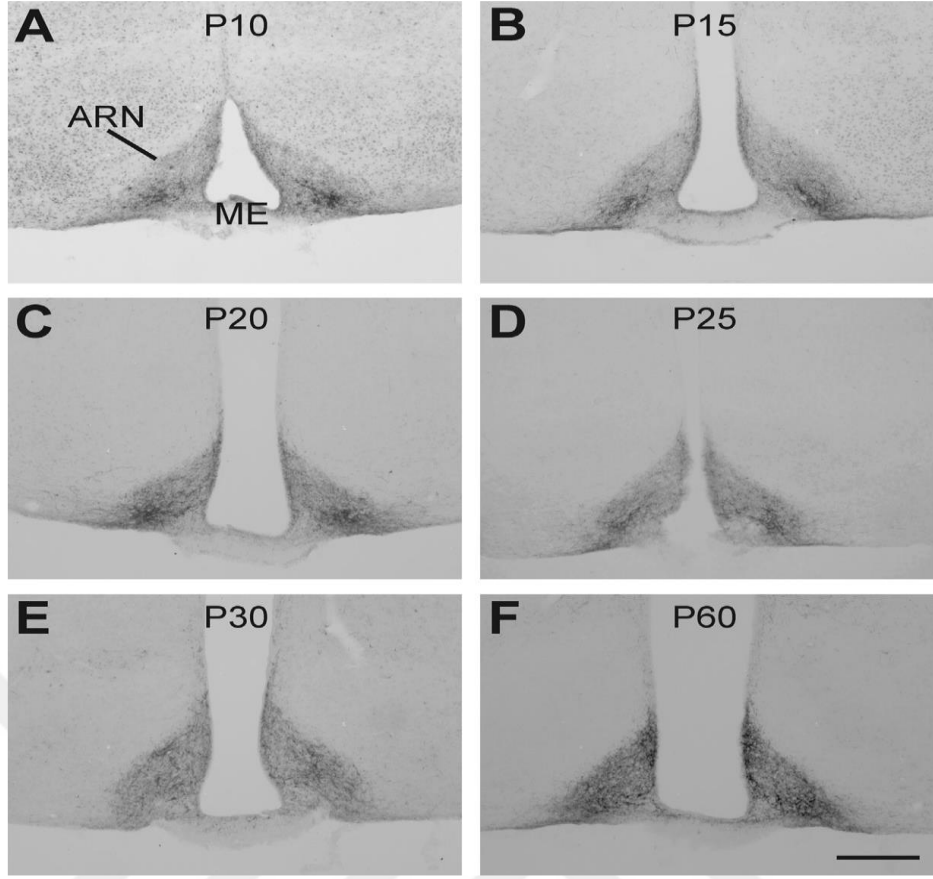
Bu çalışmalarda öne çıkan stresör modeli ise kemirgenlerin adolesan dönem boyunca tek başına yaşadığı emzirme sonrası sosyal izolasyon “Post-Weaning Social Isolation” (PWSI) modelidir (22). Sosyal izolasyon çalışmalarında P21. gün sonrası 1 hafta ile 7 hafta arasında değişen izolasyon süreleri uygulandığı görülmüştür (22-25).

2.2. Kisspeptin ve Puberte

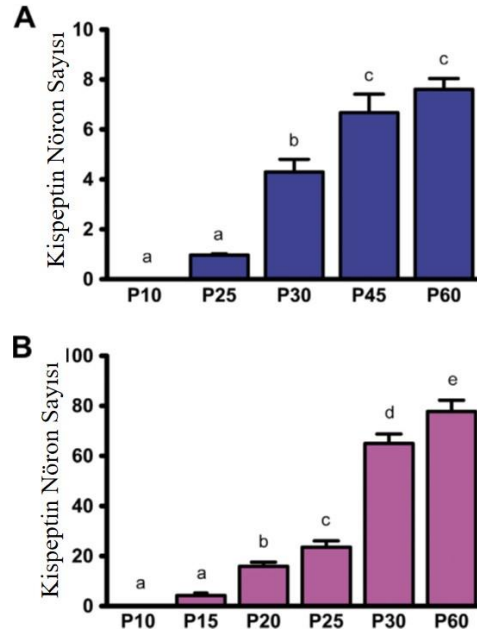
Nöroendokrin perspektiften bakıldığında adolesan dönem “puberte” olarak da isimlendirilir (26). Çocukluktan ergenliğe geçiş dönemi olarak adolesan ve puberte eşanlamlı olarak kullanılsa da adolesan, bilişsel, duygusal ve sosyal gelişimi ifade ederken puberte ise HPG aksın aktive olduğu, HPG aksındaki endokrin mekanizmaların

vücudun fizyolojik ve davranışsal gelişimlerdeki etkisinin görülmeye başlandığı ve üreme sisteminin çalışmaya başladığı dönem olarak ifade edilmektedir (27-29). Dişi sıçan ve farelerde puberteye giriş deneysel olarak vajinal açıklığın görülmesi olarak kabul edilmektedir. Sıçanlarda ilk ovulasyon ile östrus döngüsünün başlaması vajinal açıklığın görülmesi senkronize olurken, farelerde östrus döngüsünün başlaması vajinal açıklığın görülmesinden 10-20 gün sonra görülmektedir (30-31). Erkek farelerde ise sperm üretiminin başlaması puberteye giriş olarak kabul edilmektedir. Fareler için puberte başlangıcı dişilerde P30-P34 gün arasında erkeklerde ise P40-P55 gün arası olduğu belirtilmektedir (30). Puberteye giriş zamanında etkili olan intrinsik faktörler enerji metabolizmasını da düzenleyen Leptin ve İnsülin olduğu, ekstrinsik faktörlerinse olfaktör sinir yolu üzerinden etki eden feromonlar olduğu belirtilmiştir. (30,32)

Kisspeptin ilk olarak bir tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanan KISS-1 geninin peptit ürünüdür. Kisspeptin, G protein kenetli bir reseptör olan GPR54 reseptörünün agonistidir. Kisspeptin/GPR54 sisteminin HPG aksının aktive olması için gerekli düzenleyicilerinden biri olduğu bilinmektedir. Kisspeptin nöronları canlı türlerine göre farklılık göstermekle birlikte memeli canlıların hipotalamusun Arkuat Çekirdeğinde (33-36), primatlarda ve insanlarda bu bölgenin homoloğu olan infundibular çekirdekte yoğun olarak bulunmaktadır (37). Ayrıca bir çok memeli türünde Preoptic Alanda (POA) ve kemirgenlerde de antroventral periventricular çekirdeğinde de (AVPV veya RP3V) lokalize olmuşlardır (38). İmmünreaktivite tekniğiyle dişi farelerin hipotalamik ARC bölgesinde Kisspeptin nöron yoğunluğunun pubertal gelişim sürecinde değişimi gösterilmiştir (Şekil 2.1.) (39). Yine aynı teknik kullanarak dişi ve erkek farelerin AVPV bölgesindeki Kisspeptin nöronlarının popülasyonunun pubertal gelişim sürecinde arttığı gösterilmiştir (Şekil 2.2.) (39).



Şekil 2.1. Dişi farede Arkuat Çekirdekte pubertal gelişim süresince Kisspeptin nöron popülasyonunun immünreaktivite tekniği ile gösterimi. (Clarkson ve Herbison (39) 'dan derlenmiştir)

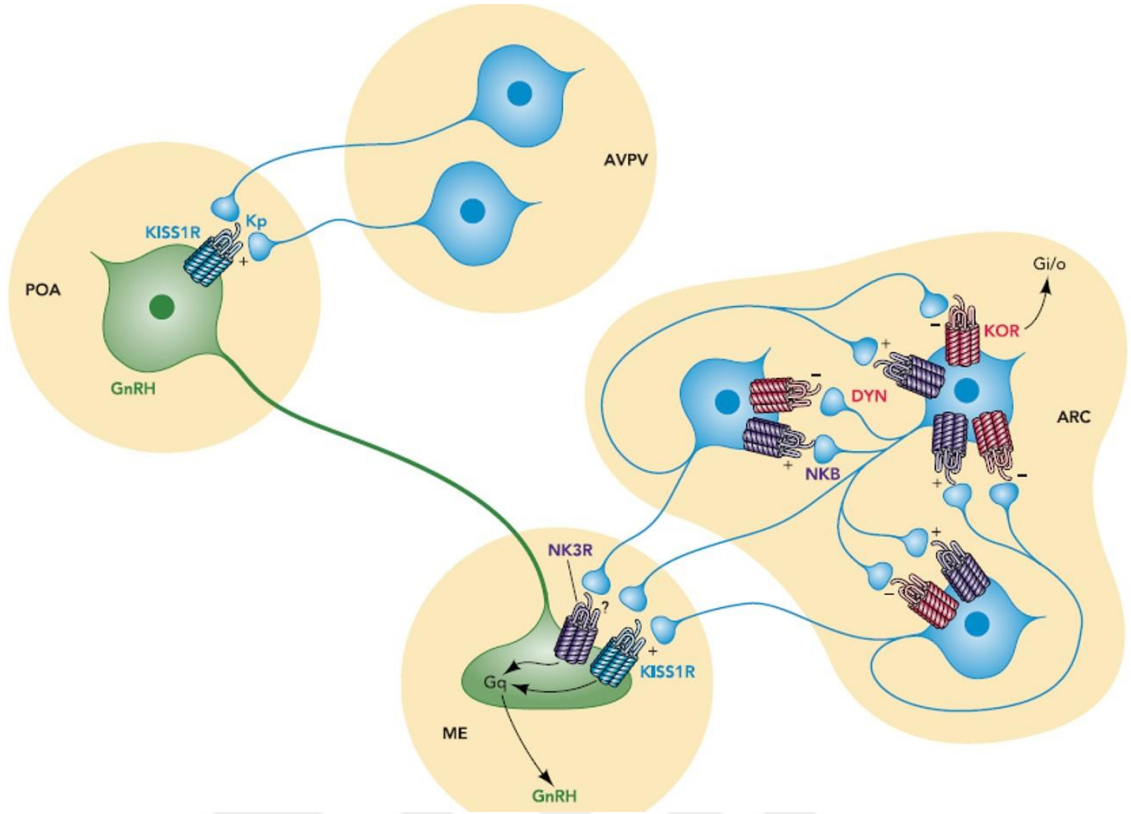


Şekil 2.2. Erkek (mavi) ve dişi (pembe) farelerde AVPV'de pubertal gelişim süresince Kisspeptin nöron sayısının değişimi (Clarkson ve Herbison (39) 'dan derlenmiştir).

GPR54 reseptörünün ise hipokampus ve korteks dahil beynin geniş bir alanında ifade edildiği bilinmektedir. Kisspeptin/GPR54 sistemi Gonadotropin Salgılatıcı Hormon (GnRH) salgılanması için gereklidir ve bu nedenle pubertenin nöroendokrin regülasyonunda kilit role sahiptir. Pubertenin başlangıcında GnRH sistemin aktive olmasıyla steroid hormon üretimi başlar ve bu steroid hormonlar da beyindeki GnRH sekresyonunu düzenleyerek adolesan dönem boyunca cinsel davranışları kontrol eden nöronal devrelerin oluşumunu sağlamaktadır. (40-41)

Hipotalamik ARC çekirdekte bulunan Kisspeptin nöronları aynı zamanda Nörokinin B ve Dinorfin peptitlerini de birlikte üretirler (Co-expression). AVPV'de bulunan Kisspeptin nöronları için böyle birşey söz konusu değildir. Bu üç peptidi salgılayan nöronlar aynı zamanda Kisspeptin/Nörokinin B/Dinorfin (KNDy) nöronları olarak da bilinmektedir. Nörokinin B ve Dinorfin ARC çekirdekte üretildikleri nöronlardan Kisspeptin salınımını kontrol etmektedir (42-43). (Şekil 2.3.)

GnRH nöronları POA'da bulunmakta olup aksonal sonlanımları Median Eminens'te (ME) bulunmaktadır. AVPV'de bulunan Kisspeptin nöronları POA'da bulunan GnRH somalarına aksonal projeksiyonlar yaparak buradaki aksonal sonlanmalarından Kisspeptin salgıladığı gösterilmiştir. Kisspeptin de GnRH nöronları üzerinde bulunan GPR54 reseptörlerine bağlanarak GnRH salgılanmasını kontrol etmektedir. AVPV çekirdeğinde bulunan Kisspeptin nöronları pre-ovülasyon dönemde Lüteinleştirici Hormon (LH) salınımını kontrol etmektedir. ARC çekirdeğinde lokalize Kisspeptin nöronları GnRH nöronlarının ME'de bulunan aksonal sonlanmalarına yaptıkları projeksiyon ile LH'nin pulsatil sekresyonunu düzenlemektedir (44-49). Bu mekanizma Şekil 2.3.'te anlatılmıştır.



Şekil 2.3. Farelerde Kisspeptin nöronlarının GnRH nöronları ile ilişkisi ve HPG aksındaki rolü. Mavi Kisspeptin hücreleri, Yeşil: GnRH nöronları, Kp: Kisspeptin, NKB: Nörokinin B, DYN: Dinorfin, KISS1R: Kisspeptin reseptörü (GPR54), NK3R: Nörokinin B reseptörü, KOR: Dinorfin reseptörü, ARC: Arkuat Çekirdek, AVPV: antroventral periventricular, POA: Preoptik alan. – inhibitör etki, + stimulator etki. (Tassigny ve Colledge (4)’dan derlenmiştir.)

Ayrıca retro ve antero virüs teknolojileri ve Cre rekombinant transgenik fare hatları kullanılarak yapılan çalışmalarla KNDy nöronları hipotalamusun ARC bölgesinde bulunan Agouti-Related Peptide (AgRP) nöronları, medial preoptik çekirdek (MPON) ve ventromedial hipotalamus (VMH) gibi farklı hipotalamik çekirdeklerden monosinaptik girdiler aldığı ve bu girdilerin gonadotropin salgılanmasını etkilediği gösterilmiştir (42). Optogenetik ve elektrofizyolojik yöntemlerin kullanıldığı başka bir çalışmada da ARC Kisspeptin nöronlarının amigdala, paraventricular çekirdek (PVN), supraoptic çekirdek (SON), ventral tuberomammillary çekirdek (VTM) ve ARC çekirdekte bulunan proopiomelanocortin (POMC) nöronlarından girdiler aldığı gösterilmiştir. (50)

Kisspeptin nöronlarının beynin bir çok bölgesine projeksiyon yaptığı bilinmektedir. Radioimmunoassay (RIA) ve immünfloresan teknikleri ile yapılan mikroskopi çalışmaları göstermiştir ki Kisspeptin nöronları GnRH nöronlarına aksonal projeksiyonlar gerçekleştirmekte ve bu projeksiyonlar puberte öncesi görülmemekle birlikte puberte sonrasında kademeli olarak artmaktadır (34). 2016 yılında yayınlanan bir

çalışmada (51) ARC'de Kisspeptin ve NKB üreten nöronların SON ve PVN çekirdeklerine aksonal projeksiyonlar yaptığı gösterilmiştir. Bu nöronal fiberlerden mRNA düzeyinde NKB salgılandığı ve NKB'nin SON'da bulunan vasopressin nöronlarının elektriksel aktivitelerini arttırdığı yine bu çalışmada gösterilmiştir.

Seymour ve ark. (52) gebe sıçanlarda yaptıkları çalışmada hipotalamusun rostral periventriküler (RP3V) çekirdeğinden köken alan Kisspeptin nöronlarının (SON) bulunan oksitosin nöronlarına projeksiyon yaptıklarını, ancak bu projeksiyonların gebeliğin ilk iki safhasında neredeyse hiç görülmediğini sadece gebeliğin 3. safhasında anlamlı artış gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Ayrıca bu çalışmada Kisspeptin peptidinin SON'da bulunan nöronları oksitosin salınımı için uyardığı gösterilmiştir. Tüm bu çalışmalar Kisspeptin nöronlarının çevresel faktörlere, fizyolojik koşullara ve yaşa bağlı olarak plastisite gösterebildiğine işaret etmektedir (53).

Hellier ve ark. (54) 2018 yılında yayınladıkları çalışmasında dişi farelerde AVPV'de bulunan Kisspeptin nöronlarının erkek feromonları ile olfaktör yolak üzerinden aktive olduğunu göstermiştir. Kiss-Cre transgenik farelerin kullanıldığı bu çalışmada ayrıca Kisspeptin nöronlarının VMH çekirdeğine projeksiyon yaptığı ve burada nöronal Nitrik Oksit Sentaz (nNOS) enzimi salgılayan nöronalar ile iletişimde olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada Kisspeptin nöronlarının bu yolaklar üzerinden dişi farelerin eş seçiminde ve cinsel performanlarında bir istasyon (hub) rolü oynadığı gösterilmiştir.

Kiss-Cre transgenik dişi farelerin ve elektrofizyolojik yöntemlerin kullanıldığı başka bir çalışmada hipotalamik ARC çekirdekte bulunan Kisspeptin nöronlarının günlük besin alımının zamanlamasında, lokomotor aktivitenin sirkadiyen regülsasyonunda ve uyku düzeninde kontrol edici rol üstlendiği gösterilmiştir (55-56).

Adelosaan dönemde sosyal strese maruz bırakılan farelerin dorsomedial hipotalamik çekirdek (DMH), stria terminalisin bed çekirdeği (BNST) ve santral amigdala çekirdeği (CeA) başta olmak üzere bir çok beyin bölgesinde Taşikinin 2 (Tac2) geni tarafında ifade edilen NKB peptidinin üretilmesini ve bu peptidin üretildiği nöronlardaki nöronal aktivitenin izolasyon stres faktörüne bağlı olarak anlamlı derecede arttığı gösterilmiştir (15). Aynı çalışmada beynin farklı bölgelerindeki Tac2/NKB ekspresyonu ile sosyal izolasyona bağlı davranış değişiklikleri arasında anlamlı ilişki bulunduğu da bildirilmiştir.

Nöropeptidler, organizma için yaşamsal önem taşıyan yeme-içme, kan basıncı, kalp ritmi, vücut sıcaklığı gibi bir harmoni içerisinde devam etmesi gereken metabolik aktivitelerin düzenlenmesinde önemli rol üstlenmektedir. Bu fizyolojik dengeyi sürdürmek amacıyla ihtiyaç duyduğu davranışların (yemek ve su arama, barınma, ısınma vs.) yerine getirilmesinde, üreme fonksiyon ve davranışlarının düzenlenmesinde, organizmanın çevresi ve diğer bireyler ile olan sosyal ilişkisinin sağlanmasında nöropeptidler belirleyici rol oynamaktadır.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada yer alan deneyler Yeditepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun (YÜDHEK) 18.08.2020 tarihli ve 2020/02-18 nolu etik kurul onayı ile Yeditepe Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde (YÜDETAM) ve Yeditepe Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı Beyin Araştırmaları Laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.1. Kullanılan Deney Hayvanı

Çalışmada Jaxon Laboratory (ABD) firmasından temin edilen Kiss:Cre (Jax Lab 033169) transgenik fare hattı kullanıldı (<https://www.jax.org/strain/033169>). Bu farenin özelliği Kiss1 geni promotör bölgesinde Cre rekombinaz genini de ifade etmesi, dolayısıyla spesifik olarak sadece bu promotörü aktif olarak kullanan, Kisspeptin peptidini çokça ifade eden nöronlar, aynı zamanda Cre rekombinaz proteinini de ifade ediyor olmasıdır. Bu sistem sadece Kisspeptin nöronlarının Cre bağımlı çalışan, patojen olmayan AAV ile enfekte olmasına olanak sağlamaktadır.

Bu transgenik fare hattı Cre genini taşıyan (Kiss:Cre⁺) erkek fareler ile yabancı tip C57BL/6 dişi farelerin çiftleştirilmesi ile YÜDETAM'da üretildi. Fareler 12 saat aydınlık/karanlıkta, 21 ± 1 °C sıcaklıkta, *ad libitum* olarak serbest beslendikleri ortamda tutuldular. Doğan yavruların Kiss:Cre⁺ olup olmadığı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile belirlendi. Detaylar ilerleyen bölümlerde anlatıldı.

3.1.1. Deney Grupları ve Deney Planı

Çalışmada deney modeli için 3 hafta süren emzirme sonrası sosyal izolasyon (PSWI) modeli oluşturuldu. Transgenik fareler doğumdan 15-20 gün sonra (P15-P20) genotiplendi. P21'de izolasyon modeline başlandı. 3 hafta sonra davranış deneyleri gerçekleştirildi. Davranış deneyi sonrası farelere İntra-Kraniyel AAV enjeksiyonları gerçekleştirildi. 15 günlük virüs enfeksiyon sonrası ex-vivo olarak elektrofizyoloji deneyleri ve post-mortem olarak immüno floresan boyama ile projeksiyon analizi için konfokal görüntüleme deneyleri gerçekleştirildi. Çalışmada oluşturulan deney grupları, gruplarda kullanılan hayvan sayıları ve çalışma zaman akışı Tablo 3.1.'de ve Şekil 3.1.'de gösterildi.

Tablo 3.1. Çalışmada oluşturulan deney grupları ve hayvan sayıları.

Grup No	Deney Grubu	İzole Grup (n) (Dişi + Erkek)	Sosyal Grup (n) (Dişi + Erkek)
1	Lokomotor Aktivite	7+7=14	8+4=12
2	Beslenme	7+7=14	9+7=16
3	Yükseltilmiş Artı Labirent	6+0=6	5+0=5
4	Elektrofizyoloji	4+3=7	4+3=7
5	İmmüfloresan	5+0=5	4+0=4
6	Projeksiyon	3+0=3	3+0=3

P0	P15-P20	P21-P42	P42-P50	P50-P55	P65-P70
Farelerin Doğumu	Genotipleme	İzole ve Sosyal Modelin Oluşturulması (PWSI)	Davranış Deneyleri	Intra-Hipotalamik AAV Enejsiyonları	Elektrofizyoloji İmmüfloresan ve Görüntüleme Deneyleri

Şekil 3.1. Çalışma planı ve zaman akışı.

3.1.2. Farelerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Cre Genotiplerinin Belirlenmesi

P15-P20 arasında yavru fareler bayıltma kabı içerisinde izofluran inhalasyon anteziği ile bayıltılarak farelerin kulaklarından 1-2 mm uzunluğunda doku bistüri ile kesilerek alındı. PZR deney tüpüne alınan dokuların üzerine 100 µl alkali lizis çözeltisi (25 mM NaOH, 0,2 mM EDTA, pH 12.4) eklendi. Doku parçaları çözelti içerisinde tamamen gömüldükten sonra tüpler 98 °C’de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tüplerin içine 100 µl nötralizasyon çözeltisi (40 mM Tris-HCl, pH 7.4) pipetaj yapılarak eklendi. Tüpler 4000 rpm’de 4 dakika santrifüj edildi. Santrifüz sonrasında karışımın süpernatant (DNA içeren) kısmı yeni bir tüpe aktarıldı.

İzole edilen genomik DNA ile PZR işlemine geçildi. Cre geninin çoğaltılması için gerekli primerler (Tablo 3.2.) Jax Lab. firmasından öğrenildi ve Sentromer (İstanbul)

firmasında sentezletilip satın alındı. PZR için gerekli master karışım Tablo 3.3.’te belirtildiği şekilde hazırlandı ve PZR tüplerine 10,5 µl master karışımdan ve üzerine 2 µl genomik DNA eklendi. Negatif kontrol için 2 µl PZR standart su eklendi. Pozitif kontrol için Jax Lab.’dan gelen damızlık fareden izole edilen DNA eklendi. Bu işlemlerin tamamı buz içerisinde yapıldı. PZR tüpleri termal döngü cihazına (Multigene Optimax, TC9610) yerleştirildi ve Tablo 3.4.’te belirtilen koşullarda PZR cihazı çalıştırıldı.

Tablo 3.2. Kiss:Cre⁺ farelerin genotiplenmesinde kullanılan Cre primer dizileri

Primer Tipi	Dizilim 5' → 3'
Transgene Forward	5' GCG GTC TGG CAG TAA AAA CTA TC 3'
Transgene Reverse	5' GTG AAA CAG CAT TGC TGT CAC TT 3'

Tablo 3.3. Kiss:Cre⁺ farelerinin genotiplenmelerinde kullanılan PZR karışımı

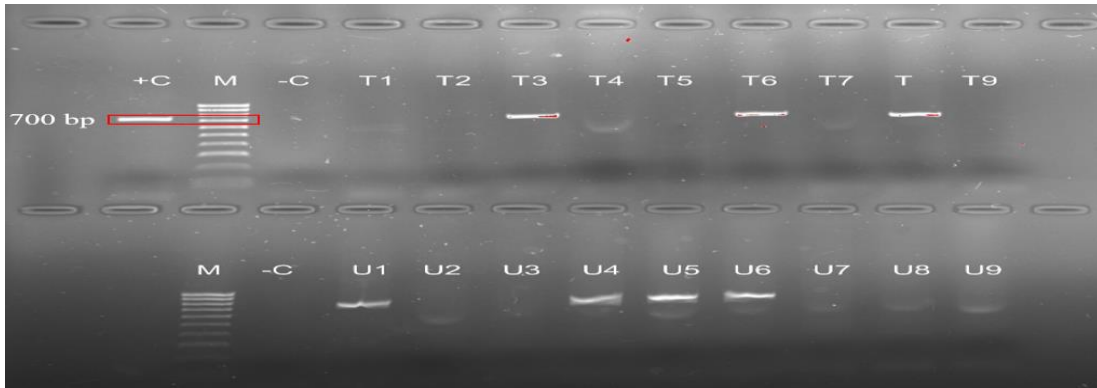
Solüsyon	Hacim (µl)
Master Mix (dNTP,Taq Polimeraz) (2x)	6.25
Forward Primer	0.5
Reverse Primer	0.5
ddH ₂ O	3.25
DNA	2

Tablo 3.4. Kiss:Cre⁺ farelerinin genotiplenmelerinde kullanılan PZR termal döngü koşulları

Sıcaklık	Süre
95 °C	30 sn
95 °C	30 sn
60 °C	30 sn
68 °C	60 sn
68 °C	5 dk

38
Tekrar

PZR devam ederken 1 X Tris-Borik asit- EDTA (TBE) (40 mM Tris-Cl, 45 mM borik asit, 1 mM EDTA) içerisinde %2 agaroz hazırlandı. DNA'nın görüntülenebilmesi için 100 ml jel içerisine 5 µl EzView Stain (Biomatik, A4205, Kanada) eklendi. Donan jel 0,5 X TBE içeren elektroforez tankına (BioRad, ABD) yerleştirildi. PZR ürünleri 6X jel yükleme boyası (NEB, B7024S, İngiltere) ile 1:6 oranında karıştırıldı. Jel kuyucuklarına 10 µl PZR ürünü ve ilk kuyucuğa 3 µl DNA ladder (NEB, N3232, İngiltere) yüklendi. Tank kapağı kapatılarak 120 V 300 mA akım 20 dakika uygulanarak elektroforez işlemi tamamlandı. Elektroforez sonrası jel Biorad Chemidoc sistemi ile görüntülendi. Cre geni 700 bp seviyesinde görüntülenenen örnekler (Şekil 3.2.) Cre⁺ olarak işaretlenerek, doku alınan fareler deney gruplarına dahil edildi.

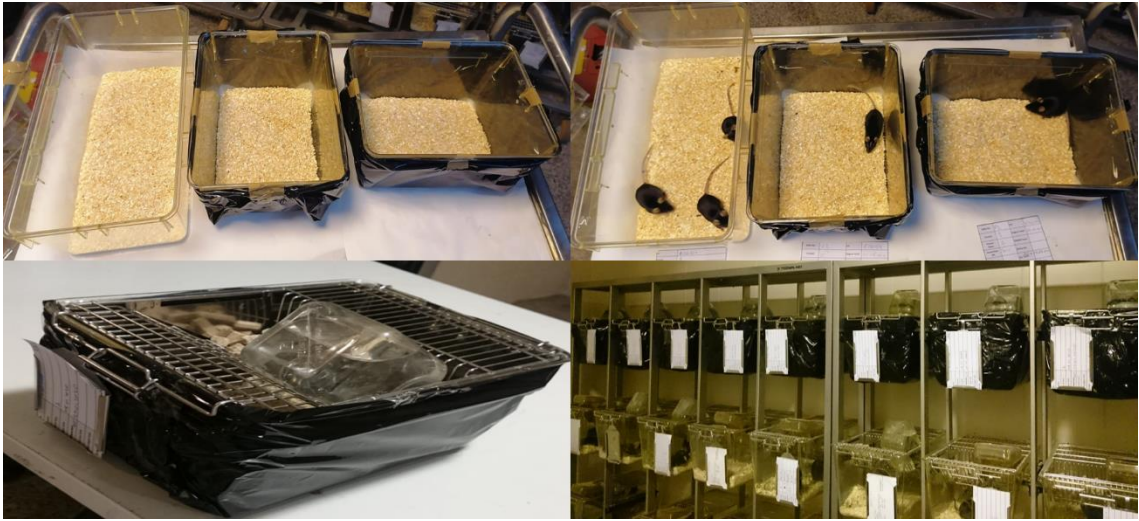


Şekil 3.2. Kiss:Cre⁺ farelerinin genotiplenmelerinde elde edilen PZR jel görüntüsü.

3.2. Deney Modelinin Oluşturulması (PWSI)

P15-P20 arasında genotiplenerek Kiss:Cre⁺ olduğu tespit edilen fareler emzirme sonrası (Post Weaning-PW) ayrı ayrı dişi ve erkek olarak sosyal ve izole gruplara ayrıldı.

Sosyal gruptaki fareler P21-P25’de (6 gr ağırlığın altında olan farelerin tek başına beslenmesinde problem gözlemlendiği için kilo almaları için P25 beklendi) hemcinsleri ile bir kafeste 2 ya da 3 fare olacak şekilde standart fare kafeslerine (30X15 cm) alındılar. İzole gruptaki fareler ise bir kafese 1 fare olacak şekilde küçük (10X10 cm) kafeslere alındılar. İzole kafesler siyah jelatin ile sarılarak opak hale getirildiler. (Şekil 3.3.) Fareler 12 saat aydınlık / karanlık döngüde, 21 °C sıcaklıkta, *ad libitum* olarak beslenerek bu kafeslerde 3 hafta boyunca tutuldu. Model başlangıcında farelerin kiloları tartıldı ve kilo alımları takip edildi.



Şekil 3.3. PWSI modeli oluşturulan kafes sistemleri

3.3. Davranış Deneyleri

Erken dönem sosyal izolasyona maruz bırakılan farelerin lokomotor aktivite ve beslenme davranışları özel kafeslerde gözlemlendi. Sosyal izolasyona maruz bırakılan farelerin anksiyeteleri yükseltilmiş artı testi ile ölçüldü. Farelerin kafatası gelişimlerinin anatomik olarak tamamlanmamasından ve operasyonun davranışları etkilemesini önlemek amacıyla İntra-Hipotalamik AAV enjeksiyonlar davranış deneylerinden sonra yapıldı.

3.3.1. Lokomotor Aktivite Davranışı Takibi

Lokomotor aktivite ve yeme davranışı takip edilecek fareler sosyal ve izole kafeslerde 3 hafta geçirdikten sonra P42-P45'ten sonra davranış kafeslerine alındılar. Davranış kafesleri (Şekil 3.4.) demonte olarak satın alındı (Tabelacınız, İstanbul). Bu kafesler farelerin yeme ve içme davranışlarını manuel olarak takip etme, kamera ve hareket sensörü monte edilebilme özelliğindedir. Kafeslerin montajı laboratuvarında gerçekleştirildi.



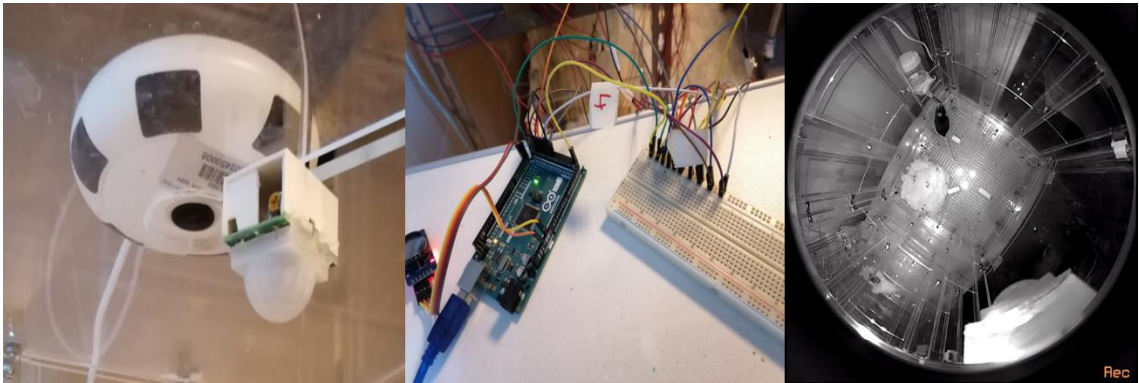
Şekil 3.4. Lokomotor ve beslenme davranışlarının takip edildiği davranış kafesleri

Fareler kafeslere birerli konuldu, opak parçalar ile izole gruptaki farelerin kafeslerinin izolasyonu gerçekleştirildi. (Şekil 3.5.) Tüm farelerin davranışları takip edilmeden önce, ortama alışmaları için 2 gün beklendi.



Şekil 3.5. Lokomotor ve beslenme davranışlarının takip edildiği davranış kafes sistemleri

Farelerin lokomotor davranışlarının ölçümü için kafeslere gece görüş özelliği olan kablosuz kamera ve Kızılötesi (Passive Infrared- PIR) (Hc-Sr501, Çin) hareket sensörleri yerleştirildi. Bu sensörün özelliği hareket algılama kapasitesinin çok hassas olmasıdır. Saniyede bir hareket algılayabilmektedir. Hareket sensörlerinin verileri Arduino elektronik kartı ile bilgisayara aktarıldı. (Şekil 3.6.) Kameralar ile 24 saat boyunca kayıt yapıldı.



Şekil 3.6. Davranış kafeslerine monte edilen kamera ve PIR sensörleri, sensörün bağlı olduğu Arduino elektronik kart bağlantısı ve kameradan alınan kafes görüntüsü.

Hareket sensörleri Arduino (versiyon 1.8.12) yazılım programı ile entegre edilerek çalıştırıldı. Bu programda yazılan kod (Tablo 3.5.) ile farelerin hareketliliği her saniye ikili kod (binary data) olarak 24 saat boyunca bilgisayar ortamına aktarılıp matematiksel ifadesi sağlandı. (Şekil 3.7.) 5 gün boyunca farelerin kafeste lokomotor aktiviteleri (Homa Cage Activity) takip edilip kayıt edildi.

Tablo 3.5. Hareket sensöründen alınan verilerin ikili kod olarak alınmasını sağlayan Aruino yazılım kodu.

```
#include <Wire.h>
#include <DS3231.h>
#include <Wire.h>
#include "ds3231.h"
int pir1=30;
int val1=0;
DS3231 rtc(SDA, SCL);
void setup() {
  Serial.begin(9600);
  pinMode(pir1, INPUT);
  rtc.begin();
  //rtc.setTime(23, 12, 00);
  //rtc.setDate(06, 05, 2020);}
void loop() {
  val1= digitalRead(pir1);
  Serial.print(val1);
  Serial.print("\t");
  Serial.print (rtc.getTimeStr());
  Serial.print ("--");
  Serial.print (rtc.getDateStr());
  Serial.print("\n");
  delay(1000);}
```

Scp10	F2	V2	U1	U2	U3	Scp4	Scp2	Scp14	0	0	0
0	0	0	0	1	1	0	0	0	16:51:20--07.11.2020		
0	0	0	0	1	1	0	0	0	16:51:21--07.11.2020		
0	0	0	0	1	1	0	0	0	16:51:22--07.11.2020		
0	0	0	0	1	1	0	0	0	16:51:23--07.11.2020		
0	0	0	0	1	1	0	0	0	16:51:24--07.11.2020		
0	0	0	0	1	0	0	0	0	16:51:25--07.11.2020		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	16:51:26--07.11.2020		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	16:51:27--07.11.2020		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	16:51:28--07.11.2020		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	16:51:29--07.11.2020		
0	0	0	0	0	1	0	0	0	16:51:30--07.11.2020		
0	0	0	0	0	1	0	0	0	16:51:31--07.11.2020		
0	0	0	0	0	1	0	0	0	16:51:32--07.11.2020		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	16:51:33--07.11.2020		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	16:51:34--07.11.2020		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	16:51:35--07.11.2020		
0	0	0	0	0	1	0	0	0	16:51:36--07.11.2020		
0	0	0	0	1	1	0	0	0	16:51:37--07.11.2020		
0	0	0	0	1	1	0	0	0	16:51:38--07.11.2020		
0	0	0	0	1	1	0	0	0	16:51:39--07.11.2020		
0	0	0	0	0	1	0	0	0	16:51:40--07.11.2020		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	16:51:41--07.11.2020		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	16:51:42--07.11.2020		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	16:51:43--07.11.2020		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	16:51:44--07.11.2020		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	16:51:45--07.11.2020		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	16:51:46--07.11.2020		

Şekil 3.7. Arduino yazılımı ile hareket sensörlerinden elde edilen ikili kod verileri temsili görüntüsü.

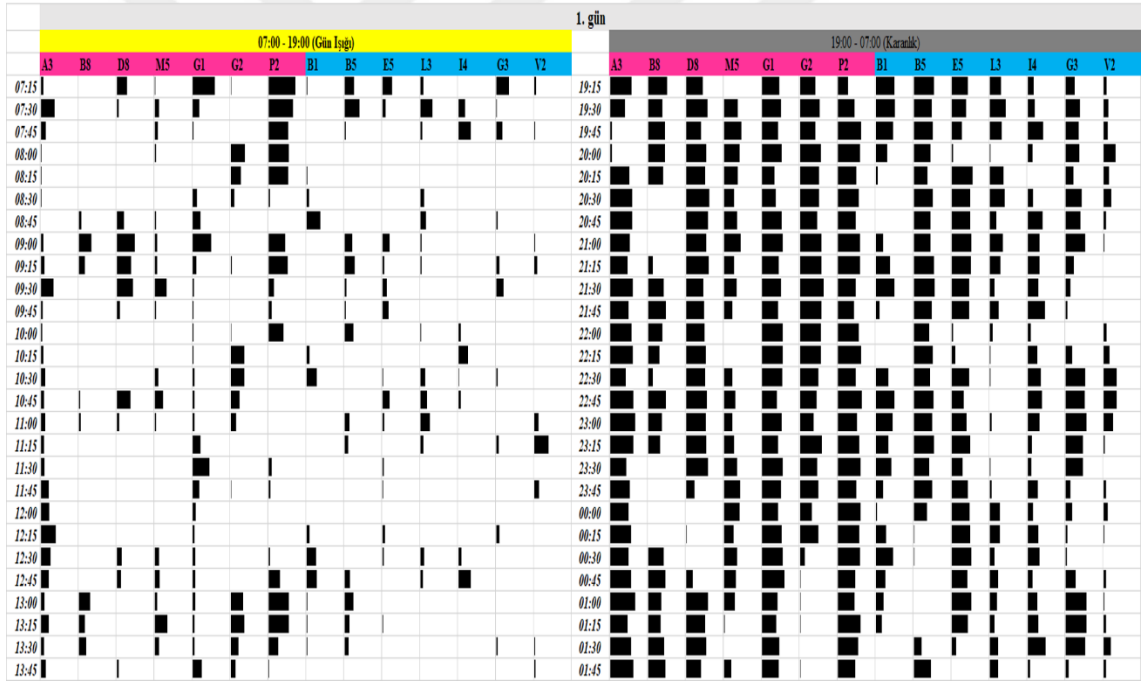
Her bir fareden 24 saat boyunca 86400 adet veri kayıt edildi. Bu veriler excell dosyasına aktarıldı. Her bir farenin verileri excell formulasyonu ile 15 dakikalık segmentler haline getirildi. Bunun için aydınlık fazın (07:00) başlamasıyla her 15 dakika içindeki “1” adeti toplandı. (Şekil 3.8.) 24 saatlik veri aydınlık ve karanlık olarak ikiye bölündü ve “Two-Way rm ANOVA” istatistiksel testi kullanılarak analiz edildi (55). Analiz detayları bulgular kısmında belirtildi. Lokomotor aktivite davranış verisinin görsel olarak ifade edilebilmesi için 15 dakikalık veriler kullanılarak excell programında “Aktogram” oluşturuldu. Bunun için excell programının “koşullu biçimlendirme” özelliği kullanıldı. Excell dosyasına aktarılan verilerin tamamı seçilerek en küçük değer “0” en yüksek değer “1000” olarak atandı ve veri çubukları oluşturuldu. Oluşan grafik resim olarak kopyalandı ve düzenleme için “power point” programına aktarıldı (Şekil 3.9.), (57).

Putty log 2020.07.01 17:15:37																	
M5	L3	G1	I4	G2	G3	L1	J6	J2	J1	L2	1	1	1				
1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	17:04:33--01.07.2020						
0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	17:04:34--01.07.2020						
0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	17:04:35--01.07.2020						
0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	17:04:36--01.07.2020						
1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	17:04:37--01.07.2020						
1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	17:04:38--01.07.2020						
1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	17:04:39--01.07.2020						
0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	17:04:40--01.07.2020						
0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	17:04:41--01.07.2020						
0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	17:04:42--01.07.2020						
0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	17:04:43--01.07.2020						
0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	17:04:44--01.07.2020						
0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	17:04:45--01.07.2020						
0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	17:04:46--01.07.2020						
1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	17:04:47--01.07.2020						
1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	17:04:48--01.07.2020						
1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	17:04:49--01.07.2020						
1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	17:04:50--01.07.2020						
0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	17:04:51--01.07.2020						
0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	17:04:52--01.07.2020						
0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	17:04:53--01.07.2020						
0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	17:04:54--01.07.2020						
0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	17:04:55--01.07.2020						
1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	17:04:56--01.07.2020						
1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	17:04:57--01.07.2020						
1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	17:04:58--01.07.2020						
1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	17:04:59--01.07.2020						
1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	17:05:00--01.07.2020						
1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	17:05:01--01.07.2020						
1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	17:05:02--01.07.2020						
1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	17:05:03--01.07.2020						
1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	17:05:04--01.07.2020						
1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	17:05:05--01.07.2020						
0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	17:05:06--01.07.2020						

19:15	0	558	23	76	0	247
19:30	0	448	306	318	260	233
19:45	0	476	369	84	305	292
20:00	0	522	23	483	208	265
20:15	0	477	6	352	302	12
20:30	0	456	245	72	472	60
20:45	0	26	210	6	140	292
21:00	0	475	381	339	464	262
21:15	0	534	200	268	351	408
21:30	0	548	79	9	511	450
21:45	0	513	0	15	297	308
22:00	0	385	7	255	472	394
22:15	0	506	2	384	508	262
22:30	0	474	2	295	256	345
22:45	0	462	0	177	10	227
23:00	0	380	54	6	501	176
23:15	0	481	56	0	342	9
23:30	0	501	115	13	536	2
23:45	0	521	30	6	518	85
00:00	0	509	50	307	356	401
00:15	0	477	7	287	463	248
00:30	0	472	7	406	528	460
00:45	0	252	26	340	496	232
01:00	0	110	0	186	476	420
01:15	0	4	2	53	315	310
01:30	0	4	33	2	505	294
01:45	0	2	62	5	248	345
02:00	0	3	51	126	3	394
02:15	0	141	133	412	0	245
02:30	0	415	56	387	0	321
02:45	0	486	11	195	0	2
03:00	0	566	88	354	86	0
03:15	0	464	255	337	383	0
03:30	0	312	224	382	474	0
03:45	0	300	269	89	422	134
04:00	0	2	289	0	519	275
04:15	0	6	96	4	542	445
04:30	0	6	0	5	302	283
04:45	0	2	42	277	467	320
05:00	0	89	0	291	151	399
05:15	0	514	0	479	10	195
05:30	0	470	0	394	10	363
05:45	0	377	0	580	0	473
06:00	0	575	59	405	185	86
06:15	0	379	11	100	517	296
06:30	0	414	0	56	445	162
06:45	0	619	0	4	293	0
07:00	0	163	3	5	2	5

Şekil 3.8. Bir fareden 24 saat boyunca alınan 86400 adet veri 15 dakika / 12 saat lik segmentlere çevrildi.

	1. gün																															
	07:00 - 19:00 (Gün Işığı)																19:00 - 07:00 (Karanlık)															
	A3	B8	D8	M5	G1	G2	P2	B1	B5	E5	L3	I4	G3	V2		A3	B8	D8	M5	G1	G2	P2	B1	B5	E5	L3	I4	G3	V2			
07:15	68	0	284	23	612	9	735	23	267	256	77	0	343	47	19:15	583	525	462	3	482	422	275	508	556	435	319	156	242	78			
07:30	385	0	55	117	185	7	678	3	410	89	333	175	11	8	19:30	409	386	586	382	524	534	456	520	486	398	435	195	396	132			
07:45	125	0	0	75	14	6	538	3	37	4	55	347	164	15	19:45	44	456	414	472	435	428	645	475	523	275	322	428	368	113			
08:00	9	0	0	31	0	394	559	0	0	3	2	0	7	8	20:00	49	456	560	432	543	581	606	305	456	31	10	129	369	324			
08:15	21	0	3	0	8	280	533	13	0	7	5	0	0	2	20:15	530	408	526	374	346	532	502	49	374	578	374	0	208	147			
08:30	18	0	3	2	115	101	26	67	0	5	103	0	0	0	20:30	604	0	639	278	380	532	572	2	532	506	404	151	443	207			
08:45	4	71	190	28	209	0	0	375	0	0	141	0	27	2	20:45	603	0	600	366	543	471	489	3	465	515	174	412	414	61			
09:00	61	349	499	61	506	3	458	6	207	192	27	0	0	20	21:00	540	0	565	464	568	587	612	190	461	542	357	331	541	11			
09:15	99	171	397	70	99	35	527	2	272	51	38	0	82	84	21:15	483	132	628	276	461	595	605	401	553	517	292	325	223	0			
09:30	343	0	441	336	27	8	153	0	48	122	0	0	198	0	21:30	622	431	479	343	528	649	485	506	572	481	125	294	125	0			
09:45	57	0	90	31	23	5	86	0	35	171	3	0	5	7	21:45	516	490	486	230	437	598	444	106	498	470	244	479	56	6			
10:00	39	0	0	0	22	12	414	0	239	0	9	66	0	0	22:00	597	386	508	0	572	576	573	0	433	30	81	76	0	86			
10:15	73	0	3	5	17	379	0	75	6	0	0	255	0	0	22:15	620	305	549	0	571	581	644	5	518	106	24	267	185	167			
10:30	111	0	5	96	48	378	0	282	3	11	129	16	33	5	22:30	422	125	518	234	561	513	491	341	437	473	9	353	534	368			
10:45	90	25	369	234	50	245	4	0	0	200	174	60	0	4	22:45	639	484	576	317	409	455	649	505	536	329	0	387	521	361			
11:00	109	50	62	28	50	142	0	0	137	49	268	0	5	120	23:00	683	373	537	230	539	382	527	455	508	418	42	336	568	270			
11:15	81	0	2	8	206	7	0	0	98	2	87	0	59	389	23:15	637	328	556	280	449	601	591	346	554	507	6	119	469	27			
11:30	93	0	3	0	467	0	87	0	0	27	0	0	0	0	23:30	438	5	611	353	581	483	616	420	420	291	10	105	473	8			
11:45	207	0	0	2	186	13	41	0	0	12	6	0	0	134	23:45	549	0	257	441	531	508	515	193	515	437	55	280	128	70			
12:00	332	0	2	3	77	3	0	0	0	3	2	0	0	4	00:00	506	0	2	420	447	325	618	37	353	492	286	146	182	111			
12:15	416	0	2	3	54	7	3	84	0	58	6	0	77	5	00:15	581	0	10	266	534	511	589	283	21	512	279	291	56	17			
12:30	258	0	128	116	68	4	27	258	2	40	91	74	7	0	00:30	512	433	8	365	570	126	605	482	19	543	135	324	37	8			
12:45	213	4	121	124	67	7	315	276	140	0	64	344	0	0	00:45	570	475	188	332	624	9	472	261	0	423	226	133	277	63			
13:00	91	314	0	60	72	345	562	21	247	2	0	5	0	0	01:00	688	356	608	295	430	13	456	208	2	533	190	263	568	20			
13:15	217	171	2	352	45	385	556	11	133	14	0	0	0	0	01:15	469	339	519	15	391	11	626	158	0	447	127	303	566	66			
13:30	84	189	5	113	46	209	269	14	110	0	0	0	34	15	01:30	580	449	560	3	481	2	552	0	215	120	234	484	541	201			
13:45	123	0	56	0	243	133	11	0	0	0	0	0	0	33	01:45	643	483	418	190	452	9	474	0	473	0	227	69	76	67			



Şekil 3.9. Arduino verilerinden oluşturulan “aktogram” örneği. 1 gece ve 1 gündüz verisidir. Maviler erkek, pembeler dişi farelerin verilerini temsil etmektedir.

Lokomotor aktivite davranışının takibi için kullanılan kablosuz kameralar ile 10ar dakikalık parçalar halinde kayıt yapıldı. Bu kayıtlar günlük olarak bilgisayar ortamına aktarıldı ve birleştirildi. 5 günlük davranış kaydı bittikten sonra kamera görüntüleri ile hareket sensöründen alınan verilerin uyumluluğu incelendi. Video görüntüleri Noldus EthoVision XT 15.0 davranış programında okutulurken farelerin gündüz ve gece kafes içerisindeki lokomotor aktivitelerinin ısı haritası (Heatmap) oluşturuldu.

3.3.2. Beslenme Davranışı Takibi

Farelerin beslenme davranışları 24 saatlik periyotlarda tartılarak takip edildi. Hergün saat 16:00 – 17:00 arası 9-10 gr normal yem tartılarak kafeslerin içine bırakıldı. Ertesi gün aynı saatte artan yem miktarı tartıldı. Davranış kafesinin altlık kısmına dökülen toz yemler de ayrıca tartıldı. Katı ve toz toplam artan yem miktarı 24 saat önce verilen yem miktarından çıkarılarak farelerin günlük yem tüketimi tespit edildi. 2 günlük alışma sürecini takip eden 5 gün boyunca farelerin besin tüketimi ölçüldü.

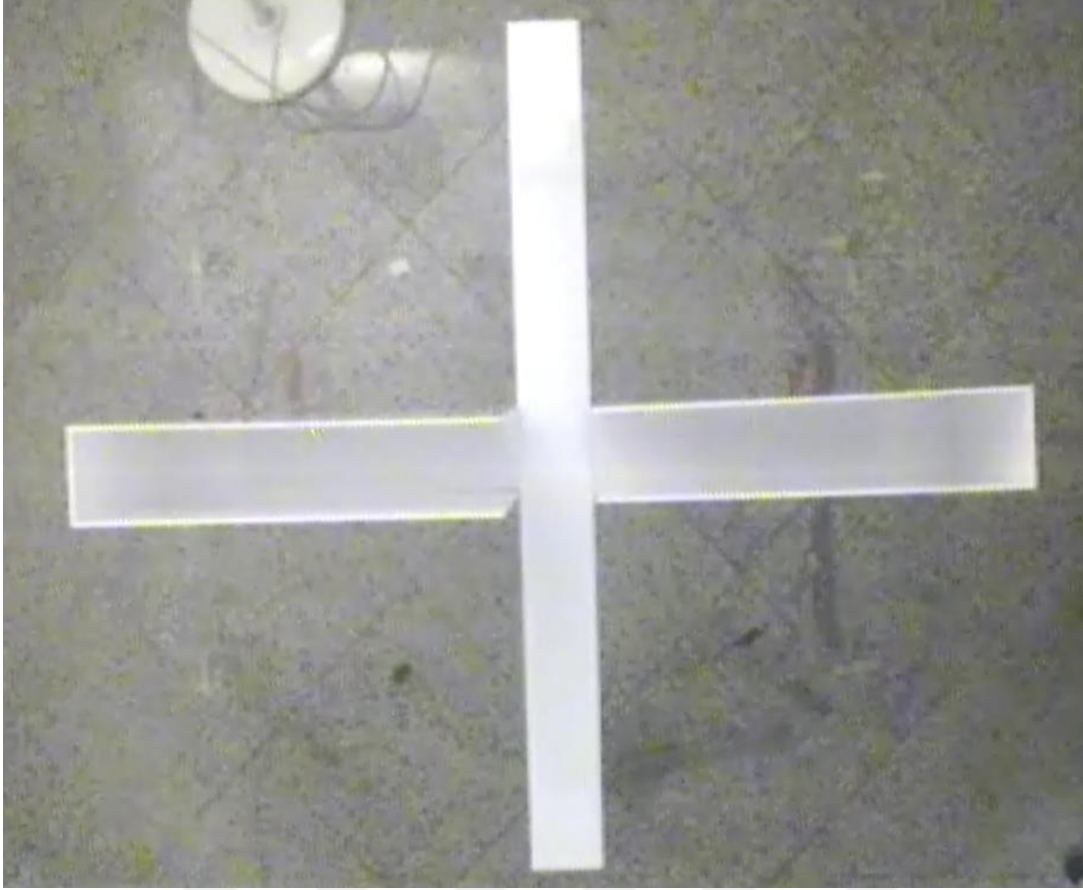
Farelerin anksiyetelerini yeme davranışından gözlemleyebilmek için yem yerken toz haline dönüşüp kafesin altına düşen toz miktarı da günlük olarak tartıldı.

Farelerin beslenme verileri excell dosyasına aktarılarak grafik oluşturuldu. Veriler “Two-Way ANOVA ve Tukey’s test” istatistiksel testleri ile analiz edildi. Analiz detayları bulgular kısmında belirtildi.

Deneyden çıkan fareler görüntüleme ve elektrofizyoloji deneyleri için izolasyon ortamlarına geri konuldu.

3.3.3. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi

Anksiyete davranışları ölçülecek fareler sosyal ve izole kafeslerde 3 hafta geçirdikten sonra P42-P45’ten sonra fareler davranış deneyine alındılar. Farelerin anksiyetelerini ölçmek için artı labirent testi (Elevated Plus Maze – EPM) uygulandı (58). Bu testte artı (+) şeklindeki bir platform 30 X 5 cm uzunluğunda 2 kol açık bırakılarak diğer 2 kol yanları kapalı olacak şekilde yerden 1 metre yükseliğe kuruldu. (Şekil 3.10.) Fareler deneye başlamadan 1 saat önce testin yapılacağı odaya getirilip ortama alışması sağlandı. Fareler deneyin başlangıcında labirentin merkezine bırakılarak 5 dakika boyunca farelerin labirentin kollarında geçirdiği süre Noldus Etho Vision 13.1 davranış takip programı ile ölçüldü. Veriler “t test” istatistiksel testi ile analiz edildi. Analiz detayları bulgular kısmında belirtildi. Aynı program kullanılarak farelerin labirentteki davranışlarının ısı haritları oluşturuldu.

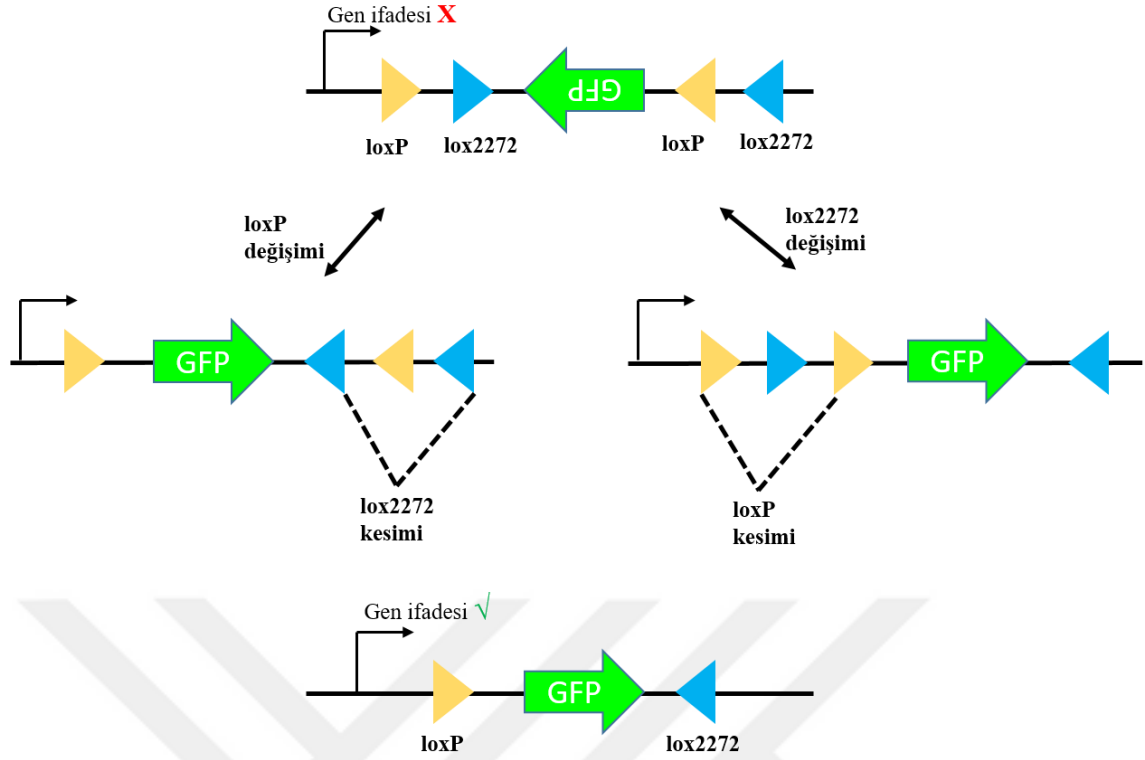


Şekil 3.10. Anksiyete deneyinde kullanılan yükseltilmiş artı labirenti.

Deneyden çıkan fareler görüntüleme ve elektrofizyoloji deneyleri için izolasyon ortamlarına geri konuldu.

3.4. Stereotaksik İntra-Hipotalamik AAV Enkesiyonlar

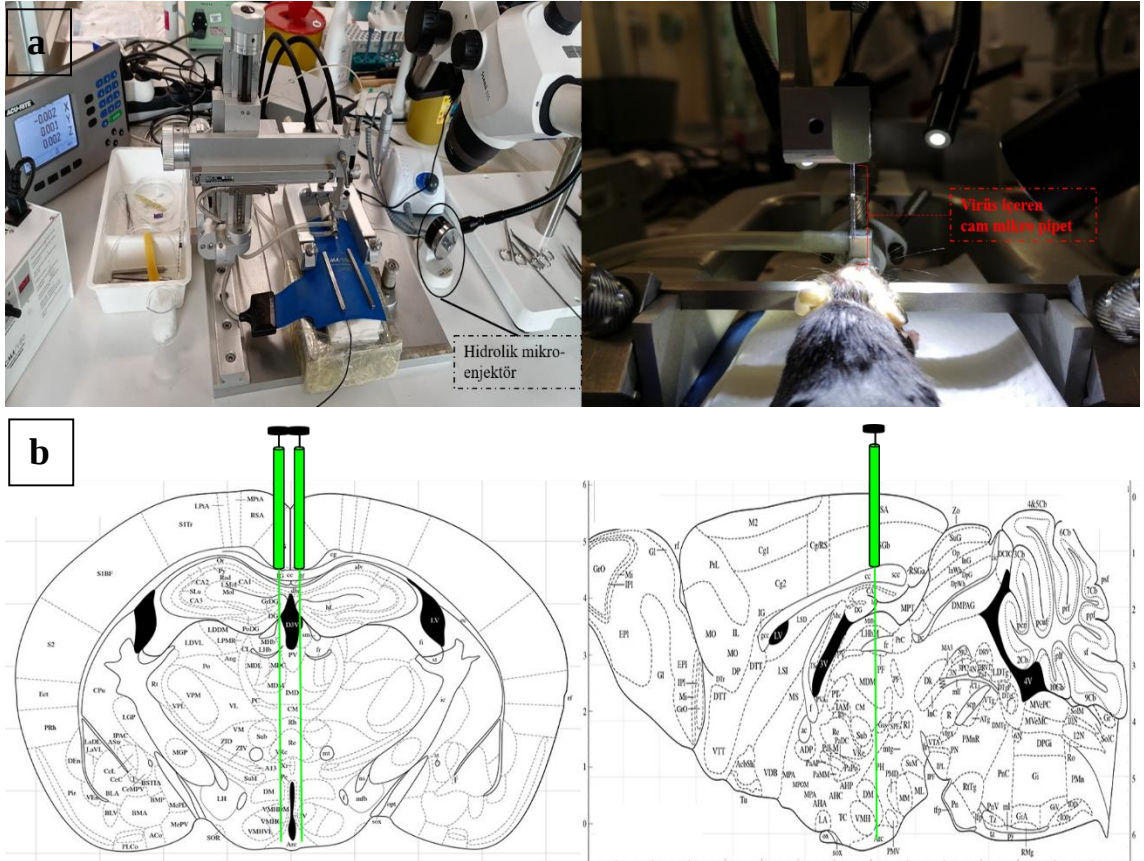
AAV-CAG-Flex-GFP virüsü University of North Carolina, Gene Therapy Center, Vector Core (ABD) laboratuvarlarından satın alındı. Bu virüsün özelliği genetik materyal içeriğinde GFP geni ile beraber Cre enziminin bağlandığı *LoxP Lox2272* genlerini de içermesidir. Bu sistem enjekte edilen virüsün sadece Cre rekombinant enzimini ifade eden nöronları, enfekte etmesini ve GFP'nin sadece bu nöronlarda ifade edilmesine imkan sağlamaktadır. (Şekil 3.11.) Bu çalışmada AAV-CAG-Flex-GFP enjekte edilen farelerin Kisspeptin nöronlarının somalarında ve aksonları boyunca GFP ifade edildi.



Şekil 3.11. Cre enzimi varlığında gerçekleşen Cre-Lox sisteminin çalışma mekanizması.

Virüs enjeksiyonları izofluran gaz anestezisi altında fare stereotaksik cihazında (David Kopf Instruments, ABD) manuel hidrolik mikro-enjektör (Narishige, Japonya) kullanılarak gerçekleştirildi. (Şekil 3.12.a.) Enjeksiyon işlemi için davranış deneylerini bitiren fareler hafif izofluran anestezisi altında stereotaksik çerçeveye yerleştirildiler. Farenin çenesi sabitlendikten sonra solunabilir oksijen ile birlikte % 2 izofluran verilerek fare derin anestezide alındı ve operasyon boyunca oksijen ile birlikte anestezinin derinliğine göre % 1 - 1,5 aralığında izofluran verildi. Farenin anestezisi ayak kısırtma refleksi ile test edildi ve operasyon boyunca solunumu takip edildi. Derin anestezide giren farenin kafa taşı kulak çubukları ile sabitlendi ve kafa derisi antiseptik ile temizlendikten sonra makas ile kesi açıldı. Kafa taşı kemiği soğuk Hidrojen Peroksit (H_2O_2) ve serum fizyolojik (SF) ile temizlendi. Mikro pipet ile kafatası üzerinde Bregma - Lambda noktaları belirlendi ve iki nokta arasındaki mesafe ölçüldü. Hipotalamik ARC referans koordinatları bregmadan 1,48 mm posteriyor, $\pm 0,27$ mm lateral ve 5,75 mm vertikal olarak fare beyin atlasından belirlendi (59) (Şekil 3.12.b.) ve enjeksiyon yapılan farenin Bregma – Lambda mesafesine göre oranlama yapılarak her fare için hesaplandı. Kafatası üzerinde belirlenen enjeksiyon noktası cerrahi matkap ile delindi. Enjeksiyon yapılacak cam mikro pipet (Wiretro, ABD) pipet çekme cihazı (Narishige, Japonya) ile hazırlandı.

Mikro pipetin içeri si mineral yağ ile dolduruldu ve mikro pipet hidrolik mikro manipulatörün pistonuna yerleştirildi. Mikro pipet stereotaksi cihazına yerleştirilerek içerisine yaklaşık 300 nl virüs çekildi. Bregma noktasında tekrar koordinat sıfırlaması yapılarak hesaplanan koordinatlara gidildi. Vertikalde belirlenen koordinata ulaşılınca 100 nl virüs yaklaşık 5 dakikada verildi. Virüs enjekte edildikten sonra mikro pipet çıkarılmadan 15 dakika virüsün difüzyonu için beklendi. Sonrasında mikro pipet kademeli olarak yaklaşık 5 dakikada beyin içerisinden çıkarıldı. Virüs enjeksiyonu bilateral olarak gerçekleştirildi. (şekil 3.12.b.) Enjeksiyon bittikten sonra kesi bölgesi 4.0 ipek cerrahi iplik ile dikildi. Dikilen bölge antiseptik ile temizlendikten sonra fare ısıtıcı tabla üzerine alınarak anesteziden uyanması beklendi. Enjeksiyon sonrası virüsün Kisspeptin nöronlarını efekte ederek GFP'nin üretilmesi için fareler 10 gün daha izolasyon koşullarına alındı.



şekil 3.12. a- AAV enjeksiyonlarında kullanılan stereotaksik sistem. b- Hipotalamik arkuat çekirdeğe AAV bilateral enjeksiyon.

3.5. Kisspeptin Nöronlarının Elektrofizyolojik Özelliklerinin Araştırılması

Davranış deneylerini tamamlayıp AAV-Flex-GFP enjeksiyonu gerçekleştirilen farelerde elektrofizyoloji deneylerine geçildi. Bu aşamada erken dönem sosyal izolasyonun Kisspeptin nöronlarının elektrofizyolojisini nasıl etkilediği araştırıldı. İzole ve sosyal dişi ve erkek farelerin Kisspeptin nöronlarından, ex-vivo olarak gevşek yalıtımlı (loose seal) yama kısılacı (Patch Clamp) tekniği kullanılarak spontane aksiyon potansiyel kaydı alındı. Tüm kayıtlar öğleden önce yaklaşık aynı saatte gerçekleştirildi.

3.5.1. Ex-vivo Beyin Kesitlerinin Hazırlanması

Elektrofizyoloji deneylerinde kayıt alınacak kesitlerin hazırlanması ve kayıt alınması için 3 farklı yapay omur ilik solüsyonu (aCSF) kullanıldı (Tablo 3.6.) Tüm solüsyonlar hazırlama aşamasında ve kullanılırken %95 O₂ %5 CO₂ (karbojen) gazı ile gazlandı. Kardiyak perfüzyon, beyin kesiti alınması ve toparlanma (recovery) aşamalarında NMDG-HEPES-aCSF kullanıldı. Bekleme aşamasında HEPES-Holding aCSF solüsyonu kullanıldı. Kayıt aşamasında ise Recording-aCSF solüsyonu kullanıldı. (60)

AAV enfeksiyon süresini dolduran farelere izofluran ile anesteziye alındıktan sonra karbojen gazı ile gazlanmış ve soğutulmuş NMDG-HEPES-aCSF solüsyonu (Tablo 3.6.) ile kardiyak perfüzyon yapıldı. Kardiyak perfüzyon işleminde fare izofluran anestezisi altında diseksiyon aparatına sabitlendikten sonra farenin batin bölgesinden başlayan kesi ile göğüs kafesi açıldı. Abdominal arter klemlendi. Kalbin sol ventrikülünün apeksine perfüzyon solüsyonunun iğnesi ile girildi ve sağ atriyumuna kesi açıldı. Şırınga ile 20 ml perfüzyon sıvısı verilerek perfüzyon tamamlandı.

Perfüze edilen farenin beyni çıkarıldı ve karbojen ile gazlanan sıvı-buz NMDG-HEPES-aCSF solüsyonu içeren vibratom kabına aktarıldı. Vibratom cihazında (Campden Instruments, İngiltere) Hipotalamik ARC çekirdeğini de içerecek şekilde 250 µl kalınlığında kesitler alındı. Nöronların toparlanma (recovery) evresi için alınan kesitler 32 °C'de karbojen ile gazlanan kesme solüsyonunda 15 dakika bekletildi. Daha sonra kesitler oda sıcaklığında HEPES-Holding-aCSF solüsyonuna aktararak 1 saat sonra kayıt alma işlemine geçildi. Kesitler tüm deney boyunca oda sıcaklığında HEPES-Holding-aCSF solüsyonu içerisinde tutuldu.

Tablo 3.6. Elektrofizyoloji deneylerinde kullanılan aCSF solüsyon içerikleri

Kimyasal	NMDG-HEPES aCSF (mM)	HEPES-Holding aCSF (mM)	Recording aCSF (mM)
N-methyl-D-glucamine	92	-	-
HCl	92	-	-
NaCl	-	92	124
KCl	2.5	2.5	2.5
NaH ₂ PO ₄	1.2	1.2	1.2
NaHCO ₃	30	30	24
HEPES	20	20	5
Glukoz	25	25	12.5
Sodyum Askorbat	5	5	-
Tiyüire	2	2	-
Sodyum Piruvat	3	3	-
MgSO ₄	10	2	2
CaCl ₂	0.5	2	2

3.5.2. Spontane Aksiyon Potansiyel Kaydının Alınması

Aksiyon potansiyel kayıtları floresan görüntüleme sistemi (CoolLed, pE-4000 İngiltere) ile entegre, faraday kafesi içerisinde kurulu elektrofizyoloji sistemi (Scientifica, İngiltere) kullanılarak alındı. Elektiriksel aktivitenin osiloskop ekranında takip edilebilmesi için patch clamp amfi sistemi ve Clampex 10.4 yazılımı (Molecular Devices, Amerika) kullanıldı. (Şekil 3.13.)



Şekil 3.13. Elektrofizyoloji sistemi

Kayıt boyunca elektrofizyoloji banyosu oda sıcaklığında karbojen ile gazlanan Recording-aCSF ile perfüze edildi (2 ml/dakika). Kesitler elektrofizyoloji banyosunun içerisine konuldu. Floresan görüntüleme sistemi ile 4X büyütmede hipotalamik ARC bölgesinde GFP sinyali olup olmadığı gözlemlendi. Hipotalamik ARC bölgesinde GFP sinyali görülen kesitlerde kayıt alma işlemine geçildi.

Kayıt işlemi için öncelikle yama kısıracının yapılacağı cam elektrod pipetler hazırlandı. Dış çapı 1.5 mm iç çapı 1.1 mm, borosilikat cam pipetler (Sutter Instrument, ABD) dikey pipet çekici (Narishige, Japonya) kullanılarak hazırlandı. Pipet direncinin “cell-attached” kaydına, hücreden parça koparmadan sadece hücreye yapışarak, uygun olması için (8-12 M Ω) pipet çekicinin 1. ısı ayarı 70.5 °C, 2. ısı ayarı 52.4 °C olarak ayarlandı ve cam pipetin altına 4 adet ağırlık yerleştirildi. Hazırlanan pipetler ekstra selüler sıvı görevi görmesi için Recording-aCSF ile dolduruldu. Pipet elektrofizyoloji sisteminde gümüş elektrod içine girecek şekilde “head stage” aparatına monte edildi.

4X büyütmede fare beyin atlası (59) referans alınarak hipotalamik ARC bölgesindeki GFP ışınması belirlendikten sonra, sisteme dahil mikro manipülatörler ile pipet elektrofizyoloji banyosuna sokuldu ve enjeksiyon bölgesine yaklaştırıldı.

Sonrasında 40X büyütme objektifine geçilerek GFP sinyali veren Kisspeptin nöronları sipesifik olarak belirlendi. Pipete pozitif basınç vererek pipet Kisspeptin nöronunun hücre zarına temas edinceye kadar yaklaştırıldı. Hücre zarına temas ettikten sonra negatif basınç ile pipetin Kisspeptin nöronuna kenetlenmesi sağlandı. Bu kenetlenme de osiloskopta takip edildi. Pipet direncinin 30 M Ω üzerine çıkan kenetlenmelerde aksiyon potansiyel kaydı alındı. Kayıtlar Clampfit 11.0.3 yazılımı (Molecular Devices, Amerika) ile analiz edildi.

3.6. ARC KNDy İmmünfloresan Boyama

Erken dönem sosyal izolasyonun hipotalamik ARC çekirdeğinde bulunan nöronlarda Kisspeptin, Nörokinin B ve Dinorfin (KNDy) nöropeptidlerinin üretimini nasıl etkilediğini incelemek için izole ve sosyal gruptaki farelerin beyin kesitlerinde KNDy nöropeptidlerin antikorları ile immünfloresan boyaması yapıldı.

Boyama yapılacak beyin kesitleri bölüm 3.6.1.'de tarif edildiği gibi 50 μ m kalınlığında hazırlandı. Hipotalamik ARC çekirdeği içeren kesitler stereo mikroskop (Zeiss, Almanya) altında seçilerek 24 kuyulu plaka'ya bir kuyucuğa bir kesit olacak şekilde aktarıldı.

Kalan PFA'yı uzaklaştırmak için kesitler üzerine 300 μ l 0.1 M glisin eklenerek oda sıcaklığında 15 dakika çalkalandı. Sonrasında solüsyon uzaklaştırılarak kesitler 3 defa 5er dakika PBS ile çalkalanarak oda sıcaklığında yıkandı. Permeabilizasyon işlemi için kesitler üzerine 300 μ l % 0.3 Triton X-100 / PBS eklenerek +4 °C'de 45 dakika çalkalandı. Sonrasında solüsyon uzaklaştırılarak kesitler 3 defa 5er dakika PBS ile çalkalanarak oda sıcaklığında yıkandı. Bloklama işlemi için % 0.1 Triton X-100 / PBS içerisinde % 3 normal keçi serum solüsyonu hazırlandı. Yıkama sonrası kesitler üzerine 300 μ l bloklama solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 1 saat çalkalandı. Sonrasında bloklama solüsyonu uzaklaştırılarak yıkama yapmadan bloklama solüsyonu içerisinde 1:100 oranında hazırlanan primer antikorlar (Tablo 3.7.) 200 μ l hacimde eklenerek kesitler gece boyu +4 °C'de çalkalanmaya bırakıldı. Ertesi gün primer antikorlar uzaklaştırılarak PBS ile 3 defa 5er dakika oda sıcaklığında yıkama yapıldı. Sekonder antikor olarak primer antikorların üretimine uygun olarak AlexaFlour 488 anti-rabbit IgG (abcam, ABD) kullanıldı. Sekonder antikorlar % 0.1 Triton X-100 / PBS ile hazırlanan %3 Bovin Serum Albumin (BSA) solüsyonu içerisinde 1:1000 oranında seyreltilerek

kullanıldı. Kesitler üzerine 200 µl sekonder antikor eklenerek karanlık ortamda oda sıcaklığında 1 saat çalkalanmaya bırakıldı. Sonrasında sekonder antikorlar uzaklaştırılarak PBS ile 3 defa 5er dakika oda sıcaklığında yıkama yapıldı. Son yıkama işlemi de bittikten sonra kesitler polizin kaplı lam üzerine alınarak PBS tamamen uzaklaşana kadar beklendi. Kesitler hücre çekirdeğini boyayan DAPI içeren flouromount kapatma sıvısı ile kapatılarak +4 °C’de ışıktan korunaklı olarak saklandı.

Beyin kesitlerinin hipotalamik ARC bölgeleri konfokal mikroskobunda 20X büyütme ile görüntülendi. Görüntü analizleri ImageJ programı ile yapıldı. Kısaca; Konfokal mikroskobundan alınan 20X görüntüler ImageJ programında açıldı, görüntü katmanlarına ayrılıp yeşil katman seçildi (Image, Stacks to images), 8 bit olarak ayarlandı (Image, Type, 8 bit), ARC bölgesi seçildi (ROI), seçilen bölgedeki parlaklık ölçüldü (Analyze, Measure). Seçilen bölge yakınlaştırıldı (zoom in) ışımaya olmayan 5 farklı alan seçilerek arkaplan (background) ölçümü yapıldı. Floresan sinyal yoğunluğunu hesaplamak için;

$$\text{Floresan Sinyal Yoğunluğu} = \text{ROI Parlaklık} - (\text{ROI Alanı} * \text{Arkaplan Parlaklığı})$$

formulasyonu kullanıldı. Gruplar arası karşılaştırma Kolmogorov-Smirnov testi ile yapıldı.

Tablo 3.7. İmmü floresan boyamalarda kullanılan primer antikorlar.

Antikor	Kaynak Tür	Dilüsyon	Marka/Katalog No
Kisspeptin	Tavşan	1:50	Bioss / bs-0749R
Neurokinin B	Tavşan	1:50	MBS / 2027440
Dynorphin	Tavşan	1:50	Bioss / bs13041R

3.7. Kisspeptin Nöronlarının Aksonal Uzantılarının Görüntülenmesi

Davranış deneylerini tamamlayıp AAV-Flex-GFP enjeksiyonu gerçekleştirilen farelerde konfokal görüntüleme deneylerine geçildi. Erken dönem sosyal izolasyonun hipotalamik ARC çekirdeğinde bulunan Kisspeptin nöronlarının beynin farklı bölgelerine

yaptığı aksonal projeksiyonları üzerine etkilerini incelemek için Kisspeptin soma ve aksonlarında Cre bağımlı ifade edilen GFP sinyalleri konfokal mikroskopi tekniğiyle görüntülenip ImageJ programı ile analiz edildi.

3.7.1. Beyin Kesitlerinin Hazırlanması

İzofluran ile anesteziye alınan farelere önce soğuk 10 ml SF ile hemen devamında 10 ml soğuk %4 paraformaldehit (PFA) çözeltisi ile bölüm 3.5.1.'de tarif edildiği gibi kardiyak perfüzyon yapıldı. Perfüzyon sonrası farelerin beyinleri bütünlüğü bozulmadan çıkarıldı ve % 4 PFA çözeltisi içerisine alındı. Beyinler +4 °C'de PFA içerisinde en az 4 saat bekletildikten sonra doku içerisindeki suyun uzaklaştırılması için PBS ile hazırlanmış %30 süzkroz çözeltisine alındı. Beyinler süzkroz solüsyonun dibine çökene kadar +4 °C'de bekletildi.

Süzkroz solüsyonunda çöken beyinler soğuk PBS ile yıkandıktan sonra serebellum kısmına yakın bir bölgeden bistüri yardımıyla düz bir şekilde kesildi. Beyinler kesilen bölgeden vibratom mıknatısına yapıştırılarak soğuk PBS ile dolu vibratom tankına yerleştirildi. Vibratom cihazında (Campden Instruments, İngiltere) beyinlerin en uç kısmından başlanarak en arka kısmına kadar 100 µm kalınlığında koronal kesitler alındı. Alınan kesitler soğuk PBS içerisinde her kuyucuğa 3 kesit olacak şekilde 24 kuyulu plakada toplandı. Her kuyudan 1 adet kesit alarak polizin kaplı lam üzerine konularak PBS tamamen uzaklaştırıldı. Kesitler flouromount kapatma sıvısı ile kapatılarak +4 °C'de saklandı.

3.7.2. Beyin Kesitlerinin Görüntülenmesi ve Analizi

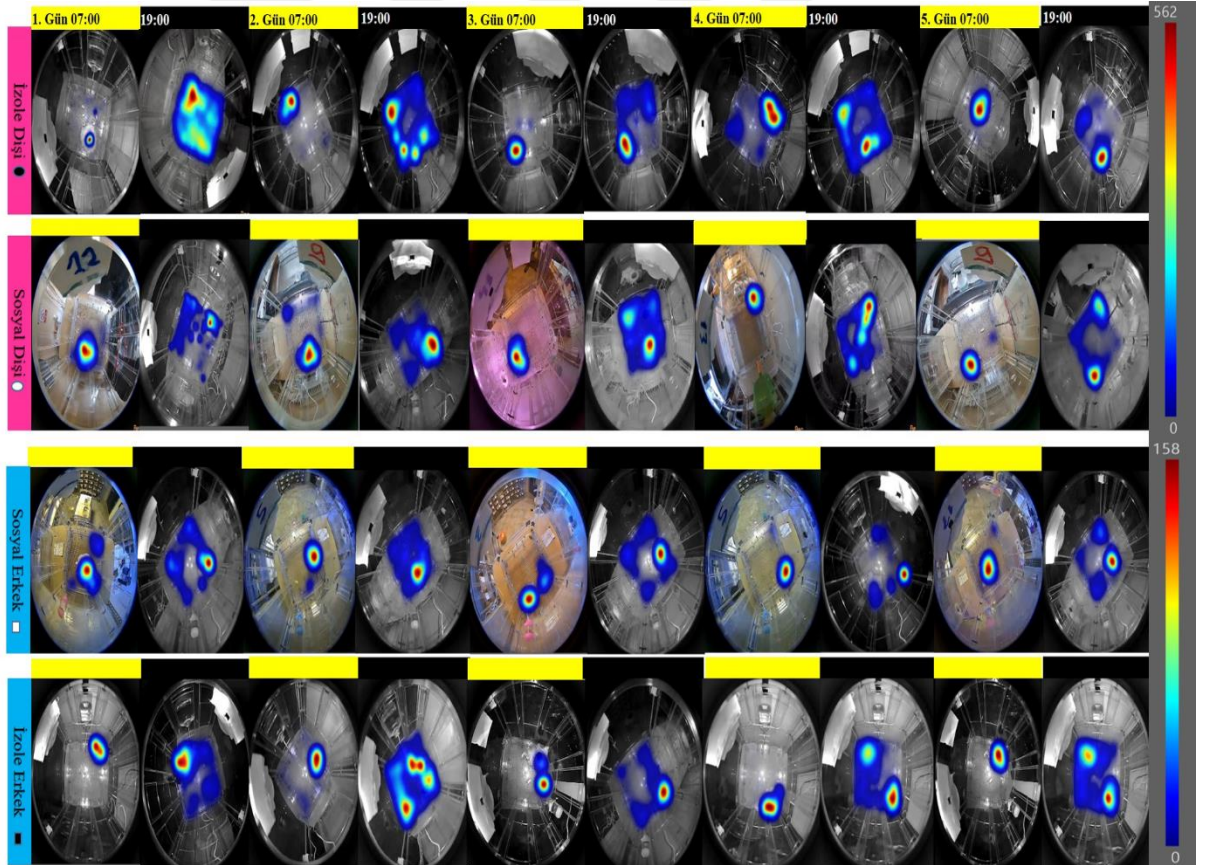
Beyin kesitlerinde GFP sinyali konfokal mikroskobunda (Carl Zeiss, LSM70, Almanya) görüntüldü. İlk olarak hipotalamik ARC çekirdeğe yapılan enjeksiyon bölgesi görüntüldü. Sonrasında da hipotalamik ARC çekirdeğin posteriyor ve anteriyorunda tüm beyin kesitleri taranarak GFP sinyali alınan bölgeler 20X büyütme ile görüntüldü. Elde edilen resimlerden Kisspeptin nöronlarının projeksiyonlarının haritalaması yapıldı. Akson yoğunluğu ImageJ programı ile analiz edildi.

4. BULGULAR

4.1. Erken Dönem Sosyal İzolasyonun Lokomotor Aktivite Üzerine Etkisi

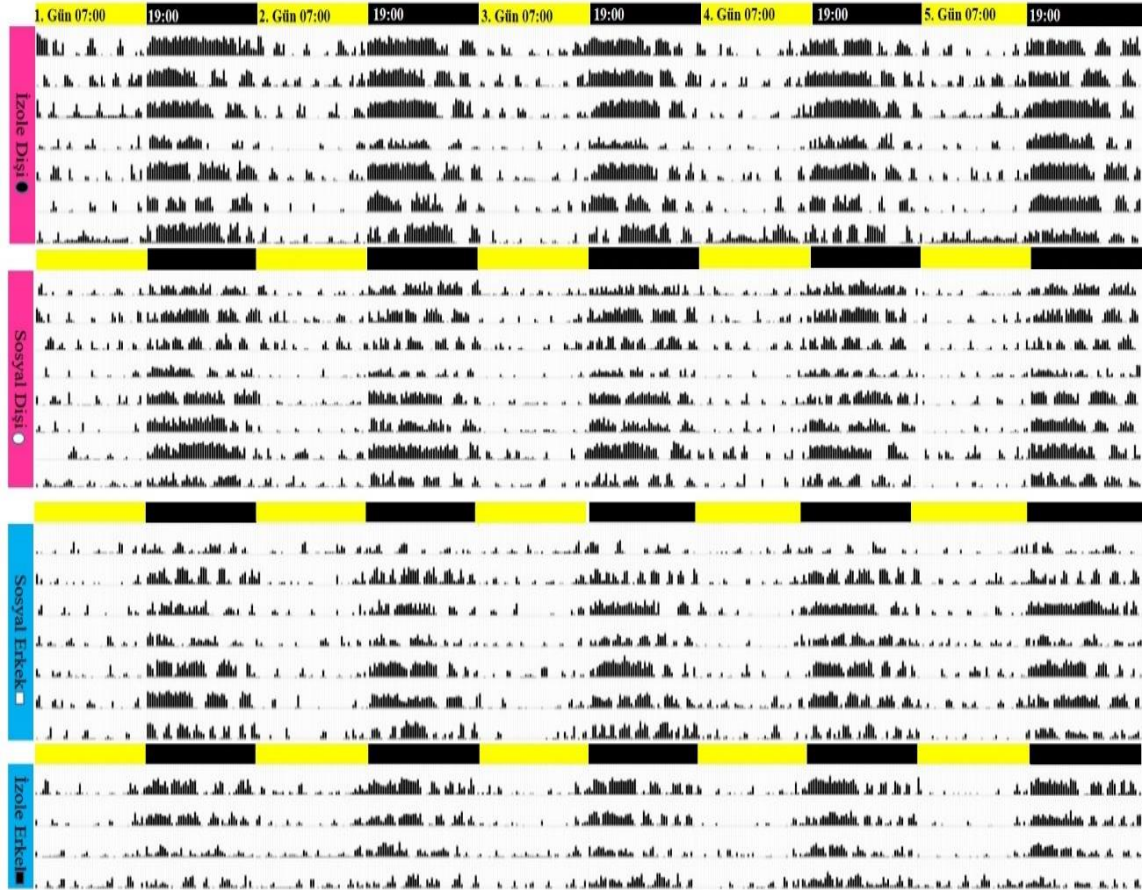
Erken dönem sosyal izolasyonun kafes içi lokomotor aktivite üzerine etkisi PIR hareket sensörü ve Arduino yazılımı kullanılarak araştırıldı. Ayrıca 24 saat kamera kaydı alınarak kafes içindeki hareketlilikleri takip edildi.

Kamera kaydı görüntülerinden elde edilen veriler ile farelerin kafes içinde hareketliliklerini görsel olarak ifade edebilmek için ısı haritası oluşturuldu. Bu haritada her bir gruptan 1 farenin 1 günlük aktivitesi gece ve gündüz olarak 5 gün boyunca gösterildi. Oluşturulan ısı haritasında tüm gruplardaki farelerin gece fazında daha hareketli olduğu, tüm kafesi dolıştığı görülürken gündüz fazının neredeyse tamamını kafesin belli bir noktasında geçirdiği gözlemlendi. (Şekil 4.1.) İzole gruptaki farelerin de sosyal gruplardaki farelere göre daha hareketli olduğu görülmektedir.



Şekil 4.1. İzole ve sosyal gruplardaki dişi ve erkek farelerin gündüz ve gece kafes içi lokomotor aktivitelerini gösteren ısı haritaları. (üst barem gece, alt barem gündüz haritaları içindir.)

Farelerin lokomotor aktivitesini nümerik olarak ifade edip analiz edebilmek için IR hareket sensörleri kullanıldı. Hareket sensörlerinden alınan veriler Arduino yazılımı ile bilgisayar ortamına aktarıldı. 24 saat boyunca saniyelik olarak farelerin hareketliliği “1” hareketsizliği “0” olarak kodlandı. Işıkların açık olduğu 07:00-19:00 saatleri arasındaki “1” toplamı gündüz hareketliliğini, ışıkların kapalı olduğu 19:00-07:00 “1” toplamı gece hareketliliğini ifade etmektedir. Gündüz ve gece hareketliliği 15er dakikalık bölümlerde olarak toplandı. Excell programında toplanan veriler ile lokomotor aktiviteyi grafik olarak ifade edebilmek için aktogram oluşturuldu (Şekil 4.2.) Oluşturulan aktogram grafiğinde de ısı haritası ile uyumlu olarak tüm gruplardaki farelerin gece fazında daha hareketli olduğu, gündüz fazını daha pasif geçirdiği görülmüştür.



Şekil 4.2. İzole ve sosyal gruplardaki erkek ve dişi farelerin gündüz ve gece kafes içi lokomotor aktivitelerini gösteren aktogram grafiği. (Her bir çizgi 15 dakikalık hareketliliği ifade etmektedir.)

Tüm gruplardaki her bir fare için gündüz ve gece 15'er dakikalık hareketlilik verilerinin ortalamaları tablo 4.1. ve 4.2.'de gösterildi.

Tablo 4.1. İzole (n= 7) ve sosyal (n=8) gruplardaki dişi farelerin 12 saatlik (gündüz-gece) kafes içi lokomotor aktivite ortalamaları.

		İzole Grup							
Günler	Periyod	1	2	3	4	5	6	7	
1.Gün	Gündüz	129,3	53,8	63,7	50,5	134,5	141,1	101,5	
	Gece	437,5	234,6	365,2	135,6	307,8	255,6	477,5	
2.Gün	Gündüz	60,8	12,8	72,1	34,4	113,7	112,9	112,1	
	Gece	396,7	206,8	352,4	123,3	377,8	307,1	366,5	
3.Gün	Gündüz	129,3	53,8	63,7	50,5	134,5	141,1	101,5	
	Gece	366,7	232,3	314,8	102,7	373,3	341,9	315,3	
4.Gün	Gündüz	237,9	64,6	86,6	16,3	70,4	105,6	79,0	
	Gece	246,9	178,5	294,1	200,5	384,5	299,2	289,2	
5.Gün	Gündüz	163,5	16,9	92,5	52,9	139,5	161,2	65,0	
	Gece	221,6	313,7	354,5	198,3	382,9	260,6	303,5	
		Sosyal Grup							
Günler	Periyod	1	2	3	4	5	6	7	8
1.Gün	Gündüz	75,3	44,7	38,2	80,7	38,3	94,3	96,3	59,0
	Gece	225,6	433,1	364,2	343,0	192,6	225,3	326,1	200,6
2.Gün	Gündüz	66,2	97,7	23,8	42,4	19,4	109,0	90,3	59,7
	Gece	223,8	417,4	251,3	295,6	125,0	202,1	265,6	268,6
3.Gün	Gündüz	47,3	85,9	25,7	27,3	14,3	59,9	45,7	56,1
	Gece	192,8	403,4	252,2	300,7	147,6	255,9	347,6	211,6
4.Gün	Gündüz	49,7	117,0	45,5	51,5	23,3	74,9	59,4	65,0
	Gece	185,7	313,5	229,2	283,0	145,5	226,0	321,0	264,1
5.Gün	Gündüz	23,4	108,0	26,5	36,4	36,0	53,1	56,8	44,7
	Gece	258,2	351,5	297,8	300,1	146,1	200,5	305,2	238,3

Tablo 4.2. İzole (n= 7) ve sosyal (n=4) gruplardaki erkek farelerin 12 saatlik kafes içi lokomotor aktivite ortalamaları.

Günler	Periyod	İzole Grup						
		1	2	3	4	5	6	7
1.Gün	Gündüz	36,5	50,7	33,1	52,5	33,0	23,8	76,8
	Gece	214,8	268,6	287,0	102,2	138,7	244,9	103,9
2.Gün	Gündüz	48,2	26,8	39,5	54,2	30,2	44,4	73,5
	Gece	244,1	226,2	245,0	111,5	177,8	292,1	51,5
3.Gün	Gündüz	36,5	50,7	33,1	52,5	33,0	23,8	76,8
	Gece	299,6	232,5	261,1	160,8	227,9	204,3	57,5
4.Gün	Gündüz	71,0	79,2	42,1	34,4	38,2	52,2	58,4
	Gece	188,8	236,1	264,1	199,2	215,0	278,4	71,2
5.Gün	Gündüz	27,9	80,8	85,6	62,4	48,8	67,5	35,4
	Gece	134,5	246,1	226,9	95,3	303,8	170,1	61,5
Günler	Periyod	Sosyal Grup						
		1	2	3	4			
1.Gün	Gündüz	79,3	40,3	45,8	69,8			
	Gece	118,6	117,8	224,6	262,9			
2.Gün	Gündüz	67,0	64,3	54,4	69,6			
	Gece	150,5	166,4	212,6	282,5			
3.Gün	Gündüz	46,5	51,7	32,6	53,4			
	Gece	198,4	121,3	241,5	277,1			
4.Gün	Gündüz	62,8	41,6	24,3	56,4			
	Gece	207,0	170,5	218,0	291,8			
5.Gün	Gündüz	105,3	20,8	21,7	41,8			
	Gece	112,5	178,3	218,3	315,5			

Lokomotor aktivite verilerinin analizi için Two-Way rmANOVA istatistiksel yöntemi kullanıldı (Ref). Tüm günlerde gündüz ve gece fazları için gruplar kendi aralarında karşılaştırıldı. Sosyal ve izole sosyal gruplardaki dişi ve erkek tüm farelerin lokomotor aktivitesinin yüksek derecede anlamlı olarak gece daha fazla olduğu görüldü (****; $p < 0.0001$, $DF = 93.78$).

Gece fazında da sosyal gruptaki dişi farelerin tüm gruplardan daha hareketli olduğu görüldü. Gündüz fazında gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p > 0.05$). Ancak grafikte izole gruptaki dişilerin diğer gruplardan daha hareketli olduğu görülmektedir.

Gece fazına bakıldığında; 1. gün gece fazında izole gruptaki dişi farelerin hareketliliğinin izole ve sosyal gruptaki erkek farelerden anlamlı olarak fazla olduğu

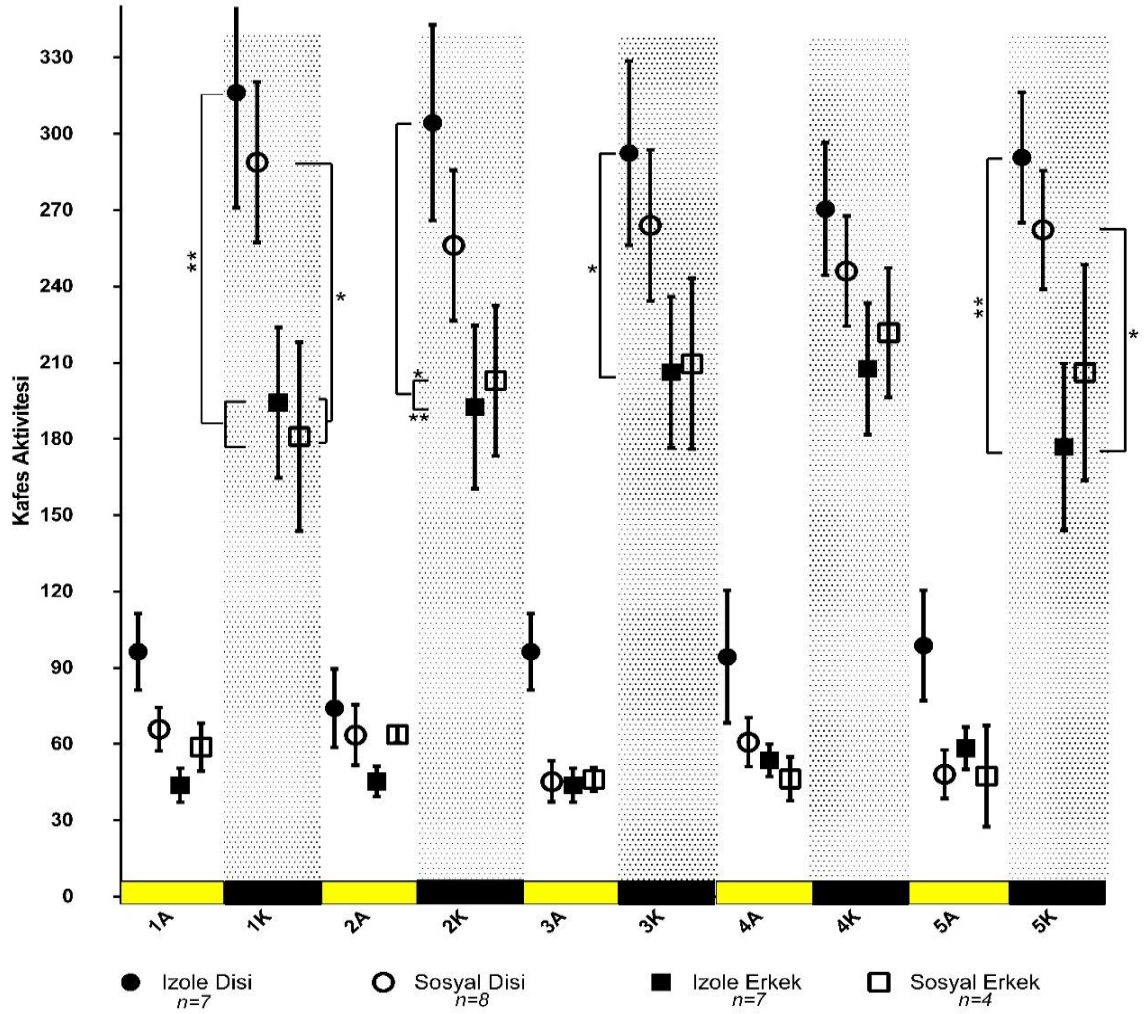
görüldü (sırasıyla, $p=0.0017$ ve $p=0.0035$, $DF=220$), sosyal gruptaki dişi farelerin hareketliliği de izole ve sosyal gruptaki erkek farelerden anlamlı olarak fazla olduğu görüldü (sırasıyla, $p=0.0192$ ve $p=0.0259$, $DF=220$).

2. gün gece fazında izole gruptaki dişi farelerin hareketliliğinin izole ve sosyal gruplardaki erkek farelerden anlamlı olarak daha fazla olduğu görüldü (sırasıyla, $p=0.0050$ ve $p=0.0486$, $DF=220$), diğer gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi.

3. gün gece fazında yalnızca izole grupta dişi fareler ile izole gruptaki erkek fareler arasında anlamlı fark görüldü ($p=0.0496$, $DF=220$)

4. gün gece fazında anlamlı bir fark görülmedi.

5. gün gece fazında izole ve sosyal gruplardaki dişi farelerin hareketliliğinin izole gruptaki erkek farelerden anlamlı olarak fazla olduğu görüldü (sırasıyla, $p=0.0041$, ve $p=0.0425$, $DF=220$). (Şekil 4.3.)



Şekil 4.3. Gruplar arası kafes içi lokomotor aktivite ortalaması karşılaştırmaları. Two-Way rmANOVA, $DF=220$, **, $p<0.005$, *, $p<0.05$.

4.2. Erken Dönem Sosyal İzolasyonun Beslenme Davranışı Üzerine Etkisi

Erken dönem sosyal izolasyonun beslenme davranışı üzerine etkisi günlük yem tartımı yapılarak takip edildi. Tablo 4.3. ve 4.4.'te izole ve sosyal gruptaki dişi ve erkek farelerin günlük tükettikleri yem miktarı gösterildi.

Tablo 4.3. İzole (n= 7) ve sosyal (n=9) gruptaki dişi farelerin 24 saat boyunca tükettikleri yem miktarı (gram)

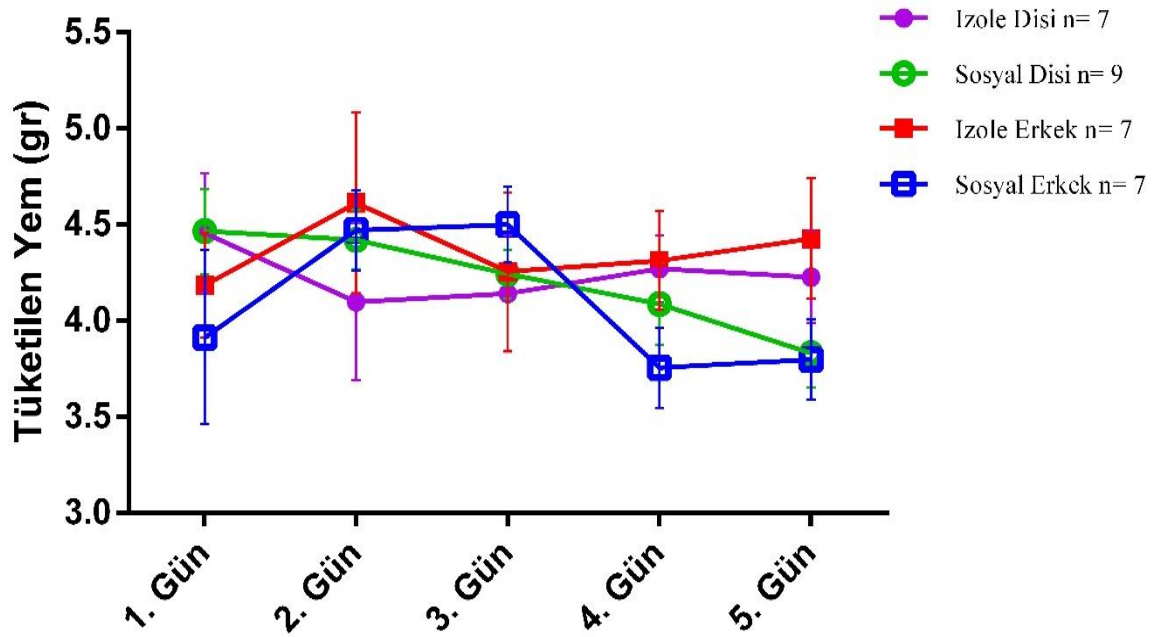
Günler	İzole Grup								
	1	2	3	4	5	6	7		
	4,35	4,35	4,9	3	5,6	4,1	4,9		
	4,7	4,3	5,1	3,8	2	3,7	5,1		
	4,4	4,1	4,8	2,6	4	4	5,1		
	4,6	3,9	4,8	3,7	3,8	4,6	4,5		
	4,1	5	3,5	3,9	3,5	4,8	4,8		
Günler	Sosyal Grup								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	4,7	4,4	4,8	4,3	3,4	3,6	5,6	4,9	4,5
	4,7	4,6	4,9	4,3	4,2	3,5	4,9	4	4,7
	4,8	3,9	4,7	4,2	4,4	3,7	3,9	4,1	4,5
	3,9	4,2	5,5	4,3	3,7	3,6	3,2	4,3	4,1
	4,2	4,2	3,3	3,1	4,1	4	3,6	4,7	3,3

Tablo 4.4. İzole (n= 7) ve sosyal (n=7) gruptaki erkek farelerin 24 saat boyunca tükettikleri yem miktarı (gram)

Günler	İzole Erkek						
	1	2	3	4	5	6	7
1. Gün	3,6	5,2	5,1	4,2	3,3	3,9	4
2. Gün	5	7,1	4,6	3,8	3,3	4,6	3,9
3. Gün	4	3,7	5	3	2,8	4,4	3,2
4. Gün	5,1	5,4	4,3	3,7	3,7	4,1	3,9
5. Gün	4,7	5,7	5,1	4,2	3,5	4,4	3,4
Günler	Sosyal Erkek						
	1	2	3	4	5	6	7
1. Gün	3,6	1,5	3,5	4,6	4,6	4,9	4,7
2. Gün	4	5,2	3,5	4,6	4,7	4,7	4,6
3. Gün	3,4	4,8	5	4,7	4,6	4,6	4,4
4. Gün	3,4	3,1	3,2	4,2	4,5	4,2	3,7
5. Gün	2,8	3,5	3,9	4,6	3,8	4	4

Tüm gruplar arasındaki yem tüketim ortalamaları Two-Way ANOVA istatistiksel yöntemi ve Tukey's çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında ve zaman bağlı olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.05$, $DF=26$).

Şekil 4.4.'te günlük ortalama yem tüketimlerine bakıldığında sosyal gruptaki dişi ve erkek farelerin yem tüketiminin zamanla azaldığını ve deney sonunda aynı seviyeye indiği görüldü. İzole gruptaki dişi ve erkek farelerin de genel olarak sosyal gruptaki farelere göre daha çok yem tükettiği görüldü.



Şekil 4.4. Gruplar arası yem tüketim ortalamaları karşılaştırması. Two-way ANOVA Tukey's, $DF=26$ $p>0.05$

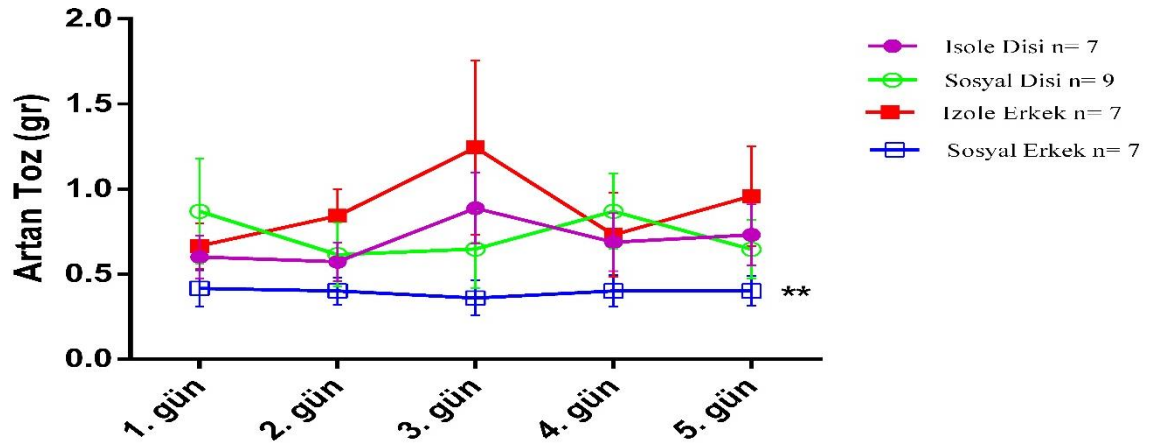
Erken dönem sosyal izolasyonun anksiyetik etkisini beslenme davranışı üzerinden incelemek için farelerin yem yerken oluşan toz miktarı da tartıldı. Oluşan toz miktarları Tablo 4.5. ve 4.6.'da, gruplar arası ortalama karşılaştırmaları Şekil 4.5.'te gösterildi. Gruplar arası yapılan karşılaştırmada sosyal gruptaki erkek farelerin anlamlı olarak diğer tüm gruplardan daha az yem artığı oluşturduğu görüldü (Unpaired t test, $p=0.0079$). Two-Way ANOVA istatistiksel yöntemi ve Tukey's çoklu karşılaştırma testi kullanılarak yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında zamana bağlı anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.05$, $DF=26$).

Tablo 4.5. İzole (n= 7) ve sosyal (n=9) gruplardaki dişi farelerin 24 saat boyunca yem tüketirken oluşan toz miktarı (gram)

	İzole Grup								
Günler	A3	B8	D8	M5	G1	G2	P2		
1. Gün	0,7	0,8	0,5	0,01	0,6	1,1	0,5		
2. Gün	0,9	0,5	0,5	0,01	0,6	0,9	0,6		
3. Gün	1,9	0,9	0,8	0,01	0,9	1,0	0,7		
4. Gün	1,1	0,3	0,8	0,01	0,5	1,3	0,8		
5. Gün	1,2	0,6	0,9	0,01	0,5	1,4	0,5		
	Sosyal Grup								
Günler	E1	E4	E7	E8	L1	L2	U1	U2	U3
1. Gün	3,0	0,9	0,3	1,1	0,4	0,7	1,4	0,01	0,01
2. Gün	1,6	0,8	0,5	0,8	0,01	0,6	1,2	0,01	0,01
3. Gün	2,2	0,7	0,8	0,7	0,01	0,5	0,9	0,01	0,01
4. Gün	2,1	1,1	0,9	1,5	0,01	0,7	0,9	0,01	0,6
5. Gün	1,3	1,1	0,7	0,5	0,01	0,7	1,3	0,01	0,2

Tablo 4.6. İzole (n= 7) ve sosyal (n=7) gruplardaki erkek farelerin 24 saat boyunca yem tüketirken oluşan toz miktarı (gram)

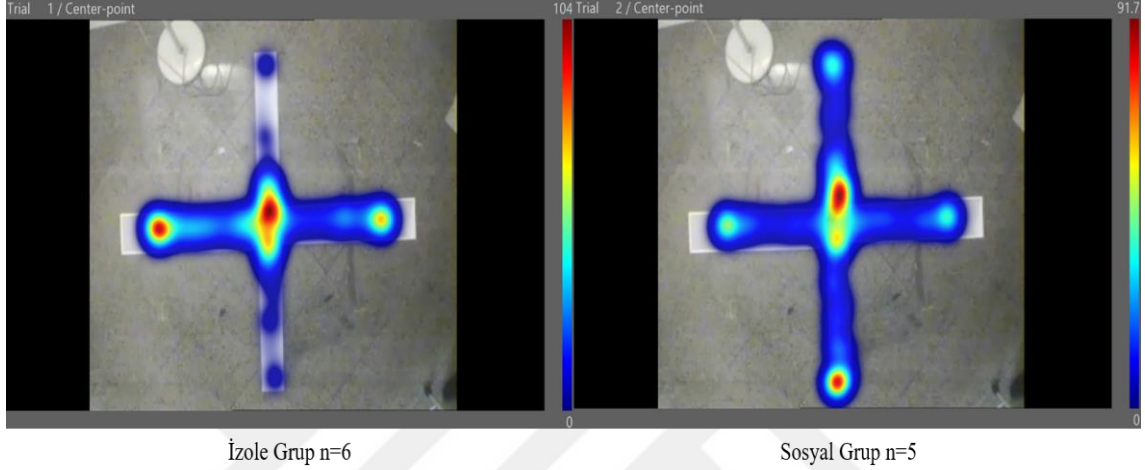
Günler	İzole Erkek						
	B1	B5	E5	L3	I4	G3	V2
1. Gün	1,05	0,9	0,8	0,4	0,7	0,8	0,01
2. Gün	1,1	1,6	0,5	0,5	0,5	1,0	0,7
3. Gün	2,7	3,6	0,7	0,3	0,01	0,8	0,6
4. Gün	0,7	2,1	0,7	0,01	0,4	0,7	0,5
5. Gün	1,0	2,5	0,7	0,01	0,6	1,2	0,7
Günler	Sosyal Erkek						
	J1	J2	J6	X3	X4	X5	X6
1. Gün	0,3	0,5	0,01	0,5	0,2	0,5	0,9
2. Gün	0,2	0,5	0,2	0,3	0,3	0,5	0,8
3. Gün	0,5	0,01	0,01	0,7	0,3	0,4	0,6
4. Gün	0,01	0,7	0,3	0,3	0,3	0,5	0,7
5. Gün	0,6	0,7	0,01	0,4	0,2	0,4	0,5



Şekil 4.5. Gruplar arası yem tüketirken oluşan toz miktarı ortalamaları karşılaştırması. Unpaired t test, **p<0.01

4.3. Erken Dönem Sosyal İzolasyonun Anksiyete Üzerine Etkisi

Erken dönem sosyal izolasyonun farelerdeki anksiyetik etkisi yükseltilmiş artı labirent (EPM) testi ile araştırıldı. Deney videoları birleştirilerek iki gruptaki tüm farelerin videolarından EPM testinin ısı haritası oluşturuldu. (Şekil 4.6.) Isı haritasına bakıldığında izole gruptaki farelerin kapalı kollarda kalmayı tercih ettiğini, sosyal gruptaki farelerin ise tüm labirenti dolaştıkları görüldü.

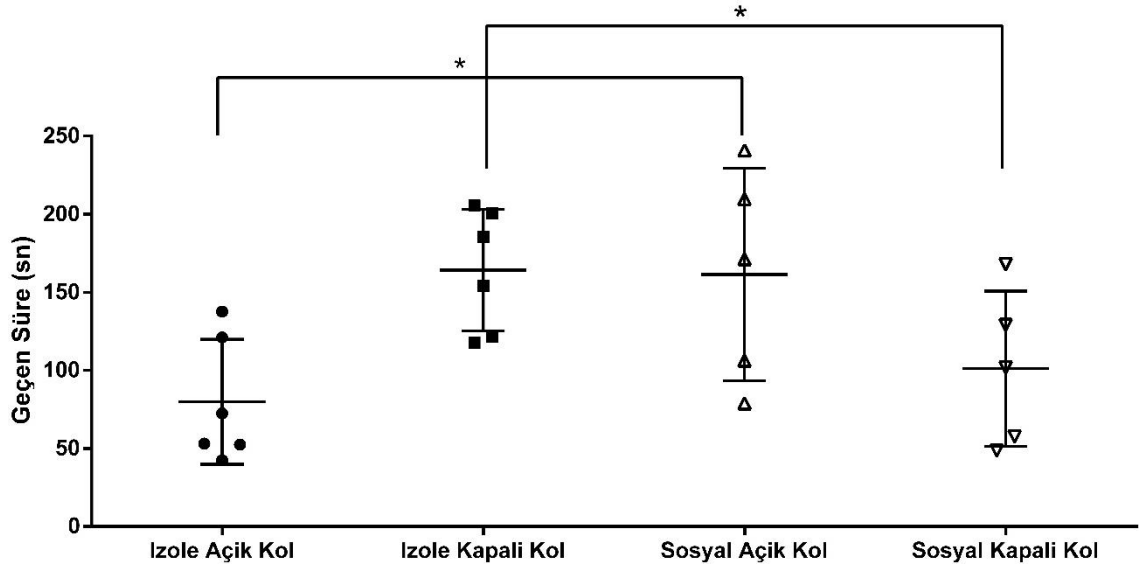


Şekil 4.6. Yükseltilmiş artı labirent testi ısı haritası

Her iki gruptaki farelerin labirentin kollarında geçirdikleri süreler Tablo 4.7.'de belirtildi. Gruplar arası istatistiksel analiz Unpaired t test kullanılarak yapıldı. İzole ve sosyal grupların açık ve kapalı kollarda geçirdiği süreler anlamlı olarak farklı olduğu görüldü. (sırasıyla, $p=0.0349$ ve $p= 0.0421$)

Tablo 4.7. İzole ve sosyal gruptaki farelerin Yükseltilmiş Artı Labirent testinde labirentin açık ve kapalı kollarında geçirdikleri süre (saniye)

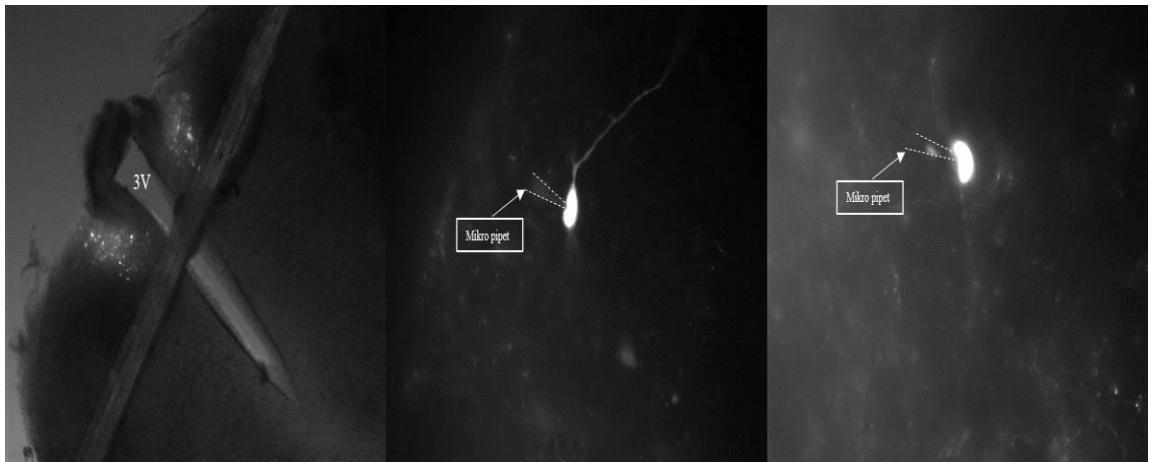
n	İzole Grup	
	Açık Kol	Kapalı Kol
1	137,6	121,5
2	72,5	185,6
3	42,5	154,3
4	53,1	200,9
5	52,5	205,6
6	121,2	117,7
n	Sosyal Grup	
	Açık Kol	Kapalı Kol
1	79,0	168,0
2	209,8	57,6
3	106,4	129,0
4	171,4	102,0
5	241,0	48,8



Şekil 4.7. Yükseltilmiş artı labirent testinde izole ve sosyal gruplardaki farelerin labirentin kollarında geçirdikleri süreler. Unpaired t test, *; $p < 0.05$

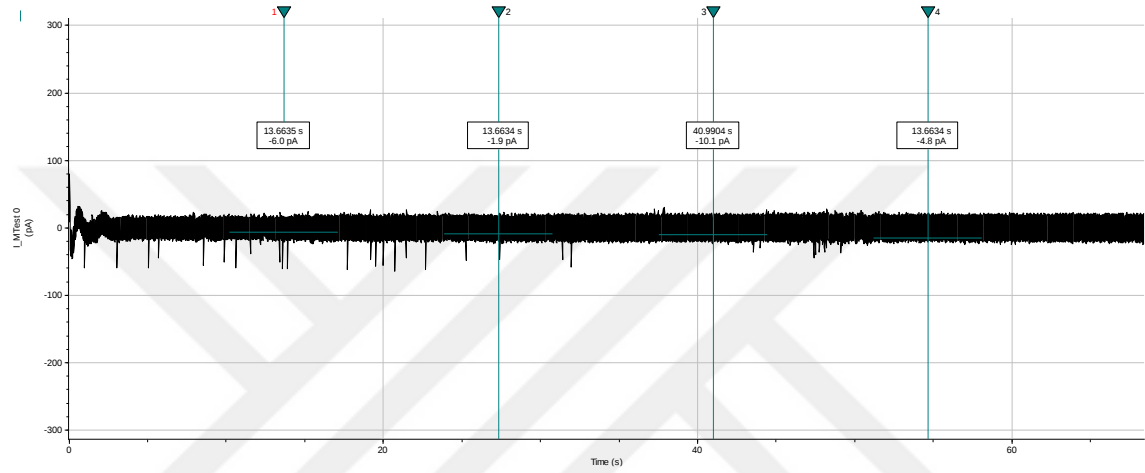
4.4. Erken Dönem Sosyal İzolasyonun ARC Kisspeptin Nöronlarının Elektrofizyolojik Özelliklerine Etkisi

Erken dönem sosyal izolasyonun ARC Kisspeptin nöronlarının elektriksel aktivitelerini nasıl etkilediği ex-vivo elektrofizyolojik yöntemler kullanılarak araştırıldı. Hipotalamik ARC bölgesinde GFP sinyali görülen beyin kesitlerinde GFP sinyali veren Kisspeptin nöronlarından “cell attach” yöntemi ile spontan aksiyon potansiyel kaydı alındı. (Şekil 4.8.) ARC bölgesini taşımış virüs enfeksiyonu kaynaklı GFP sinyali alınan nöronlardan kayıt alınmadı.

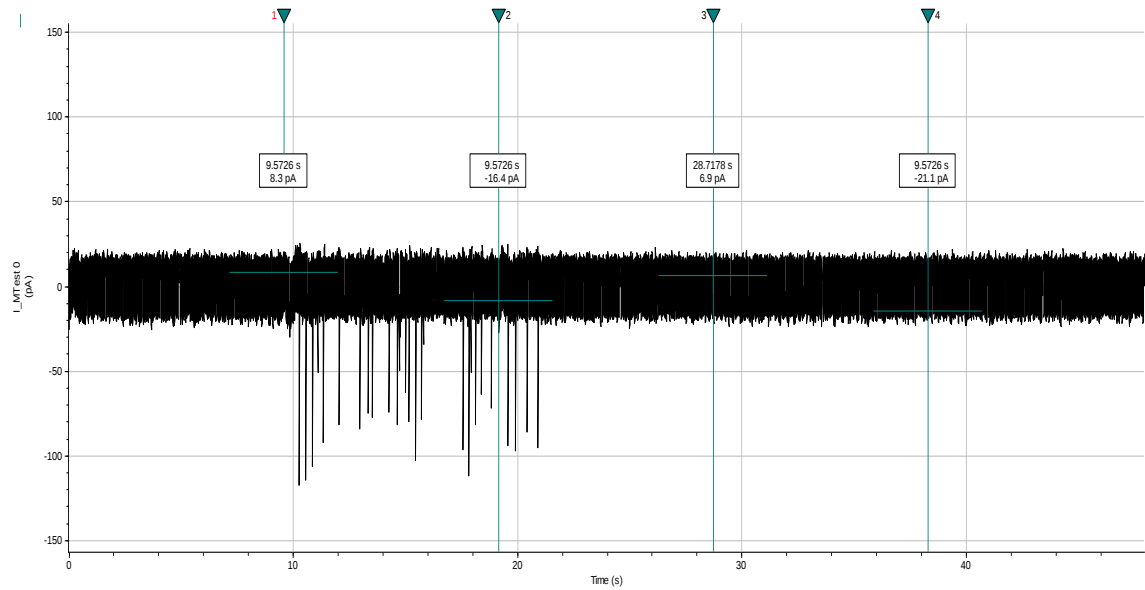


Şekil 4.8. Hipotalamik ARC Kisspeptin nöronlarından aksiyon potansiyel kaydı.

Bağlantı (seal) kurulan tüm nöronlardan ortalama 60 saniye boyunca elektrofizyolojik kayıt alındı. Alınan kayıttaki aksiyon potansiyel “peak”leri sayıldı ve kayıt süresine bölünerek her bir nöronun ateşleme frekansı hesaplandı. Tüm nöronlardan alınan frekanslar birleştirilerek izole ve sosyal gruptaki dişi ve erkek fareler için veri havuzu oluşturuldu. Şekil 4.9. ve 4.10’da izole ve sosyal gruptaki farelerin ARC Kisspeptin nöronundan alınan kayıt trasesi gösterildi.

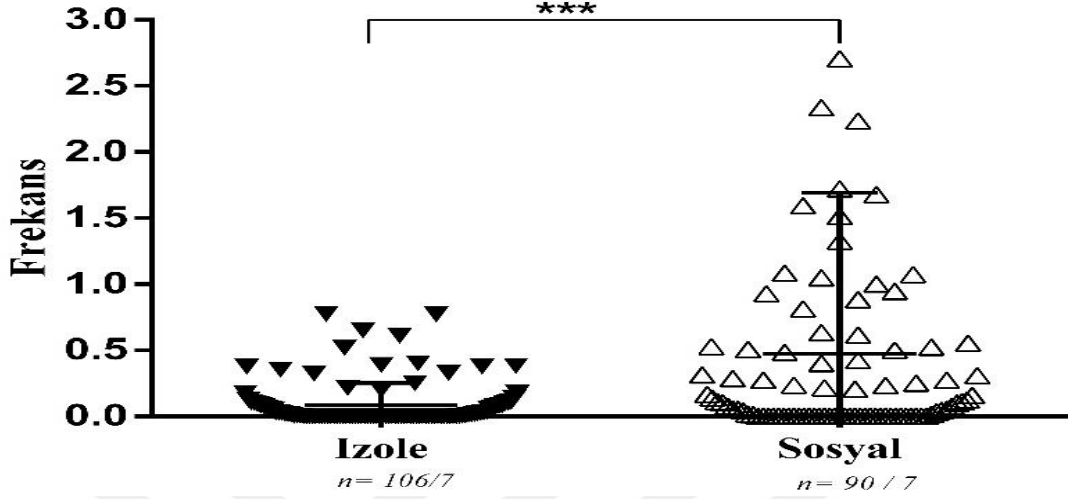


Şekil 4.9. İzole gruptaki dişi fare ARC Kisspeptin nöronlarından alınan aksiyon potansiyel kaydı örneği.



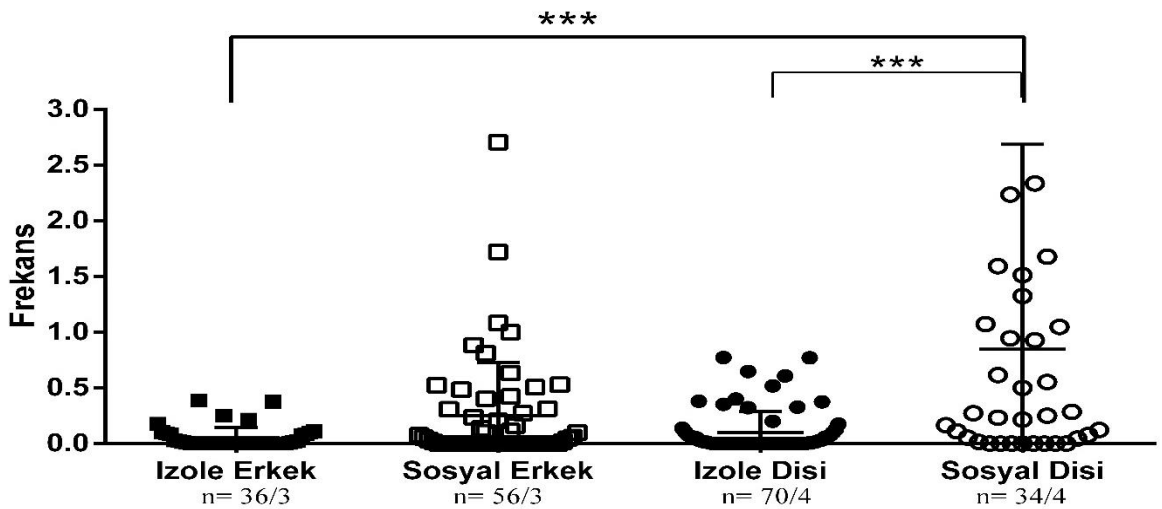
Şekil 4.10. Sosyal gruptaki dişi fare ARC Kisspeptin nöronlarından alınan aksiyon potansiyel kaydı örneği.

İzole ve sosyal gruptaki farelerin ARC Kisspetpin nöronlarının ateşleme frekansları Kolmogorov-Smirnov testi ile karşılaştırıldı. İzole ve Sosyal gruptaki tüm fareler arasında yüksek anlamlı fark gözlemlendi. ($p=0.0009$) (Şekil 4.8.)



Şekil 4.11. İzole ve Sosyal gruptaki farelerin ARC Kisspetpin nöronlarının spontan ateşleme frekansları. Kolmogorov-Smirnov testi, ***; $p<0.001$

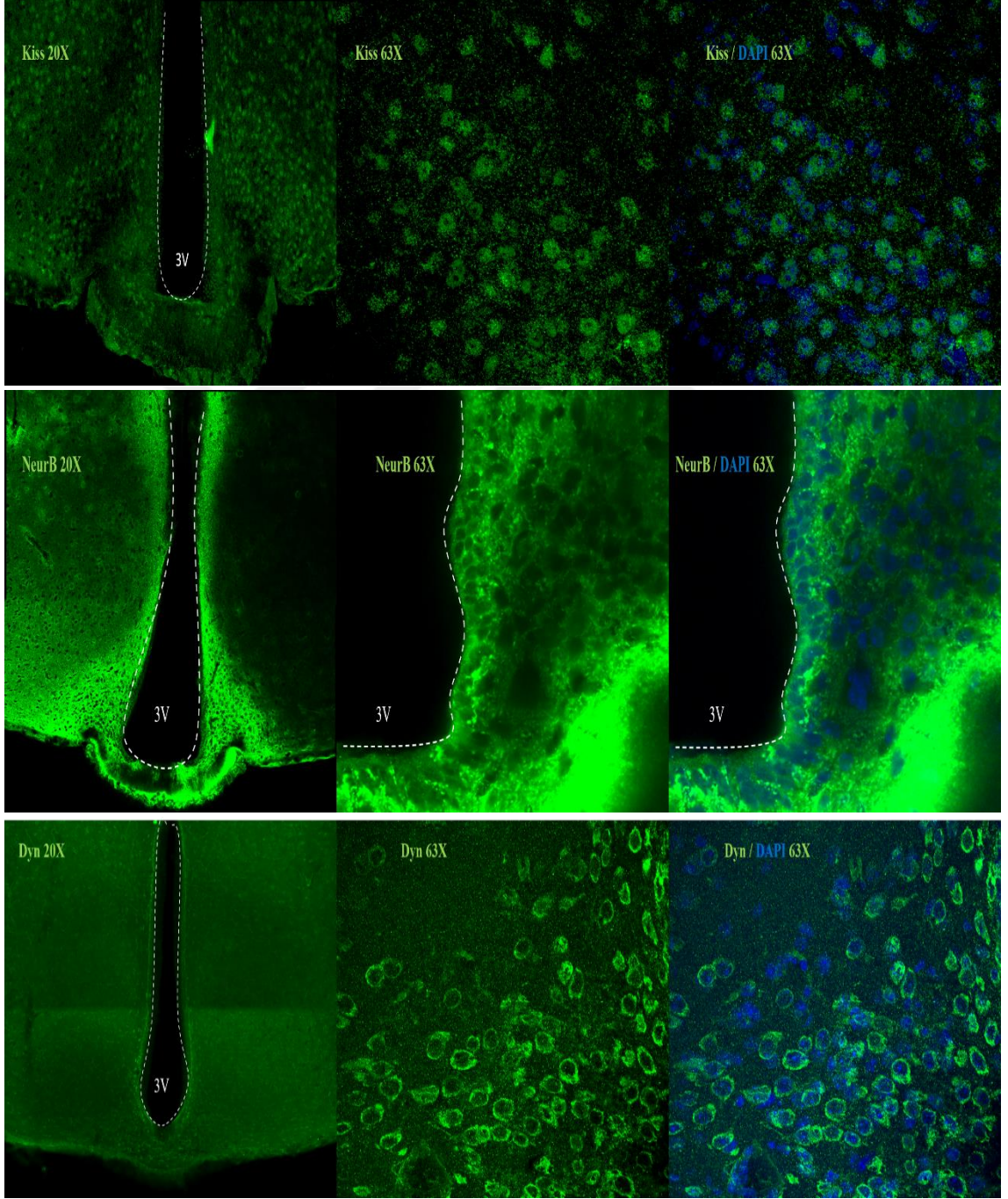
İzole ve sosyal gruptaki farelerin ARC Kisspetpin nöronlarının ateşleme frekansları cinsiyet olarak da karşılaştırıldı. Sosyal dişi farelerin ARC Kisspetpin nöronlarının ateşleme frekanslarının izole gruptaki dişi ve erkek farelerinkinden yüksek anlamlı olarak farklı olduğu görüldü (sırasıyla, $p=0.0004$, $p=0.0001$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.05$)



Şekil 4.12. İzole ve Sosyal gruptaki farelerin cinsiyete göre ARC Kisspetpin nöronlarının spontan ateşleme frekansları. Kolmogorov-Smirnov testi, ***; $p<0.001$

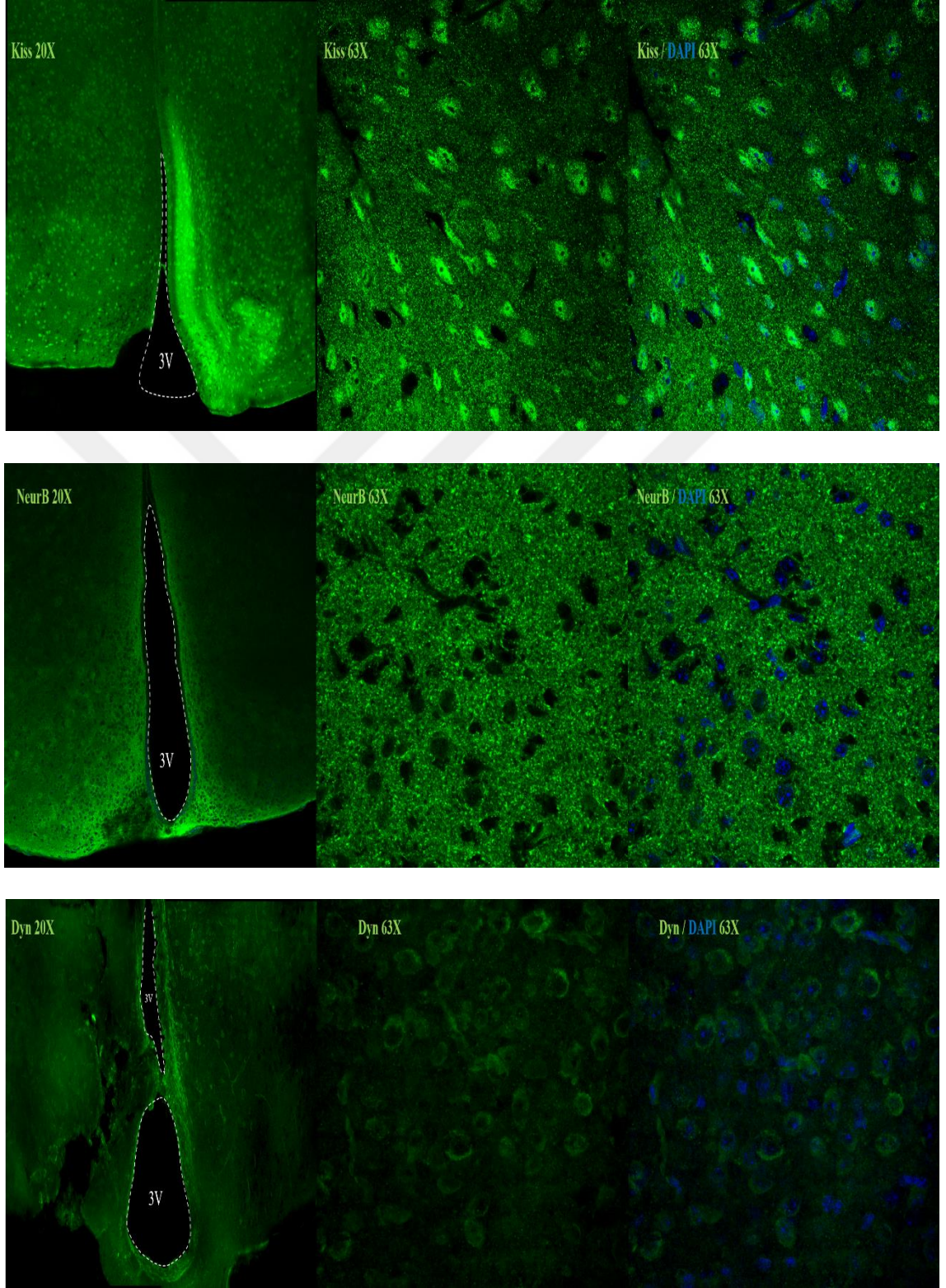
4.5. Erken Dönem Sosyal İzolasyonun ARC Bölgesindeki KNDy Üretimine Etkisi

Erken dönem sosyal izolasyonun KNDy üretimini nasıl etkilediğini araştırmak için bu nöropeptiler için immünfloresan boyaması yapıldı. Şekil 4.10’da izole grupraki farelerin Hipotalamik ARC bölgelerindeki Kisspeptin, Nörokinin B ve Dinorfin immünfloresan boyama örnekleri gösterildi.



Şekil 4.13. İzole gruptaki farlerde hipotalamik ARC bölgelerinde Kisspeptin, Nörokinin ve Dinorfin immünfloresan boyamaları.

Şekil 4.11’de sosyal grupraki farelerin Hipotalamik ARC bölgelerindeki Kisspeptin, Nörokinin B ve Dinorfin immünfloresan boyama örnekleri gösterildi.



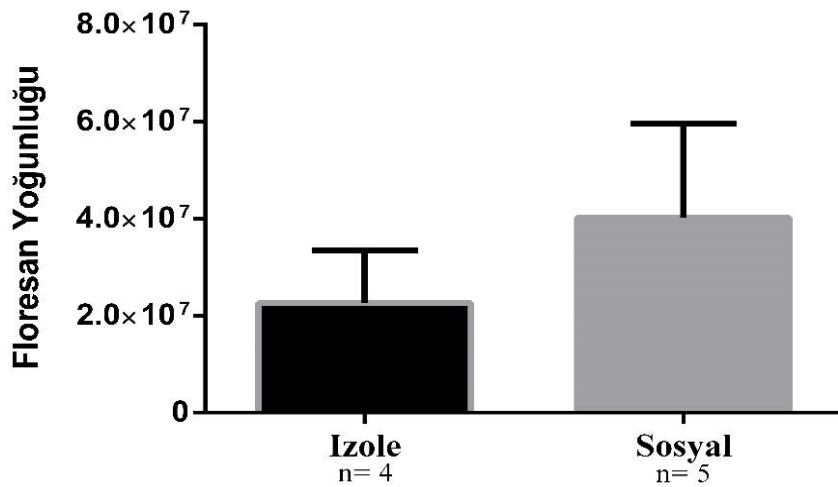
Şekil 4.14. Sosyal gruptaki farelerde hipotalamik ARC bölgelerinde Kisspeptin, Nörokinin ve Dinorfin immünfloresan boyamaları.

Boyama yapıldıktan sonra konfokal mikroskobu ile alınan görüntülerden ImageJ programı ile ARC bölgesindeki floresan ışımaya yoğunluğu ölçüldü ve sonrasında düzeltilmiş floresan yoğunluğu (CFI-Corrected Fluorescence Intensity) hesaplandı (Tablo 4.8.).

Tablo 4.8. İzole ve sosyal grup farelerin hipotalamik ARC bölgesinde KNDy immünfloresan boyaması floresan yoğunlukları.

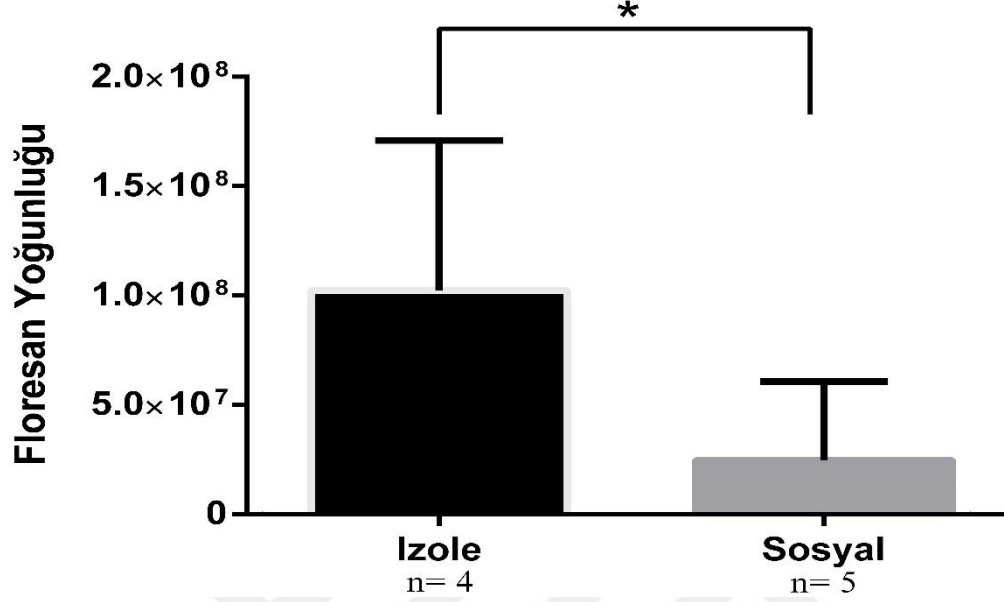
İzole Grup			
n	Kisspeptin	Neurokinin B	Dinorfin
1	13729394,6	31480469,6	13580187
2	13626280	55217287	18136387,8
3	26972378,2	156098846	15402899
4	35954256,4	165920173,4	67283888
Sosyal Grup			
n	Kisspeptin	Neurokinin B	Dinorfin
1	42328682,8	7271094	9147436,6
2	10526752,2	11657576,6	4833731,8
3	57285940,8	7620097	19096390,6
4	34013266,2	7936215	13629256
5	56798092,8	88943147	7175256,6

Her bir nöropeptid için izole ve sosyal gruplar arasında istatistiksel analiz *t* testi ile yapıldı. Kisspeptin floresan yoğunluğunun sosyal grupta daha fazla olduğu görüldü ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p=0.065$) (Şekil 4.12).



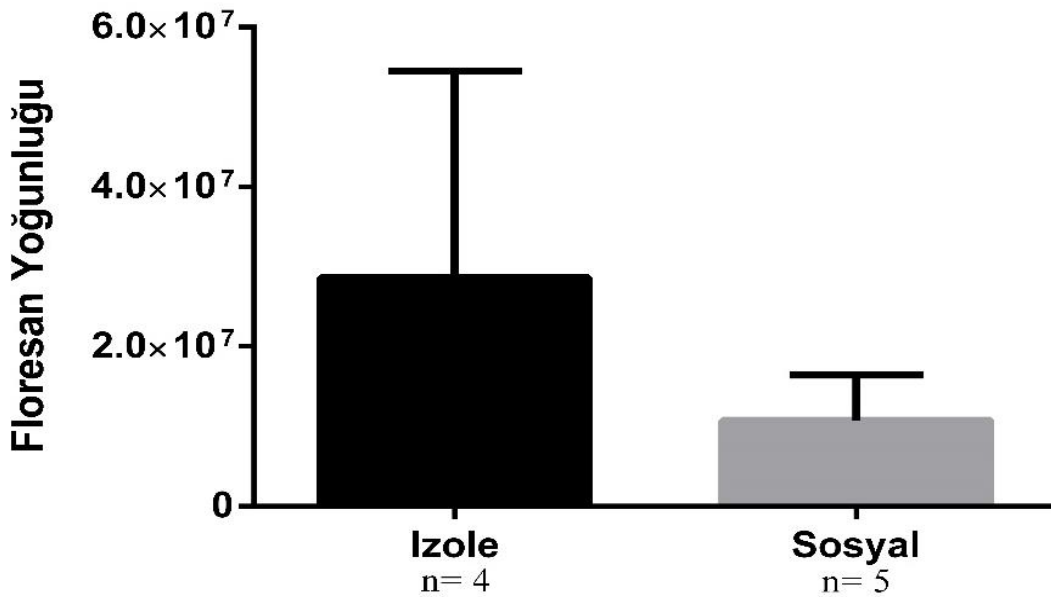
Şekil 4.15. İzole ve Sosyal grup farelerin hipotalamik ARC bölgelerinde Kisspeptin İmmünfloresan boyaması floresan yoğunluğu. *t* testi, $p>0.05$.

İzole gruptaki farelerin hipotalamik ARC bölgelerinde Nörokinin B floresan yoğunluğunun sosyal gruptaki farelere göre anlamlı olarak daha fazla olduğu görüldü ($p=0.032$) (Şekil 4.13.)



Şekil 4.16. İzole ve Sosyal grup farelerin hipotalamik ARC bölgelerinde Nörokinin B İmmüno Floresan boyaması floresan yoğunluğu. *t* testi, *, $p < 0.05$.

İzole gruptaki farelerin hipotalamik ARC bölgelerinde Dinorfin floresan yoğunluğunun sosyal gruptaki farelere göre daha fazla olduğu görüldü ancak istatistiksel olarak anlamlılık görülmedi ($p=0.085$) (Şekil 4.14.)



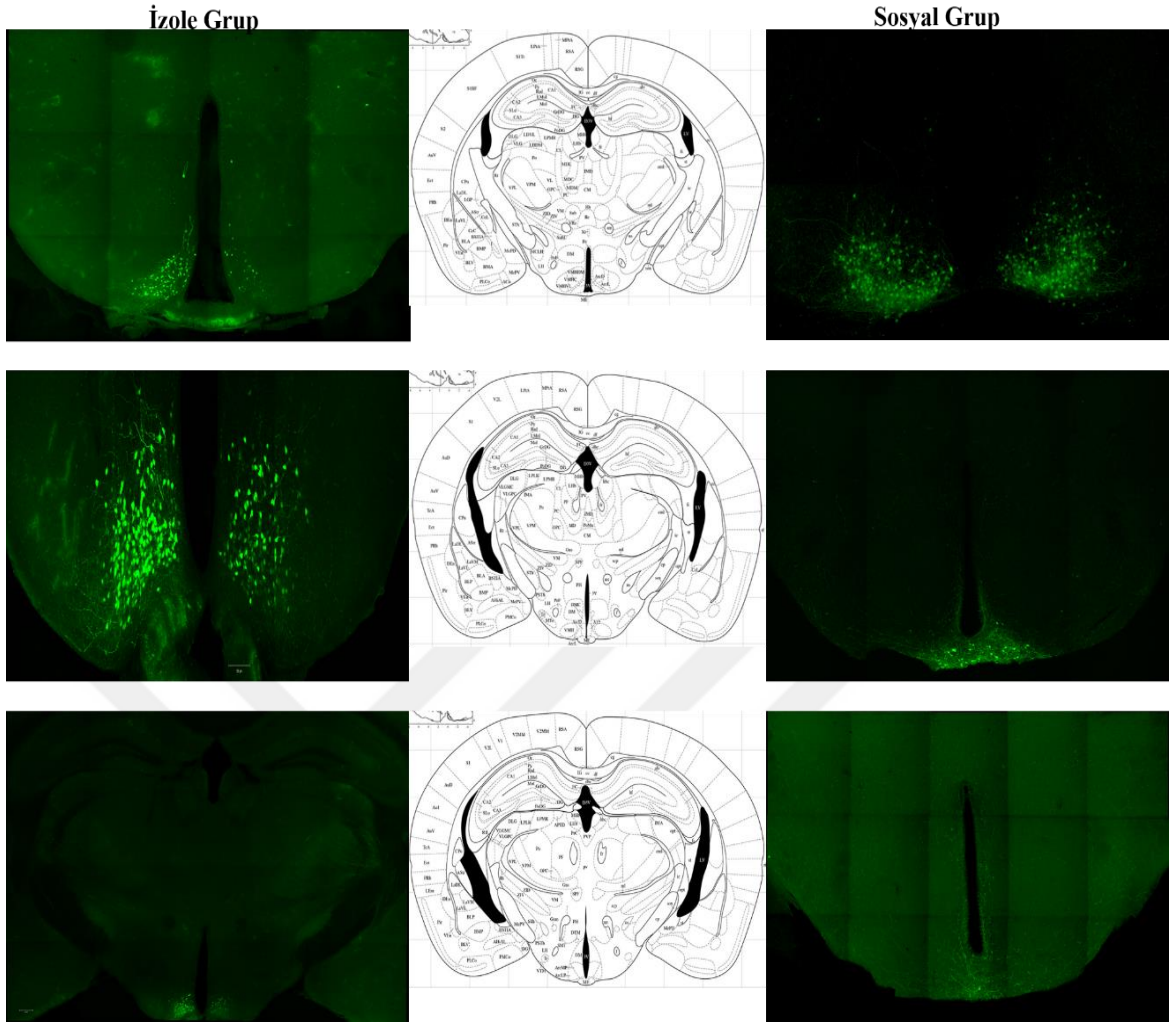
Şekil 4.17. İzole ve Sosyal grup farelerin hipotalamik ARC bölgelerinde Dinorfin İmmüno Floresan boyaması floresan yoğunluğu. *t* testi, $p > 0.05$.

4.6. Erken Dönem Sosyal İzolasyonun ARC Kisspeptin Nöronlarının Projeksiyonlarına Etkisi

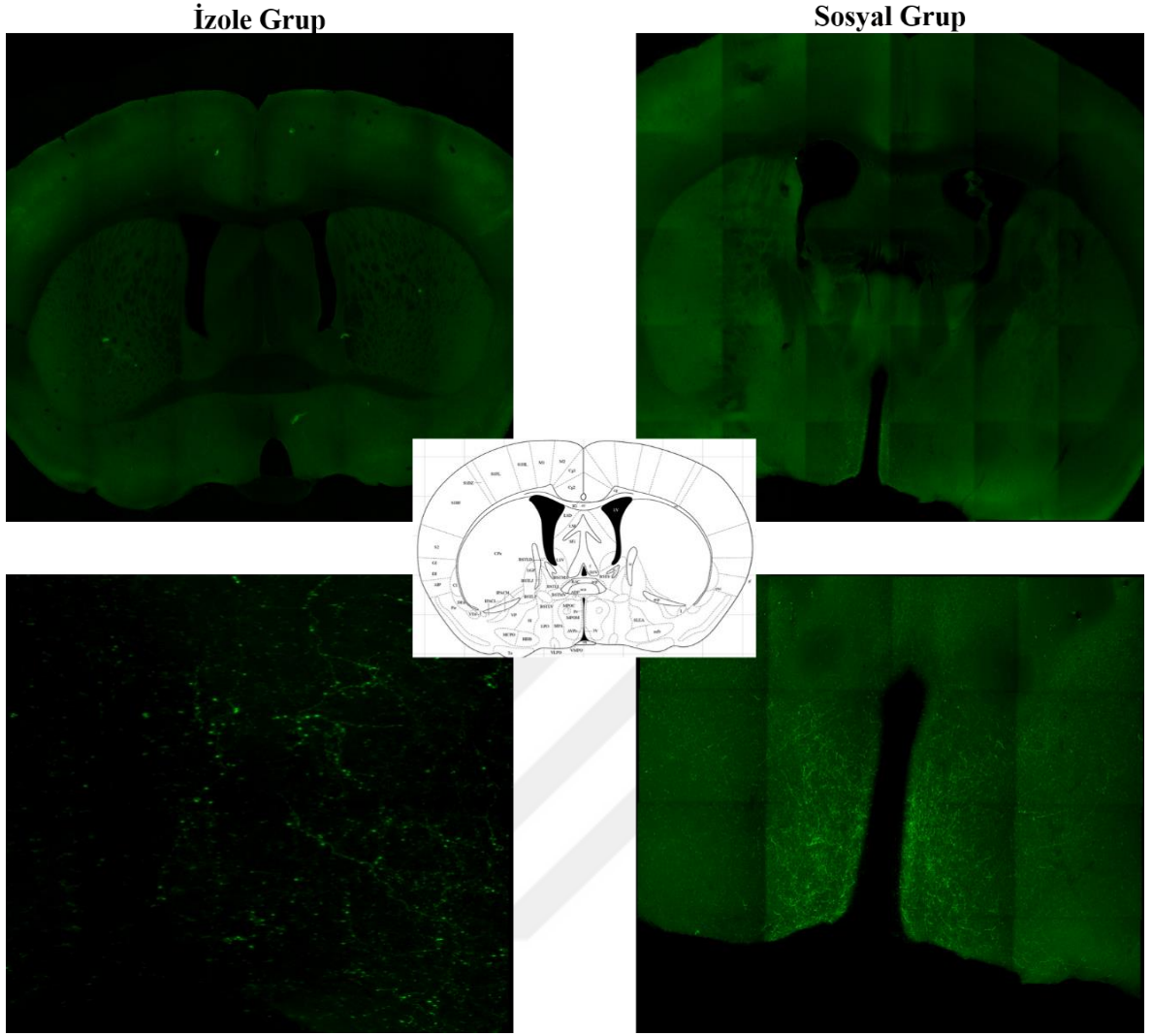
Erken dönem sosyal izolasyonun hipotalamik ARC Kisspeptin nöronlarının beynin farklı bölgelerine yaptığı projeksiyonlarının nasıl etkilendiğinin belirlenebilmesi için Kiss-Cre transgenik farelerin hipotalamik ARC bölgesine AAV-Flex-GFP enjeksiyonu yapıldı. Bu virüs ile hipotalamik ARC bölgesindeki Kisspeptin nöron somalarının ve aksonal uzantılarının GFP ifade etmesi hedeflendi. İzole ve sosyılan gruptaki farelerin Kisspeptin nöronlarının soma ve aksonlarından alınan GFP sinyalleri konfokal mikroskobunda görüntülenerek iki grup arasındaki farkın incelenmesi hedeflendi.

Yapılan görüntüleme incelemelerinde virüs enfeksiyonunun ARC bölgesinin dışına çıkan beyin kesitleri değerlendirmeye alınmadı. ARC bölgesinde virüs enfeksiyonu görülen kesitler beynin porterior ve anterior yönünde görüntülendi. Her iki grupta da ARC çevresindeki diğer hipotalamik bölgelere; Dorsomedial Hipotalamus (DMH), Lateral Hipotalamik Bölge (LHA), Ventral Tuberomammillary Çekirdek (VTM), Anterior Hipotalamik Bölge (AHA), Medial Preoptik Bölge (MPA), ARC Kisspeptin nöronlarının yoğun bir şekilde aksonal projeksiyonları gözlemlendi. (Şekil 4.15.)

Hipotalamik ARC Kisspeptin nöronlarının Antroventral Periventriküler (AVPV) çekirdeğe yaptığı projeksiyonlara bakıldığında, sosyal grupta yer alan farelerin beyinlerinin AVPV bölgesinde daha yoğun akson olduğu gözlemlendi. (Şekil 4.16.)



Şekil 4.18. İzole ve sosyal gruptaki farelerin hipotalamik ARC bölgesinde bulunan Kisspeptin nöronlarının aksonal uzantılarının hipotalamusta yayılımı. (Dişi farelerin beyin kesitleri görüntülendi)



Şekil 4.19. İzole ve sosyal gruptaki farelerin hipotalamik ARC Kisspeptin nöronlarının AVPV bölgesine yaptığı aksonal projeksiyonlar. (Dişi farelerin beyin kesitleri görüntülendi)

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, erken dönem sosyal izolasyonun kafes içi lokomotor aktivite ve beslenme davranışlarını nasıl etkilediği ve bu izolasyonun anksiyetik etkisi gözlemlendi. Bu amaçla kamera ve hareket sensörleriyle entegre bir kafes sistemi dizayn edildi ve deney modeli oluşturulduktan sonra farelerin davranışları bu kafeslerde takip edildi. Toplanan veriler excell programında işlenerek farelerin kafes içi lokomotor aktivite gibi pahalı ve karmaşık kapalı sistemler ile ölçülebilecek bir parametre basit ve sade bir yöntem ile elde edilmiş oldu. Sensörlerden elde edilen verilerin kamera kayıtlarıyla da uyumlu olduğu görüldü. Bu çalışmada ayrıca erken dönem sosyal izoalsyonun hipotalamik ARC Kisspeptin nöronlarının fonksiyonlarına ve projeksiyonlarına etkisi araştırıldı. Bu amaçla da çalışmada AAV-Flex-GFP enjeksiyonu ile Kisspeptin nöronlarını işaretleyebileceğimiz Kiss-Cre transgenik faresi kullanıldı.

2003 yılında yapılan bir çalışmada, emzirme sonrası erkek ve dişi farelerde 1-4 aylık bir izolasyon periyodunda gündüz fazında sabah 09:00-11:00 saatleri arasında lokomotor aktivitelere bakıldığında izole ve sosyal dişi fareler arasında bir fark olmadığı, izole erkek farelerin ise sosyal erkek farelerden daha yüksek lokomotor aktivite gösterdiği belirtilmiştir (9). 2020 yılında yayınlanan bir çalışmada kafes arkadaşlarının yanından alınan yetişkin erkek farelerin kafes içi hareketliliğinde azalma gözlemlendiği gösterilmiştir (61). Başka bir çalışmada ise erken dönemde ve erişkin dönemde sosyal izolasyona maruz bırakılan erkek sıçanların lokomotor aktiviteleri 60 dakikalık bir açık alan (Open Field) testinde, hız, mesafe ve hareket yüzdeleri kullanılarak derecelendirilmiş ve izole gruptaki sıçanların sosyal gruptaki sıçanlara göre daha yüksek lokomotor aktivite gösterdiği gösterilmiştir (62). Bu çalışmada gerçekleştirilen davranış deneylerinden elde edilen sonuçlara bakıldığında erken dönem sosyal izolasyonun erkek ve dişi farelerin kafes içi lokomotor aktivitelerini farklı yönde etkilediği görüldü. Literatürden de bilinen farelerin gece aktif hayvanlar olduğu yapılan davranış deneyinde de gözlemlenmiştir. Dişi-erkek tüm gruplar için kafes içi lokomotor aktivitenin gece fazında gündüz fazından daha yüksek olduğu görüldü. Cinsiyet farkı gözetilerek bakıldığında ise dişi farelerin erkek farelerden daha aktif olduğu görüldü. Dişi farelere grup farkı gözetilerek bakıldığında emzirme sonrası dönemde sosyal izolasyona maruz bırakılan dişi farelerin gece fazında sosyal dişi farelerden daha aktif olduğu gözlemlendi. Erkek farelerde ise bu durumun tersi olduğu, sosyal erkek farelerin gece fazında erken dönem izolasyona maruz kalan erkek farelerden daha aktif olduğu görüldü. Davranış deneyinin başladığı birinci

günden itibaren dişi farelerin hareketliliğinin azaldığı, erkek farelerin hareketliliğinin de arttığı, deneyin dördüncü gününde hareketlilik verilerinin birbirine yaklaştığı gözlemlendi. Gündüz fazına bakıldığında ise izole dişilerin diğer gruplardan daha aktif olduğu, sosyal dişi, izole ve sosyal erkeklerin hareketliliğinin de birbirine yakın olduğu görüldü. Bu çalışmada erken dönem sosyal izolasyonun farelerde cinsiyet farkları gözetilerek 24 saat süreyle yaşam alanı olan kafes içindeki hareketliliğine etkisi gösterilmektedir. Elde edilen bu veriler dişi farelerin erişkinlik öncesi sosyal izolasyona daha duyarlı olduğunu göstermektedir.

Kafes içi aktivitenin gözlemlendiği farelerin aynı zamanda beslenme davranışı da takip edildi. İzolasyon sonrası 5 günlük beslenme takibinde gruplar arası anlamlı bir fark görülmedi. Dişi ve erkek izole grupların sosyal gruplardan daha çok yem tükettiği, sosyal gruptaki farelerin yem tüketimini gün geçtikçe azaldığı görüldü. Sosyal gruplardaki bu azalış deney protokolü gereği sosyal farelerin deney süresince tek başına yaşamaya başlamasından kaynaklanabilir. Begni vark.(62) yaptığı çalışmada sosyal izolasyonun anksiyetik etkisini skorlamak için sıçanların açık alan testinde labirente bıraktıkları feces adetleri karşılaştırılmış ve anlamlı bir fark bulunamamıştır. Yapılan bu çalışmada da sosyal izolasyonun anksiyetik etkisinin yeme davranışından yorumlayabilmek için farelerin yemek yerken artık olarak oluşturdukları yem kırıntıları tartıldı ve karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlar sosyal gruptaki erkek farelerin izole gruptaki farelerden daha az yemk kırıntısı oluşturduğunu gösterdi. Ayrıca izole dişi farelerde artan kırıntı parçaların diğer gruplardakine göre daha büyük parçalar olduğu gözlemlendi. Elde edilen bu veri hem literatürde daha önce gösterilen (1,2,7) hem de bu çalışmada gerçekleştirilen anksiyete deney sonuçları ile uyumluluk göstermektedir.

Kemirgenlerde anksiyeteyi ölçmek için en yaygın kullanılan test “Artı Labiretn Testi”dir (63). Detayları gereç ve yöntem kısmında belirtilen testte farelerin açık kollarda daha fazla süre geçirmesi daha az anksiyetik olduğunun göstergesidir (63). Şimdiye kadar yapılan sosyal izolasyon çalışmalarında, hem erken dönem ve hem de erişkin dönem izolasyonlarda izole grupların kapalı kolda daha fazla vakit geçirerek anksiyetik davranış gösterdiği belirtilmektedir (1,2,7). Çalışmada da ulaşılan sonuçlar literatür ile uyumludur; sosyal gruptaki fareler anlamlı olarak açık kollarda daha fazla vakit geçirirken izolasyon grubundaki fareler ise anlamlı olarak kapalı kollarda daha fazla vakit geçirmişlerdi. Bu davranış video kayıtlardan oluşturulan ısı haritasında da görülmektedir. Kafes içi

lokomotor aktivite testinde kullanılan farelere ikinci bir davranış testi uygulamak tercih edilmediği için artı labirent testinde kullanılan fare sayısı diğer deneylere kıyasla daha az olsa da istatistiksel olarak anlamlı veri elde edilebilmiştir. Bu çalışmada ayrı bir deney kurgulamasına gerek kalmadan, yeme davranışından da anksiyete ölçümü yapılabileceği gösterildi.

Erken dönem sosyal izolasyonun HPG aksının gelişimini ve erişkinlik döneminde HPG aksındaki nöroendokrin mekanizmaları etkilediği daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. 2 haftalık erken dönem sosyal izolasyonun da beynin farklı bölgelerindeki nöron gruplarının elektriksel aktivitelerini etkilediği, Rafe Çekirdeğinde Serotonin nöronlarının ateşleme frekanslarını baskıladığı (64), Intra-Bazolateral Amigdala'da (BLA) bulunan piramidal nöronların aksiyon potansiyel (spike) sayısını arttırdığı (65) gösterilmiştir. Bu çalışmada erken dönem sosyal izolasyonun HPG aksının beyindeki kritik noktalarından biri olan hipotalamik ARC Kisspeptin nöronlarının elektriksel aktivitesini nasıl etkilediğini incelemek amacıyla ARC Kisspeptin nöronlarından ex-vivo elektrofizyoloji kaydı alındı. Elde edilen verilere bakıldığında erken dönem sosyal izolasyonun ARC Kisspeptin nöronlarının ateşleme frekansını baskıladığı, sosyal gruptaki farelerin ARC Kisspeptin nöronlarının aksiyon potansiyel frekansının anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü. Bu veriler cinsiyet farkı gözetilerek incelendiğinde sosyal gruptaki dişi farelerin ARC Kisspeptin nöronlarının ateşleme frekanslarının izole gruptaki erkek ve dişi farelerin ARC Kisspeptin nöronların ateşleme frekansından anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü. Sosyal gruptaki erkek farelerin verileri ile diğer gruptaki veriler arasında anlamlı bir fark görülmedi. İzole gruptaki farelerden alınan kayıtlarda bir çok nörona sağlıklı bir bağlantı yapıldığı ve nöron uyarıldığı halde aksiyon potansiyel ateşlemesi göstermediği görüldü. Erken dönem sosyal izolasyonun ARC Kisspeptin nöronlarının elektriksel aktivitesi üzerine etkisi ilk defa bu çalışmada gösterilmiş oldu.

Hipotalamik ARC Kisspeptin nöronlarının HPG aksındaki fonksiyonu bu nöronlarda birlikte ifade edilen Kisspeptin/Nörokinin B/Dinorfin (KNDy) nöropeptitler tarafından kontrol edilmektedir (42). KNDy nöropeptidleri GnRH salınımında kritik öneme sahiptir. Bu nöropeptidlerin ve reseptörlerinin disfonksiyonun olduğu durumlarda HPG aksının da düzenli çalışmadığı gösterilmiştir (66). Erken dönem sosyal izolasyonun KNDy nöropeptidlerinin ifade edilmesini nasıl etkilediğini incelemek için

İmmünfloresan boyama tekniği kullanıldı. Hipotalamik ARC bölgesinde sosyal farelerde Kisspeptin yoğunluğunun daha fazla görüldü. Bu sonuç elektrofizyoloji deneylerinden elde edilen bulgular ile uyumluluk göstermektedir. Sıçanlarda yapılan erken dönem sosyal izolasyon çalışmasında izole sıçanların Nükleus Akkumbens bölgesinde Dinorfin/Kappa Opioid Reseptör sisteminin fonksiyonun arttığı görülmüştür (67). Bu çalışmada da immünfloresan boyamaları izole gruptaki farelerin hipotalamik ARC bölgesinde Dinorfin miktarının daha fazla olduğunu gösterdi. İzolasyon stresine maruz bırakılan farelerde, tüm beyin bölgelerinde, Nörokinin B ve reseptörünün mRNA düzeyinde ifade edilmesinin sosyal gruplara göre daha fazla olduğu gösterilmişti (15). Bu çalışmada da izole gruptaki farelerin hipotalamik ARC bölgelerinde Nörokinin B miktarının sosyal gruptakilere göre anlamlı olarak daha fazla olduğu görüldü. Bağımlık ve bazı psikolojik patolojilerle ilgili yapılan çalışmalarda izolasyon stresinin beyin farklı bölgelerinde Dinorfin ve Nörokinin B peptidlerinin ve bu peptidlerin resöptlerinin üretimlerini ve fonksiyonlarını etkilediğini göstermiştir. Bu iki nöropeptid ile birlikte hipotalamik ARC çekirdeğinde aynı hücrelerde üretilip salınan Kisspeptin'in erken dönem sosyal izolasyondan nasıl etkileneceği bu tez çalışmasında gösterildi.

Fare beyinde Kisspeptin nöron popülasyonlarının ARC, AVPV ve Amigdala bölgelerinde yoğunlukta olduğu, bu bölgelerdeki Kisspeptin nöron yoğunluğunun ve fonksiyonlarının, bu nöronların yaptığı projeksiyonların cinsiyete göre farklılık gösterdiği Cre-Rekombinaz teknolojisi kullanılarak detaylı olarak çalışılmıştır (36). ARC Kisspeptin nöronlarına beyin farklı bölgelerinden gelen nöronal girdiler detaylı olarak gösterilmişti (50). Sıçanlarla yapılan bir çalışmada gebeliğin üçüncü trimesterinde ARC Kisspeptin nöronlarının Supraoptik çekirdeğin (SON) perinükleer bölgesine (PNZ) yaptığı projeksiyonların ilk iki trimestere göre arttığı gösterilmiştir (52). HPG aksında kritik rol oynayan Kisspeptin nöronlarının hem elektriksel aktivitelerinin hem de nöropeptid üretiminin erken dönem sosyal izolasyondan etkilendiği gösterildikten sonra bu nöronların yaptığı projeksiyonların da izolasyon stresine karşı farklılık gösterebileceği düşünüldü. Bu amaçla da erken dönem izolasyon ve sosyal gruptaki Kiss-Cre farelere AAV-Flex-GFP enjeksiyonu yapılarak ARC Kisspeptin nöronlarının yaptığı aksonal projeksiyonlar incelendi. Bu deneyden doğru ve anlamlı sonuç alabilmek için yapılan enjeksiyonun koordinatları kadar enjekte edilen virüs miktarı da önemlidir. Bu deneyde gruplar arasında karşılaştırma yapabilmek için ARC bölgesi dışında virüs enfeksiyon görülen kesitler elendi. İncelenen kesitlere bakıldığında AVPV dışında ARC Kisspeptin

nöronlarının yaptığı projeksiyonların izole ve sosyal grupları arasında bir farklılık göstermediği görüldü. Sosyal grupta AVPV bölgesine yapılan projeksiyon yoğunluğunun daha fazla olduğu görüldü. ARC dışında görülen virüs enfeksiyonlu kesitlerin elenmesi sebebiyle bu deney grubunda incelenen örnek miktarı diğer deneylere göre daha düşüktü.

Dişi farelerde ARC Kisspeptin nöronlarının günlük yem tüketiminin zamanlamasını, lokomotor aktivite, uyku ve vücut sıcaklığının sirkadiyen düzenlenmesini kontrol ettiği ve bunu Suprakiazmatik Çekirdeğe yaptığı projeksiyon ile yaptığı gösterilmiştir (55). Bu çalışmada öncelikle erken dönem sosyal izolasyonun kafes içi lokomotor aktivite ve beslenme davranışına etkisi araştırıldı, sonrasında da sosyal izolasyonun Kisspeptin nöronlarının fonksiyon ve yaptığı projeksiyonlara etkisi incelendi. Sonuç olarak erken dönem sosyal izolasyonun dişi ve erkek farelerin ARC Kisspeptin nöronlarının fonksiyonunu ve bu nöronların düzenlediği fizyolojiye bağlı davranışları etkileyebileceğini gösterildi. Elde edilen verilerin ergenlik dönemde maruz kalınan sosyal izolasyon stresinin erişkinlik dönemde sebep olduğu davranışsal ve fizyolojik problemlerin Kisspeptin-HPG aksı da dikkate alınarak değerlendirilip çözüm stratejilerine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. Erken dönem sosyal izolasyonun Kisspeptin nöronlarının nöroendokrin mekanizmadaki rolünden ötürü LH salınımına etkisi, puberteye giriş süresine ve menstrual döngüye etkisi çalışmanın devamı olarak planlanmaktadır. Ayrıca izole gruptaki Kisspeptin nöronlarının projeksiyonlarının enjeksiyon koordinatı ve virüs yoğunluğundan bağımsız olarak araştırılabilmesi için Kiss-Cre-tdTomato-reporter fareler (36) kullanılarak bu deneylerin tekrarlanması planlandı.

6. KAYNAKLAR

1. Walker DM, Cunningham AM, Gregory JK, Nestler EJ. Long-Term Behavioral Effects of Post-weaning Social Isolation in Males and Females. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2019; 13, 1-20.
2. Walker DM, Bell MR, Flores C, Gulley JM, Willing J, Paul MJ. Adolescence and Reward: Making Sense of Neural and Behavioral Changes Amid the Chaos. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2017. 45, 10855–10866.
3. Colledge WH. Kisspeptins and GnRH neuronal signalling. *Trends in endocrinology and metabolism*. 2009. 20, 115–121.
4. d'Anglemont de Tassigny X, Colledge WH. The Role of Kisspeptin Signaling in Reproduction. *Physiology (Bethesda)*. 2010. 25(4):207-217.
5. Yeo SH, Colledge WH. The Role of Kiss1 Neurons As Integrators of Endocrine, Metabolic, and Environmental Factors in the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis. *Frontiers in endocrinology*. 2018. 9, 188-201.
6. Ladd GW, Ettekal I, Kochenderfer-Ladd B, Rudolph KD, Andrews RK. Relations among chronic peer group rejection, maladaptive behavioral dispositions, and early adolescents' peer perceptions. *Child Development*. 2014. 85, 971–988.
7. Burke AR, McCormick CM, Pellis SM, Lukkes JL. Impact of adolescent social experiences on behavior and neural circuits implicated in mental illnesses. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2017. 76, 280-300.
8. de Goede J, van der Mark-Reeuwijk KG, Braun KP, et al. Alcohol and Brain Development in Adolescents and Young Adults: A Systematic Review of the Literature and Advisory Report of the Health Council of the. *Adv Nutr*. 2021;nmaa170.
9. Guo M, Wu CF, Liu W, Yang JY, Chen D. Sex difference in psychological behavior changes induced by long-term social isolation in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2004;28(1):115-121.
10. Huang Q, Zhou Y, Liu LY. Effect of post-weaning isolation on anxiety- and depressive-like behaviors of C57BL/6J mice. *Exp Brain Res*. 2017;235(9):2893-2899.

11. Tomova L, Wang KL, Thompson T, et al. Acute social isolation evokes midbrain craving responses similar to hunger. *Nat Neurosci.* 2020;23(12):1597-1605.
12. Clair R, Gordon M, Kroon M, Reilly C. The effects of social isolation on well-being and life satisfaction during pandemic. *Humanit Soc Sci Commun.* 2021.8, 28.
13. Matsumoto K, Fujiwara H, Araki R, Yabe T. Post-weaning social isolation of mice: A putative animal model of developmental disorders. *J Pharmacol Sci.* 2019;141(3):111-118.
14. Keesom SM, Morningstar MD, Sandlain R, Wise BM, Hurley LM. Social isolation reduces serotonergic fiber density in the inferior colliculus of female, but not male, mice. *Brain Res.* 2018;1694:94-103.
15. Zelikowsky M, Hui M, Karigo T, et al. The Neuropeptide Tac2 Controls a Distributed Brain State Induced by Chronic Social Isolation Stress. *Cell.* 2018;173(5):1265-1279.e19.
16. Zakharova E, Miller J, Unterwald E, Wade D, Izenwasser S. Social and physical environment alter cocaine conditioned place preference and dopaminergic markers in adolescent male rats. *Neuroscience.* 2009;163(3):890-897.
17. Whitaker LR, Degoulet M, Morikawa H. Social deprivation enhances VTA synaptic plasticity and drug-induced contextual learning. *Neuron.* 2013;77(2):335-345.
18. Lampert C, Arcego DM, de Sá Couto-Pereira N, et al. Short post-weaning social isolation induces long-term changes in the dopaminergic system and increases susceptibility to psychostimulants in female rats. *Int J Dev Neurosci.* 2017;61:21-30.
19. Romeo RD. The Teenage Brain: The Stress Response and the Adolescent Brain. *Curr Dir Psychol Sci.* 2013;22(2):140-145.
20. Garabedian MJ, Harris CA, Jeanneteau F. Glucocorticoid receptor action in metabolic and neuronal function. *F1000Res.* 2017;6:1208. Published 2017 Jul 24.
21. Lander SS, Linder-Shacham D, Gaisler-Salomon I. Differential effects of social isolation in adolescent and adult mice on behavior and cortical gene expression. *Behav Brain Res.* 2017;316:245-254.
22. Sun M, Choi EY, Magee DJ, Stets CW, During MJ, Lin EJ. Metabolic Effects of Social Isolation in Adult C57BL/6 Mice. *Int Sch Res Notices.* 2014;2014:690950. Published 2014 Nov 26.

23. Priestnall R. The effects of litter size and post-weaning isolation or grouping on adult emotionality in C3H mice. *Dev Psychobiol.* 1973;6(3):217-224.
24. Hohlbaum K, Frahm S, Rex A, Palme R, Thöne-Reineke C, Ullmann K. Social enrichment by separated pair housing of male C57BL/6JRj mice. *Sci Rep.* 2020;10(1):11165.
25. Zorzo C, Méndez-López M, Méndez M, Arias JL. Adult social isolation leads to anxiety and spatial memory impairment: Brain activity pattern of COx and c-Fos. *Behav Brain Res.* 2019;365:170-177.
26. Blaustein JD, Ismail N, Holder MK. Review: Puberty as a time of remodeling the adult response to ovarian hormones. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2016;160:2-8.
27. Mayer C, Acosta-Martinez M, Dubois SL, et al. Timing and completion of puberty in female mice depend on estrogen receptor alpha-signaling in kisspeptin neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(52):22693-22698.
28. Cacioppo JT, Cacioppo S, Capitanio JP, Cole SW. The neuroendocrinology of social isolation. *Annu Rev Psychol.* 2015;66:733-767.
29. Marques P, Skorupskaite K, George JT, et al. Physiology of GNRH and Gonadotropin Secretion. [Updated 2018 Jun 19]. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279070/>
30. Prevot, V. *Puberty in Mice and Rats*. Massachusetts; Academic Press; 2015
31. Gaytan F, Morales C, Leon S, et al. Development and validation of a method for precise dating of female puberty in laboratory rodents: The puberty ovarian maturation score (Pub-Score). *Sci Rep.* 2017;7:46381.
32. Kumar D, Boehm U. Genetic dissection of puberty in mice. *Exp Physiol.* 2013;98(11):1528-1534.
33. Colledge WH, Doran J, Mei H. Model systems for studying kisspeptin signalling: mice and cells. *Adv Exp Med Biol.* 2013;784:481-503.
34. Colledge WH. GPR54 and kisspeptins. *Results Probl Cell Differ.* 2008;46:117-143.
35. Colledge WH. Transgenic mouse models to study Gpr54/kisspeptin physiology. *Peptides.* 2009;30(1):34-41.

36. Yeo SH, Kyle V, Morris PG, et al. Visualisation of Kiss1 Neurone Distribution Using a Kiss1-CRE Transgenic Mouse. *J Neuroendocrinol.* 2016;28(11):10.1111/jne.12435.
37. Clarkson J, d'Anglemont de Tassigny X, Colledge WH, Caraty A, Herbison AE. Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. *J Neuroendocrinol.* 2009;21(8):673-682.
38. Clarkson J, Shamas S, Mallinson S, Herbison AE. Gonadal steroid induction of kisspeptin peptide expression in the rostral periventricular area of the third ventricle during postnatal development in the male mouse. *J Neuroendocrinol.* 2012;24(6):907-915.
39. Clarkson J, d'Anglemont de Tassigny X, Colledge WH, Caraty A, Herbison AE. Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. *J Neuroendocrinol.* 2009;21(8):673-682.
40. Sisk CL, Foster DL. The neural basis of puberty and adolescence. *Nat Neurosci.* 2004;7(10):1040-1047.
41. Clarkson J, Herbison AE. Oestrogen, kisspeptin, GPR54 and the pre-ovulatory luteinising hormone surge. *J Neuroendocrinol.* 2009;21(4):305-311.
42. Moore AM, Coolen LM, Lehman MN. Kisspeptin/Neurokinin B/Dynorphin (KNDy) cells as integrators of diverse internal and external cues: evidence from viral-based monosynaptic tract-tracing in mice. *Sci Rep.* 2019;9(1):14768.
43. Leng, G., *The Heart of The Brain*. Cambridge: The MIT Press; 2018.
44. Feng T, Bai JH, Xu XL, Liu Y. Kisspeptin and its Effect on Mammalian Spermatogenesis. *Curr Drug Metab.* 2019;20(1):9-14.
45. Clarkson J, Busby ER, Kirilov M, Schütz G, Sherwood NM, Herbison AE. Sexual differentiation of the brain requires perinatal kisspeptin-GnRH neuron signaling. *J Neurosci.* 2014;34(46):15297-15305.
46. Grachev P, Li XF, O'Byrne K. Stress regulation of kisspeptin in the modulation of reproductive function. *Adv Exp Med Biol.* 2013;784:431-454.
47. Adekunbi DA, Li XF, Lass G, et al. Kisspeptin neurones in the posterodorsal medial amygdala modulate sexual partner preference and anxiety in male mice. *J Neuroendocrinol.* 2018;30(3):e12572.
48. Iwasa T, Matsuzaki T, Yano K, Mayila Y, Irahara M. The roles of kisspeptin and gonadotropin inhibitory hormone in stress-induced reproductive disorders. *Endocr J.* 2018;65(2):133-140.

49. Muñoz M, Coveñas R. Neurokinin receptor antagonism: a patent review (2014-present). *Expert Opin Ther Pat.* 2020;30(7):527-539.
50. Yeo SH, Kyle V, Blouet C, Jones S, Colledge WH. Mapping neuronal inputs to Kiss1 neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *PLoS One.* 2019;14(3):e0213927. Published 2019 Mar 27.
51. Pineda R, Sabatier N, Ludwig M, Millar RP, Leng G. A Direct Neurokinin B Projection from the Arcuate Nucleus Regulates Magnocellular Vasopressin Cells of the Supraoptic Nucleus. *J Neuroendocrinol.* 2016;28(4):10.1111/jne.12342.
52. Seymour AJ, Scott V, Augustine RA, Bouwer GT, Campbell RE, Brown CH. Development of an excitatory kisspeptin projection to the oxytocin system in late pregnancy. *J Physiol.* 2017;595(3):825-838.
53. Hrabovszky E, Takács S, Göcz B, Skrapits K. New Perspectives for Anatomical and Molecular Studies of Kisspeptin Neurons in the Aging Human Brain. *Neuroendocrinology.* 2019;109(3):230-241.
54. Hellier V, Brock O, Candlish M, et al. Female sexual behavior in mice is controlled by kisspeptin neurons. *Nat Commun.* 2018;9(1):400.
55. Padilla SL, Perez JG, Ben-Hamo M, et al. Kisspeptin Neurons in the Arcuate Nucleus of the Hypothalamus Orchestrate Circadian Rhythms and Metabolism. *Curr Biol.* 2019;29(4):592-604.e4.
56. Shruti S, Prevot V. A kiss to set the rhythm. *Elife.* 2016;5:e19823. Published 2016 Aug 25.
57. Oike H, Ogawa Y, Oishi K. Simple and Quick Visualization of Periodical Data Using Microsoft Excel. *Methods Protoc.* 2019;2(4):81.
58. Almeida SS, Araújo M, Moreira GM, Paiva RV, de Oliveira LM. Short-Term Social Isolation Does Not Reduce Elevated Plus-Maze Exploration in Early Protein Malnourished Rats. *Nutr Neurosci.* 1998;1(2):103-110.
59. Paxinos G., Franklin K. *Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinate (4th Edition).* Massachusetts; Academic Press. 2012
60. Ting JT, Lee BR, Chong P, et al. Preparation of Acute Brain Slices Using an Optimized N-Methyl-D-glucamine Protective Recovery Method. *J Vis Exp.* 2018;(132):53825.
61. Clemenza K, Weiss SH, Cheslack K, Kandel DB, Kandel ER, Levine AA. Social isolation is closely linked to a marked reduction in physical activity in male mice

- [published online ahead of print, 2020 Dec 26]. *J Neurosci Res*. 2020;10.1002/jnr.24777.
62. Begni V, Sanson A, Pfeiffer N, et al. Social isolation in rats: Effects on animal welfare and molecular markers for neuroplasticity. *PLoS One*. 2020;15(10):e0240439. Published 2020 Oct 27.
 63. Himanshu; Dharmila, Sarkar D; Nutan. A Review of Behavioral Tests to Evaluate Different Types of Anxiety and Anti-anxiety Effects. *Clin Psychopharmacol Neurosci*. 2020;18(3):341-351.
 64. Oliver DK, Intson K, Sargin D, et al. Chronic social isolation exerts opposing sex-specific consequences on serotonin neuronal excitability and behaviour. *Neuropharmacology*. 2020;168:108015.
 65. Lin S, Li X, Chen YH, et al. Social Isolation During Adolescence Induces Anxiety Behaviors and Enhances Firing Activity in BLA Pyramidal Neurons via mGluR5 Upregulation. *Mol Neurobiol*. 2018;55(6):5310-5320.
 66. Lehman MN, Coolen LM, Goodman RL. Importance of neuroanatomical data from domestic animals to the development and testing of the KNDy hypothesis for GnRH pulse generation. *Domest Anim Endocrinol*. 2020;73:106441.
 67. Butler TR, Karkhanis AN, Jones SR, Weiner JL. Adolescent Social Isolation as a Model of Heightened Vulnerability to Comorbid Alcoholism and Anxiety Disorders. *Alcohol Clin Exp Res*. 2016;40(6):1202-1214.

7. EKLER

7.1. Etik Kurul Onay Formu



T.C. YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYER)

ETİK KURUL KARARI

Protokol No	Toplantı Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar No	Proje Yürütücüsü
2020-836	18.02.2020	2020/02	2020/02-18	Prof. Dr. Bayram Yılmaz
"Transgenik Fare Kisseptin Nöronlarında Sosyal İzolasyon İlişkili Fonksiyonel ve Aksoneal Plastisitenin Araştırılması" isimli proje oy birliğiyle etik açıdan uygun görülmüştür.				
Hayvan Türü / Irkı		Toplam Hayvan Sayısı		Hayvanın Cinsiyeti
Fare / Kiss-Cae		96		Erkek ve Dişi

Görevi	Adı Soyadı
Başkan	Prof. Dr. Bayram YILMAZ
Başkan Vekili	Prof. Dr. Erdem YEŞİLADA
Üye	Veteriner Hekim Engin SÜMER
Üye	Prof. Dr. M. Ece GENÇ
Üye	Prof. Dr. Rukset ATTAR
Üye	Prof. Dr. Gamze TORUN KÖSE
Üye	Doç. Dr. Ediz DENİZ
Üye	Doç. Dr. Aylin YABA UÇAR
Üye	Doç. Dr. Burcu GEMİCİ BAŞOL
Üye	Hakan GÖKSEL
Üye	Ahmet ŞENKARDEŞLER

7.2. İntihal Raporu İlk Sayfası

Transgenik Fare Kisspeptin Nöronlarında Erken Dönem Sosyal İzolasyon İlişkili Fonksiyonel ve Aksonal Plastisitenin Araştırılması

ORJİNALLİK RAPORU

%5	%4	%3	%3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Yeditepe University Öğrenci Ödevi	%1
2	www.turkiyetaekwondofed.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
3	EROĞLU, Ünsal, KOPARAL, Murat Yavuz, ÜRE, İyimser, ÇETİN, Serhat, BULUT, Ender Cem, ACAR, Cenk and SÖZEN, Tevfik Sinan. "Adrenalektomi Yapılan Hastaların Klinik, Onkolojik, Fonksiyonel ve Cerrahi Sonuçları", Galenos Yayınevi, 2016. Yayın	<%1
4	"Poster Özetleri / Poster Abstracts", Turkish Journal of Biochemistry, 2015 Yayın	<%1
5	sabe.yeditepe.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	"Abstracts of the 47th Annual Meeting of the	

Alıntıları çıkart üzerinde Eşleşmeleri çıkar < 5 words
Bibliyografyayı Çıkart üzerinde

YAZAR	BAŞLIK	BENZERLİK	PUANLA	CEVAP	DOSYA	ÖDEV NUMARASI	TARİH
☐ Sami Ağuş	Transgenik Fare Kisspeptin Nöronlarında ...	%5	--	--		1510011241	15-Şub-2021

7.3. Özgeçmiş

Kişisel Bilgiler

Adı	Sami	Soyadı	AĞUŞ
Doğum Yeri		Doğum Tarihi	
Uyruğu		TC Kimlik No	
E-mail		Tel	

Öğrenim Durumu

Derece	Alan	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora	Fizyoloji	Yeditepe Üniversitesi	2021
Yüksek Lisans	Biyoteknoloji	Yeditepe Üniversitesi	2015
Lisans	Genetik ve Biyomühendislik	Yeditepe Üniversitesi	2011
Lise	Fen	Bergama Cumhuriyet Lisesi	2004

Bildiği Yabancı Dilleri	Yabancı Dil Sınav Notu (#)
İngilizce	80 (eYDS)

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

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Teknik Uzman	Yeditepe Üniversitesi	2003-2020
Öğretim Görevlisi	Yeditepe Üniversitesi	2020-Şimdi

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Office Programları	Çok iyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Bilimsel Çalışmaları

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Yaba A, Agus S , Yıldırım E, Erdogan CS, Yılmaz B. Interaction of the mTERT telomerase catalytic subunit with the c-Abl tyrosine kinase in mouse granulosa cells. <i>J Recept Signal Transduct Res</i> . 2020;40(4):365-373.
Kilinc E, Dagistan Y, Kukner A, Yilmaz B, Agus S , Soyler G, Tore F. Salmon calcitonin ameliorates migraine pain through modulation of CGRP release and dural mast cell degranulation in rats. <i>Clin Exp Pharmacol Physiol</i> . 2018;45(6):536-546.
Erenberk U, Dundaroz R, Gok O, Uysal O, Agus S , Yuksel A, Yilmaz B, Kilic U. Melatonin attenuates phenytoin sodium-induced DNA damage. <i>Drug Chem Toxicol</i> . 2014;37(2):233-239.
Browne EP, Dinc SE, Punska EC, Agus S , Vitrinel A, Erdag GC, Aderton DL, Arcora FK, Yilmaz B. Promoter methylation in epithelial-enriched and epithelial-depleted cell populations isolated from breast milk. <i>J Hum Lact</i> . 2014;30(4):450-457.

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

--

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

Agus S , Civas CC, Eyuboglu S, Yavuz Y, Baser O, 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
Baser O, 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 & Clinical Anatomy</i> . 2019; 13
Yaba A, Aydın MS, Agus S , Günelan E, Yıldırım EN, Yılmaz B. Impaired follicular development and ovulation in PCOS mouse model can rescued by rapamycin treatment. <i>Oxford University Press</i> . 2018
Agus S , Eyuboglu S, Solak H, Bilgin VA, Yavuz Y, Akkaya H, Başer Ö, 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. <i>Karger</i> , 2018
Agus S , Eyuboglu S, Solak H, Bilgin VA, Yavuz Y, Akkaya H, Başer Ö, Kutlu S, Bingöl CA, Atasoy D, Yilmaz B. Effects of chronic modulation of kiss1 neurons on catecholamine levels in experimental alzheimer disease's model. <i>Willey</i> , 2018
Yaba A, Aydın MS, Agus S , Günelan E, Yıldırım EN, Yılmaz B. Role of mTOR (Mammalian Target of Rapamycin) Signal Mechanism in the Treatment of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). 2017
Eyuboglu S, Agus S , Baser Ö, Atasoy D, Yılmaz B. Chemogenetics modulation of kisspeptin neuron activity and its role in anxiety behavior in mice. <i>Willey</i> , 2017
Eyuboglu S, Agus S , Yavuz Y, Baser Ö, Alkaç Üİ, Atasoy D, Yılmaz B. Functional and anatomical characterisation of kisspeptin neurons and synaptic connections in KissCre-GFP mice. <i>Willey</i> , 2017

Agus S , Atasayan Ö, Sandal S, Mete F, Eyuboglu S, Yılmaz B. Analysis of relationship between dioxin-like and estrogenic bioactivity and genotoxic changes in mammary epithelial cells with nutritional habits of breastfeeding mothers. <i>Willey</i> , 2017
Agus S , Aksoy S, Yaba A, Kacar M, Yılmaz B. c-Abl Tyrosine Kinase may have Regulatory Effect on Estrogen Receptor-beta and mTOR in GT1-7 Cells. <i>Wiley-Blackwell</i> , 2016; 218; 66-67
Agus S , Atasayan Ö, Sandal S, Mete F, Eyuboglu S, Yılmaz B. Comparison of Bioactivity of Dioxins in Breast Milk with Body Mass Index in Lactating Mothers <i>Wiley-Blackwell</i> , 2016
Agus S , Atasayan Ö, Eyuboglu S, Sandal S, Yılmaz B. Biomonitoring of Genotoxic Changes in Exfoliated Human Mammary Epithelial Cells Collected from Lactating Mothers: PC231. <i>Acta Physiologica</i> , 2015; 215
Yaba A, Agus S , Eyuboglu S, Demir N, Yılmaz B. Effect of c-Abl gene silencing by siRNA on proliferation of mouse granulosa cells. <i>Wiley-Blackwell</i> , 2015
Atasayan O, Agus S , Suakar O, Eyuboglu S, Bayrak OF, Sandal S, Yılmaz B. Investigation of epigenetic changes in exfoliated mammary epithelial cells retrieved from lactating women. <i>Wiley-Blackwell</i> , 2015
Agus S , Dinc SE, Apaydin A, Sandal S, Vitrinel A, Yılmaz B. Comparison of exfoliated human mammary cells count with demographical and nutritional parameters of lactating mothers. <i>Wiley-Blackwell</i> , 2014

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

--

Diğer (Görev Aldığı Projeler/Sertifikalari/Ödülleri)

111S418, Melatoninin İskemi Sonrası Beyin Plastisitesi ve Onarımı Üzerine Olan Etkileri, 1001 - Araştırma, Burslu, Sonuçlandı, ARDEB, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 01.06.2012 - 06.03.2013, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 15.04.2012 - 15.04.2015.
113S155, Meme Epitel Hücrelerinde Genotoksik ve Epigenetik Değişiklikler ile Anne Sütünde Dioksinler ve Ksenoöstrojenlerin Biyoaktivitelerinin Raportör Gen Düzeyinde Araştırılması, Uluslararası, Burslu, Sonuçlandı, ARDEB, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 01.12.2013 - 15.04.2016, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 15.10.2013 - 15.04.2016.
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.
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.