

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

**TRANSGENİK FARELERDE HİPOTALAMİK
ARKUAT AGRP NÖRONLARININ OPIOİD
MODÜLASYONU**

DOKTORA TEZİ

YAVUZ YAVUZ, MSc

İSTANBUL-2021

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

**TRANSGENİK FARELERDE HİPOTALAMİK
ARKUAT AGRP NÖRONLARININ OPIOİD
MODÜLASYONU**

DOKTORA TEZİ

YAVUZ YAVUZ, MSc

DANIŞMAN
Prof. Dr. BAYRAM YILMAZ

İSTANBUL-2021

TEZ ONAYI FORMU

Kurum : Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Program : Fizyoloji

Tez Başlığı : Transgenik Farelerde Hipotalamik Arkuat AgRP Nöronlarının Opioid Modülasyonu

Tez Sahibi : Yavuz YAVUZ

Sınav Tarihi : 29.06.2021

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

	Unvanı, Adı-Soyadı (Kurumu)
Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Bayram YILMAZ (Yeditepe Üniversitesi)
Tez danışmanı:	Prof. Dr. Bayram YILMAZ (Yeditepe Üniversitesi)
Üye:	Prof. Dr. Ahmet AYAR (Karadeniz Teknik Üniversitesi)
Üye:	Prof. Dr. Selim KUTLU (Necmettin Erbakan Üniversitesi)
Üye:	Doç. Dr. Mehtap KAÇAR (Yeditepe Üniversitesi)
Üye:	Doç. Dr. Burcu GEMİCİ BAŞOL (Yeditepe Üniversitesi)

ONAY

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

Prof. Dr. Bayram YILMAZ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

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

10.07.2021

Yavuz YAVUZ



İTHAF

Kıymetli aileme ve eşim Selda'ya

TEŞEKKÜR

Öncelikle, bu süreçte bana güvenerek motive eden, anlayış ve sabrını hiçbir zaman esirgemeyen, bu zorlu yolda her zaman hevesle ve inançla yürümeme standartların üstünde imkan sağlayan, eğitimimin yanı sıra her konuda sonsuz desteğini gördüğüm, değerli danışman hocam Prof. Dr. Bayram YILMAZ'a;

Elektrofizyoloji, optogenetik tekniklerini öğrenmemde büyük katkısı olan, her daim bilgi alışverişinde olduğum ve birlikte çalışmaktan zevk aldığım Doç. Dr. Deniz ATASOY'a;

İhtiyacım olan her an fikirlerine danıştığım, her konuda bana göstermiş oldukları ilgiden dolayı başta Fizyoloji anabilim dalından Doç. Dr. Mehtap KAÇAR, Doç. Dr. Burcu GEMİCİ BAŞOL ve Histoloji anabilim dalından Doç. Dr. Aylin YABA UÇAR'a olmak üzere Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nin tüm öğretim üyelerine;

Birlikte vakit geçirmekten keyif aldığım ve bu süreçte yardım ve desteklerini esirgemeyen kardeşlerim Dr. Volkan Adem BİLGİN'e, Dr. Sami AĞUŞ'a, ve sonradan aramıza katılan değerli kardeşim Arş. Gör. H. Buğra ÖZGÜN'e ve istatistik analizlerinde yardımını esirgemeyen Arş. Gör. Cihan Süleyman ERDOĞAN'a;

Yeditepe Üniversitesi Beyin Araştırmaları Laboratuvarı takımında birlikte çalışmaktan yine çok keyif aldığım, ihtiyacım olduğu her anda yanımda olan arkadaşlarım Arş. Gör. M. Sinem ETHEMOĞLU, Arş. Gör. Özge BAŞER, Yüksek Lisans öğrencisi Deniz Öykü ÖZEN ve diğer tüm ekip arkadaşlarıma, deney hayvanı temini ve bakımı konusunda desteklerini esirgemeyen Veteriner Hekim Dr. Engin SÜMER ve teknisyen Ramazan GÜNEYLİ ve tüm YÜDETAM ekibine, tezimi hazırlarken ve sunarken yardımcı olan Sağlık Bilimleri Enstitüsü enstitü sekreteri Hasan KOÇ ve çalışma arkadaşlarına;

Tez izleme komitemde bulunan değerli hocalarım, Prof. Dr. Ahmet AYAR'a ve Prof. Dr. Selim KUTLU'ya çalışmamın yönlendirilmesinde değerli yorumlarıyla sağladıkları önemli katkılarından dolayı;

Son olarak, tüm hayatım boyunca olduğu gibi doktora eğitimim süresince de bana olan güvenleri, karşılıksız destekleri, tükenmeyen sevgi ve anlayışları ile daima yanımda olan kıymetli annem Niğmet YAVUZ'a değerli abilerim Ali YAVUZ'a ve Salih YAVUZ'a ve eşim Selda YAVUZ'a sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI FORMU	ii
BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xiii
ÖZET	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Opioidler	3
2.1.1. Opioid Reseptörlerinin Homeostatik ve Hedonik Mekanizmalar üzerine etkisi	4
2.1.2. Klasik Opioid Reseptör Sinyali	7
2.2. Arkuat Çekirdek NPY Nöronları	9
3. GEREÇ ve YÖNTEM	14
3.1. Kullanılan Deney Hayvanı	14
3.1.1. Farelerin Üretim Stratejisi	14
3.1.2. Genotipleme.....	14
3.2. Cre rekombinaz Bağımlı AAV virüslerin İntrakraniyal Enjeksiyonu	17
3.3. Beyin Kesiti Hazırlanması	19
3.4. Elektrofizyoloji kayıtları (Patch clamp)	20
3.5. Beslenme davranışı	21
3.6. Lokomotor aktivite (Home Cage Activity)	21
3.7. Virüs enjeksiyonu ve fiberoptik yerleştirme (In vivo)	22
3.8. Fiber Fotometri (Ca ²⁺ görüntüleme).....	23
4. BULGULAR.....	24

4.1. DAMGO'nun (μ opioid agonisti) arkuat AgRP nöronlarının ateşleme frekansına etkisi.....	24
4.2. Nalokson'un (μ opioid antagonisti) arkuat AgRP nöronlarının ateşleme frekansına etkisi.....	25
4.3. DAMGO'nun AgRP nöronlarına gelen sinaptik akımlara etkisi (EPSC/IPSC).....	26
4.4. DAMGO' nun AgRP nöron membran özelliklerine etkisi	29
4.5. DAMGO' nun GTP ve GDP β S'li internal ve banyoda CMPD101 varlığında AgRP membran özelliklerine etkisi.....	32
4.6. DAMGO' nun Arc ^{AgRP→PVH} projeksiyonuna etkisi	33
4.7. Yeme davranışı ve home cage aktivite sonuçları	36
4.8. In vivo AgRP nöron kayıtları ve DAMGO' nun etkisi.....	38
5. TARTIŞMA	41
6. KAYNAKLAR	45
7. EKLER.....	56
7.1. Etik Kurul Onay Formu	56
7.2. İntihal Raporu İlk Sayfası.....	58
7.3. Özgeçmiş	59

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Kontrol PZR içerikleri.	15
Tablo 2. Transgenik PZR içerikleri.....	15
Tablo 3. Kullanılan Primer Dizileri	15
Tablo 4. PZR protokolü.....	16



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Opioid reseptörlerinin anatomik dağılımı [74].	7
Şekil 2. Opioid reseptör sinyalleşmesinin özeti [73].	9
Şekil 3. Arkuat AgRP nöronlarının yapmış olduğu projeksiyon haritası [117].	11
Şekil 4. Arkuat AgRP nöronlarının GFP ile işaretlenmesi sonrası projeksiyon yoğunluk haritası [116].	13
Şekil 5. AgRP Cre fare PCR sonucu	17
Şekil 6. Stereotaksiye yerleştirilen farede cam pipetle virüs enjeksiyonu.	19
Şekil 7. Beyin kesitleri alımı	19
Şekil 8. Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin Araştırmaları Laboratuvarı A) Elektrofizyoloji kayıt cihazı B) Kayıt pipetiyle nörona “seal” (mühürleme) yapılması C) Elektrofizyoloji kayıt örneği	21
Şekil 9. In-vivo kayıtlar için ferül yerleştirilmiş fare.	22
Şekil 10. A) Standart bir fiber fotometri çalışma şeması B) Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin Araştırmaları Laboratuvarı	23
Şekil 11. DAMGO’nun arkuat AgRP nöronlarının ateşleme frekanslarına etkisi A) Transgenik farelerde Cre bağımlı virüsün ekspresyonu B) GFP ifade eden AgRP nöronlarının konfokal mikroskopi görüntüleri C) Beyin kesitlerinden alınan elektrofizyoloji kayıt sonuçları (Kontrol: 2.4 ± 0.32 Hz n=37 nöron, DAMGO: 0.64 ± 0.12 Hz n=39 nöron / 4 fare) Alınan frekans sonuçları T-test nonparametric Kolmogorov-Smirnov testi ile karşılaştırıldı. (P <0,0001) D) GFP enfekte olan AgRP nöronlarından alınan örnek elektrofizyoloji kayıtları.	25
Şekil 12. Nalokson’un arkuat AgRP nöronlarının ateşleme frekanslarına etkisi A) Beyin kesitlerinden alınan elektrofizyoloji kayıt sonuçları (Kontrol: 0.57 ± 0.09 Hz n=31 nöron, Nalokson: 2.33 ± 0.26 Hz n=34 nöron/ 4 fare) Alınan frekans sonuçları T-test nonparametric Kolmogorov-Smirnov testi ile karşılaştırıldı. (P <0,0001) B) GFP enfekte olan AgRP nöronlarından alınan örnek elektrofizyoloji kayıtları.	26
Şekil 13. DAMGO’nun arkuat AgRP nöronlarına gelen uyarıcı sinaptik akımlara etkisi A) Whole-cell (tüm hücre kaydı) tekniği ile alınan sEPSC frekans grafiği (Kontrol: 1.80 ± 0.11 Hz, n=16 nöron, DAMGO: 1.0 ± 0.11 Hz n=14 nöron, Nalokson: 1.17 ± 0.17 Hz n= 16 nöron / 3 fare) (one-way ANOVA, P<0.05, Dunn’s multiple comparisons test) B) sEPSC kayıtların tepe genişliği (peak amplitude) grafiği (Kontrol: 17.69 ± 1.16 pA,	

n=16 nöron, DAMGO: 22.46 ± 0.86 pA n=14 nöron, Nalokson: 25.36 ± 0.65 pA n= 16 nöron / 3 fare) C) GFP enfekte olan AgRP nöronlarından alınan örnek whole-cell elektrofizyoloji kayıtlar..... 27

Şekil 14. DAMGO'nun arkuat AgRP nöronlarına gelen inhibe sinaptik akımlara etkisi A) Whole-cell (tüm hücre kaydı) tekniği ile alınan sIPSC frekans grafiği (Kontrol: 0.90 ± 0.19 Hz, n=18 nöron, DAMGO: 1.17 ± 0.32 Hz n=17 nöron, Nalokson: 0.52 ± 0.05 Hz n=16 nöron / 3 fare) (one-way ANOVA, P=0.7, Dunn's multiple comparisons test). B) sIPSC kayıtların tepe genişliği (peak amplitude) grafiği (Kontrol: 22.94 ± 1.97 pA, n=18 nöron, DAMGO: 24.77 ± 0.86 pA n=17 nöron, Nalokson: 25.29 ± 1.23 pA n=16 nöron / 3 fare) C) GFP enfekte olan AgRP nöronlarından alınan örnek whole-cell elektrofizyoloji kayıtlar..... 28

Şekil 15. GTP'li internal ile AgRP nöron membran özellikleri A) DAMGO'nun AgRP nöron dinlenim zar potansiyeline etkisi grafiği (Kontrol: -50.8 ± 1.97 mV n=15 nöron, DAMGO: -62.26 ± 2.55 mV n=15 nöron, Nalokson: -56.4 ± 2.44 mV n=16 nöron/4 fare) (One-Way ANOVA, P<0,0001, Tukey's multiple comparisons test). B) AgRP nöron direnç grafiği (Kontrol: 2244.44 ± 261.46 M Ω n=9 nöron, DAMGO: 1407.14 ± 193.473 M Ω n=7 nöron, Nalokson: 2385.71 ± 436.67 M Ω n= 7 nöron /4 fare) (One-Way ANOVA, P=0,0868, Tukey's multiple comparisons test). C) whole-cell current clamp elektrofizyoloji kaydı..... 30

Şekil 16. GDP β S'li AgRP nöron membran özellikleri A) DAMGO'nun AgRP nöron dinlenim zar potansiyeline etkisi grafiği (Kontrol: -45.14 ± 1.20 mV n=14 nöron, DAMGO: -54.42 ± 2.32 mV n=14 nöron, Nalokson: -49.57 ± 2.17 mV n=14 nöron/3 fare) (One-Way ANOVA, P=0,0003, Tukey's multiple comparisons test) B) AgRP nöron direnç grafiği (Kontrol: 2557.14 ± 375.34 M Ω n=7 nöron, DAMGO: 1633.33 ± 239.93 M Ω n=9 nöron, Nalokson: 2428.57 ± 378.97 M Ω n= 7 nöron / 3 fare) (One-Way ANOVA, P=0,1011 Tukey's multiple comparisons test). C) whole-cell current clamp elektrofizyoloji kaydı..... 31

Şekil 17. CMPD101'li varlığında AgRP nöron membran özellikleri A) GTP'li internal ve DAMGO'nun AgRP nöron dinlenim zar potansiyeline etkisi grafiği (Kontrol: -46 ± 9.92 mV n=6 nöron, DAMGO: -58.83 ± 3.45 mV n=6 nöron, Nalokson: -55.5 ± 2.95 mV n=6 nöron / 2 fare) (One-Way ANOVA, P<0,05, Tukey's multiple comparisons test). B) GDP'li internal ve DAMGO'nun AgRP nöron dinlenim zar potansiyeline etkisi grafiği (Kontrol: -46.16 ± 0.87 mV n=6 nöron, DAMGO: -48.33 ± 0.80 mV n=6 nöron, Nalokson:

-47.5 ±1.58 mV n= 6 nöron / 2 fare) (One-Way ANOVA, P<0,05, Tukey's multiple comparisons test) C-D) whole-cell current clamp elektrofizyoloji kayıtları. 33

Şekil 18. Arc^{AgRP→PVH} sinaptik bağlantı özellikleri A) Hipotalamus arkuat bölgesine ChR2 enjeksiyon görseli B) PVH bölgesinden nöronlardan kayıt alma sırasında AgRP nöron aksonlarının optogenetik uyarımı C) ChR2 enjeksiyonu yapılan AgRP-Cre fare beyin kesitinden konfokal gösterimi D) Arc^{AgRP→PVH} projeksiyonundan alınan tepe genlik kaydı. Arc^{AgRP→PVH} sinaptik bağlantıları üzerine DAMGO'nun etkisi E) DAMGO'nun AgRP nöron aksonlarının uyarımı sonrası PVH nöronlarında oluşturduğu tepe genlik grafiği (Kontrol: 250.4 ±52.81 pA, DAMGO: 148.3±38.6 pA, Nalokson: 220.5±51.11 pA n=10 nöron / 4fare) (One-Way ANOVA, P<0,05, Tukey's multiple comparisons test) F) AgRP nöronlarından gelen sinaptik inputların release probability grafiği (Kontrol: 0.42 ±0.11, DAMGO: 0.36±0.09, n=15 nöron/4fare) (T-test nonparametric Wilcoxon matched-pairs signed rank P=0.45) G-H) Postsinaptik nöronlarda AgRP nöron aksonlarının uyarımı sonrası oluşan frekans ve tepe genlik alan grafiği (Kontrol: 8.97±0.92 Hz n=15 nöron, DAMGO: 5.37±0.92 Hz n=15 nöron/4 fare), (Kontrol: 11827.30±3580.14ms.pA n=15 nöron, DAMGO: 5857.75 ±2053.75 ms.pA n=15 nöron / 4 fare) (T-test nonparametric Wilcoxon matched-pairs signed rank P<0.0001, P=0,0054). 36

Şekil 19. AgRP-Cre farelerde DAMGO'nun yeme davranışına ve lokomotor aktivite özelliklerine etkisi A) AgRP farelere uygulanan deney protokol şeması B) Salin ve DAMGO uygulanması sonrası farelerin yem tüketim grafiği (Kontrol: 4.06±0.13 gr, DAMGO: 4.74±0.11 gr/11 fare) (Two-way ANOVA, P>0,05, Sidak's multiple comparisons test) C) Metabolik kafeslere yerleştirilen kameralardan alınan ortalama günlük aktivite kaydı D-E) Farelere uygulanan DAMGO sonrası toplam hareket mesafesi (Kontrol: 3770.47±290.17 cm, DAMGO: 5061.84±482.12 cm / 11 fare) (T-test P<0.05) ve hız değerleri (Kontrol: 4.97±0.71 cm/s, DAMGO: 5.56±0.65 cm / 11 fare) (T-test P>0.05). 38

Şekil 20. AgRP-Cre farelerden Ca⁺² görüntüleme ve DAMGO'nun etkisinin araştırılması A) Fiber fotometre Ca⁺² görüntüleme sistem çalışma şeması B) Aç bırakılan AgRP-Cre farelerden alınan fiber fotometre verileri C) Aç bırakıldığında AgRP nöronlarının ateşleme frekansını gösteren data D) Aç farelere DAMGO uygulanması ve AgRP nöronlarından alınan Ca⁺² sinyal grafiği. 40



SİMGELER ve KISALTMALAR

A/P:	Anterior/Posterior
AAV:	Adeno-Asosiye Virüs
aCSF:	Yapay Beyin Omurilik Sıvısı
AgRP:	Agouti-related Peptide
AP5:	2R-amino-5-phosphonovaleric acid
BNST:	Stria terminalinin yatak çekirdeği
ChR2:	ChannelRhodopsin
CMPD101:	Compound 101 hydrochloride
CNQX:	6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
Cre:	Causes of Recombination
CsCl:	Cesium chloride
D/V:	Dorsal/Ventral
ddH ₂ O:	Aritılmış su
DMH:	Dorsomedial hipotalamus
DR:	Dorsal rafe çekirdek
EDTA:	Etilendiamintetraasetik asit
EPSC:	Excitatory postsynaptic current
FLEX:	Flip-Excision
GFP:	Yeşil Floresan Protein
GβDP:	Guanosine 5'-[β-thio]diphosphate trilithium salt
H ₂ O:	Su
H ₂ O ₂ :	Hidrojen Peroksit
HCl:	Hidroklorik Asit

IPSC:	Inhibitory postsynaptic current
I.P:	Intraperitoneal
KCl:	Potasyum Klorür
LA:	Lateral septal
LHA:	Lateral Hipotalamik Alan
Lox:	Locus of Crossing
M/L:	Medial/Lateral
MCH:	Melanin Konsantre Eden Hormon
Mg-ATP:	Adenosine Triphosphate Magnesium
MgCl ₂ :	Magnezyum Klorür
MgSO ₄ :	Magnesium Sülfat
MPA:	Medial Preoptik Alan
NAC:	Nucleus Arcuatus
NaCl:	Sodyum Klorür
NaGTP:	Guanosine 5'-triphosphate sodium salt hydrate
NaHCO ₃ :	Sodyum Bikarbonat
NaHPO ₄ :	Sodyum Fosfat
NaOH:	Sodyum Hidroksit
NMDG:	N-Methyl-D-glucamine
PAG:	Periaküaduktal Gri
PBN:	Parabrakiyal Çekirdek
PCR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PN:	Paranigral Çekirdek
POMC:	Pro-opiomelanokortin

PTX:	Picrotoxin
PVH:	Paraventriküler Hipotalamus
PVT:	Talamusun Paraventriküler Çekirdeklerine
rAAV:	Rekombinant Adeno-Asosiye Virüs
TAE:	Tris-Asetat-EDTA
VTa:	Ventral Tegmental Alan



ÖZET

Yavuz, Y. (2021). Transgenik Farelerde Hipotalamik Arkuat AgRP Nöronlarının Opioid Modülasyonu. Yeditepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji ABD, Doktora Tezi. İstanbul

Hipotalamusun arkuat çekirdeğinde (ARC) lokalize olan Agouti ile ilişkili peptit (AgRP) nöronları iştah, metabolizma ve enerji homeostazının düzenlenmesinde merkezi bir role sahiptir. Çalışmamızda μ opioid reseptör agonistinin AgRP nöronları üzerindeki olası fonksiyonel değişimlerini elektrofizyolojik ve Ca^{+2} aktivite görüntüleme yöntemleriyle karakterize etmeyi amaçladık.

Çalışmada dişi ve erkek transgenik AgRP-Cre fareler kullanıldı. μ opioid reseptör agonisti DAMGO'nun AgRP nöronları üzerindeki etkileri optogenetik ve elektrofizyolojik testler ("cell attach" ve "whole cell") ile *ex vivo* olarak incelenirken, μ -opioid reseptör aktivasyonunun *in vivo* etkileri beslenme davranışı, lokomotor aktivite ve fiber fotometre Ca^{+2} görüntüleme yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. Verilerin istatistiksel analizi için One-Way ANOVA testi kullanıldı.

Ex vivo deneylerde, DAMGO, AgRP nöronlarının ateşleme frekansını önemli ölçüde azalttı ve bu nöronların dinlenim membran potansiyelini hiperpolarize etti ($P<0,0001$). Ayrıca, DAMGO, bu nöronlara giden uyarıcı post-sinaptik akımların frekansını önemli ölçüde azaltırken, inhibe post-sinaptik akım frekansını değiştirmedeği gözlemlendi. Optogenetik tekniğinden faydalanılarak yapılan $ARC^{AgRP \rightarrow PVH}$ sinaptik bağlantı deneylerinde, ilaç uygulamasından sonra sinaptik tepe genliğinin önemli ölçüde azaldığı gözlemlendi ($P<0,05$). DAMGO'nun beş günlük intraperitoneal uygulamasından sonra farelerde gıda tüketim miktarının artma trendinde olduğu gözlemlendi. DAMGO uygulamasının bir sonucu olarak, hayvanların kat ettikleri mesafe anlamlı derece azalırken hızlarında bir değişiklik olmadı. AgRP nöronlarının *in vivo* Ca^{+2} aktivitesini görüntülemek için fiber fotometri tekniğini kullandık. DAMGO, 16 saat aç bırakılan farelere uygulandığında, AgRP nöronlarının Ca^{+2} aktivitesinin anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi ($P<0,05$).

Bu çalışmada μ opioid reseptörlerin AgRP nöronlarının aktivitesi üzerine etkileri ilk defa olarak incelenmiştir. Çalışmamızın bulgularına göre, μ opioid agonizminin iştah düzenlenmesinde önemli bir role sahip olan AgRP nöronlarının aktivitesinin modülasyonunda etkili olduğu önerilebilir.

Anahtar Kelimeler: Opioidler, AgRP fare, Optogenetik, Elektrofizyoloji, Fiber fotometre, beslenme davranışı.

ABSTRACT

Yavuz, Y. (2021). Opioid Modulation of Hypothalamic Arcuate Agrp Neurons in Transgenic Mice. Yeditepe University, Institute of Health Science, Department of Physiology, PhD Thesis. İstanbul

Agouti-related peptide (AgRP) neurons, localized in the arcuate nucleus (ARC) of the hypothalamus, have a central role in the regulation of appetite, metabolism, and energy homeostasis. We aimed to characterize possible functional changes of the μ -opioid receptor agonist on AgRP neurons by electrophysiological and Ca^{+2} activity imaging methods.

Male and female AgRP-Cre mice were used. *Ex vivo* effects of DAMGO (a μ -opioid receptor agonist) on AgRP neurons were examined by optogenetic and electrophysiological (cell attach and whole cell) methods, *in vivo* effects of μ -opioid receptor activation were investigated by feeding behavior, locomotor activity and fiber photometry Ca^{+2} imaging methods. Data were statistically analyzed by One-Way ANOVA.

DAMGO significantly reduced the firing frequency of AgRP neurons and hyperpolarized the resting membrane potential ($P<0,0001$). In addition, it was observed that this μ -opioid agonist significantly reduced the frequency of excitatory post-synaptic currents to the AgRP neurons, without changing the frequency of inhibitory post-synaptic currents. In $ARC^{AgRP \rightarrow PVH}$ synaptic connection experiments using the optogenetic technique, the synaptic peak amplitude decreased significantly after drug administration ($P<0,05$). Five days after intraperitoneal administration of DAMGO, amount of food consumption tended to increase. DAMGO treatment significantly decreased the distance traveled by the animals while their speed did not change. We used fiber photometry technique to monitor the *in vivo* Ca^{+2} activity of AgRP neurons. When DAMGO was administered to mice that were fasted for 16 hours, Ca^{+2} activity in AgRP neurons was significantly reduced ($P<0.05$).

In the present study, μ -opioid receptor modulation of AgRP neuronal activity is demonstrated for the first time. When the available data was considered, it can be suggested that μ -opioid agonism is effective in regulating the activity of AgRP neurons, which have an important role in appetite regulation.

Key words: Opioids, AgRP mice, Optogenetic, Electrophysiology, Fiber photometry, Feeding behavior.



1. GİRİŞ ve AMAÇ

Besin alımının merkezi düzenlenmesi, enerji homeostazına katkıda bulunan kilit bir mekanizmadır. Beslenme davranışını düzenlediği düşünülen birçok nöral devre hem anatomik hem de işlevsel olarak beyin ödül devresi ile örtüşür. Çok sayıda sinir ağının manipülasyonu, aynı anda gıda alımını ve ödül merkezini etkileyebilir. Bu süreçlerin altında yatan iki anahtar sistem olan homeostatik ve hedonik beslenmeyi kontrol edenler, genellikle bağımsız olarak kabul edilir. Hedonik beslenme duyuşsal algı veya zevk tarafından uyarılırken, homeostatik beslenme ise temel metabolik süreçler ve hayatta kalmak için alınan gıdaların denetiminden sorumludur [1,2]. Fakat esas olarak oluşan negatif bir enerji dengesi, hipotalamus ve beyin sapının aracılık ettiği fizyolojik yeme ihtiyacına yol açar, ancak lezzetli yiyecekleri yeme arzusu, enerji durumundan bağımsız olarak yiyecek alımını teşvik edebilir. Öğün başlangıcı genellikle homeostatik olmayan mekanizmaları içerirken, öğün miktarı ve sonlandırılması, özellikle gıda alımının neden olduğu bağırsak sinyalleriyle ilgili olarak homeostatik kontrol altında yürütülür [3,4].

Ayrıca endojen opioid sistemi hem homeostatik hem de hedonik beslenmede önemli derecede etki etmektedir. Yapılan çalışmalarda, opioid reseptör agonistlerinin uygulanması hayvanlarda gıda alımında yüksek oranda artışa neden olduğu ve bunun aksine sistemik veya beyin içi opioid reseptör antagonist uygulamalarının enerji alım mekanizmaları üzerinde inhibe edici etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [5-8]. Fakat homeostatik beslenme üzerine olan moleküler mekanizması halen tam net değildir. Opioidlerin melanokortin sistemleriyle etkileştiği düşünülmektedir. Melanokortinler ise çeşitli mekanizmalar yoluyla gıda alımını azalttığı bilinmektedir. Melanokortin reseptörlerinin endojen bir antagonisti olan agouti ile ilişkili peptid (AgRP) gıda alımının uyarılmasında önemli rol almaktadır [9,10].

Nöropeptid Y (NPY), enerji dengesine ve beslenme davranışına aracılık eden bir diğer önemli hipotalamik nöropeptittir. Hem AgRP hem de NPY, hipotalamik arkuat çekirdekte (ARC) bulunan güçlü oreksijenik faktörlerdir [11]. AgRP/NPY nöronları, yoğun intrahipotalamik aksonal projeksiyonlarını paraventriküler çekirdeğe (PVH) yönlendirilerek sinaptik bağlantılar yapmaktadır. $ARC^{AgRP/NPY \rightarrow PVN}$ sinaptik bağlantısı beslenmede önemli bir rol oynadığından [12], bu bağlantının gücündeki değişikliğin iştah düzenlenmesi içinde kritik bir öneme sahip olması muhtemeldir.

Bu bağlamda, çalışmamızda, μ opioid reseptör agonisti ve antagonistinin homeostatik beslenmede önemli değere sahip arkuat çekirdekte lokalize olan ve aynı zamanda enerji tüketiminde görev alan AgRP nöronlarındaki fonksiyonel değişiklikleri kapsamlı ve sistematik olarak karakterize etmeyi amaçladık. Bunlar sırasıyla, DAMGO'nun, AgRP nöronlarında oluşan a) ateşleme frekanslarına olan etkisi b) presinaptik input anomalitelerinin spontane uyarıcı ve inhibe edici (IPSC ve EPSC) akımlar olan etkisi c) otonom ateşleme ve dinlenme potansiyeli gibi özelliklerinin karakterizasyonu d) AgRP nöronlarının sinaptik çıktılarının üzerine etkisi e) μ opioid reseptör agonistinin periton içi (i.p) uygulanmasından sonra farelerde oluşan davranışsal ve fonksiyonel değişiklikleri karakterize etmeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Opioidler

Yüzyıllardır analjezik olarak yararlanılan opioidlerin sakinleştirici bir ajan olarak kullanımının en az 5.000 yıllık bir geçmişi vardır. Ancak endojen opioidlerin beyinde varlığı 1970'lerde yapılan hayvan deneyleri sonrası keşfedildi [13]. Endojen opioid peptidler arasında endorfinler, enkefalinler, dinorfinler ve endomorfine bulunur. Opioid reseptör türleri ise μ -, δ - ve κ - dir. μ opioid reseptörü (MOR), δ opioid reseptörü (DOR) ve κ opioid reseptörü (KOR) aracılığıyla işlev gösterirler. Bunlar G proteinine bağlı süper ailesinin üye reseptörleridir. β -Endorfin, beyinde çoğu yerde lokalize olmakla birlikte çoğunlukla hipotalamusun arkuat çekirdekte ve beyin sapında eksprese edilir. MOR aracılığıyla hareket ederek ve iştah düzenleme mekanizmasının yanı sıra cinsel davranışlar üzerine etki eder. Enkephalin reseptörü beyinde geniş dağılım gösterip ve MOR ve DOR reseptörleri aracılığıyla hareket eder. Dinorfin reseptörü ise KOR reseptörleri üzerinden etki ederek, omurilikte ve hipotalamus dâhil beynin birçok yerinde bulunur [13].

Yemek tüketimi basit, konvansiyonel bir davranış değildir. Bir yemek yeme işinin başlangıcı, yiyecek erişimi, temin edilen gıdanın tüketimi için merkezi ve çevresel sinir sisteminin eş zamanlı görevlerini yerine getirmesi gerekir [14]. Bu sistemlerin birlikte çalışması ve görevlerini yerine getirmesi genellikle laktasyon döneminden sonra öğrenilen davranışlardır. Bu nedenle, yeme davranışını düzenleyen yalnızca Merkezi Sinir Sistemi'nin (MSS) hipotalamustan ziyade çevresel sinir sistemiyle birlikte bir bütün olarak hareket etmektedir. Ayrıca, alkol ve nikotin maddelerinin oluşturmuş olduğu bağımlılık gibi opioid agonistlerinin doğrudan uygulanması veya alınması sonrası bağımlılık yaratan davranışlara yol açar. Aynı zamanda opioidlerin MSS'de bulunan ödül mekanizmaları üzerinde önemli rol oynadığı kabul edilmiştir. Bağımlılık oluşturan sinir ağlarının çoğu aynı zamanda ödül mekanizmalarında da yer alır.

Opioid reseptör antagonistleri, bağımlılık yapan ilaç alımını ve ödül mekanizmasını inhibe ederek lezzetli yiyecekler alımını azaltır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, naltrekson veya naloksonun (opioid antagonistleri) lezzetli yiyecek alımını azalttığı, morfin ve enkefalin gibi opioid reseptör agonistlerinin ise gıda alımını arttırdığı gösterilmiştir. Morfin ve türevlerinin akut uygulanmasının, nalokson ile geri

döndürülebilir bir şekilde gıda ve ağırlık alımını arttırırken, kronik morfin uygulanması sonrası ise gıda alımı ve vücut ağırlığının artışı düşmektedir. Ayrıca, kronik morfin uygulaması düzensiz bir beslenme modeline yol açtığı ve opioid agonistlerden bazılarının beyin içi nükleus akümbens çekirdeğine (NAc) enjeksiyonu sonrası, düşük yağlı diyet veya karbonhidrat açısından zengin olan diyetle kıyasla yüksek yağlı besin alımında büyük bir artışa yol açtığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmada, yüksek yağlı diyetle beslenen farelerin NAc, prefrontal kortek ve hipotalamus bölgesinde MOR ve ligand preproenkafalin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Bu veriler opioidlerin, vücut ağırlığı kontrolünde ve besin alımında rolü olduğunu, özellikle de ödül merkezini uyaran besin alımları ve opioidler arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermektedir [15]. Bu karşılıklı ilişki, opioidlerjik beyindeki bir disfonksiyonun, obezite patofizyolojisinde ve değişmiş vücut ağırlığıyla bağlantılı hastalıklara yol açabileceği ve rol oynayabileceği gerçeğini ortaya koymuştur.

2.1.1. Opioid Reseptörlerinin Homeostatik ve Hedonik Mekanizmalar üzerine etkisi

Enerji homeostazının düzenlenmesinden sorumlu olan opioid reseptörleri, beyinin farklı bölgelerinde lokalize olan ve merkezi sinir sisteminde geniş dağılım göstermektedir. Opioid reseptörlerinin enerji dengesindeki rolü yapılan çalışmalarda sıklıkla gösterilmiştir [13-16]. Bu alanda yapılan ilk çalışma, opioid reseptör antagonisti olan nalokson, fare ve sıçanlarda uygulandığında gıda alımını anlamlı derecede azaltmıştır [17]. Çok sayıda çalışmada, sitemik veya beyin içi enjeksiyon olarak uygulanan opioid reseptör antagonistlerinin farelerde, sıçanlarda hatta kemirgen hayvanlarda gıda alımını ve vücut ağırlıklarının azalttığı gösterilmiştir [18-23]. Bunlara ek olarak, MOR geni, özellikle ekson1'de rs1799971 ve intron 1'de rs514980 ve rs7773995 genotipleri, beden kitle indeksi (BMI) ve obezite ile pozitif olarak ilişki olduğu gösterilmiştir [24]. Opioidlerin gıda alımı üzerindeki moleküler mekanizması tam olarak anlaşılmassa da, merkezi opioid ve melanokortin sistemleri birbirleriyle etkileşim halinde olduğu bilinmektedir.

Melanokortinler, yeme davranışını düzenleyen ve proopiomelanokortin (POMC) olarak isimlendirilen öncüleri, hem gıda alımını azaltan α -melanosit uyarıcı hormonu hem de davranışının yanı sıra ruh hali ve gıda alımını etkileyen β -endorfini sentezler. Ayrıca POMC nöronları, kendi alt popülasyon nöronlarını hiperpolarize eden ve aksiyon potansiyel ateşlemesini susturan postsinaptik μ opioid reseptörlerini sentezler. Dahası, GABAerjik terminallerinde lokalize olan üç farklı opioid reseptörün aktivasyonu pre-

sinaptik POMC nöronlarını inhibe eder. Opioid agonistlerinin POMC nöronlarında pre-sinaptik etkileri ve ayrıca POMC nöronlarından sentezlenen ve sinaptik boşluğa salınan opioidlerin karşılıklı etkileşimler içinde olduğu göstermektedir [25].

Melanokortinler, melanokortin reseptörü 3 ve 4 (MC3R ve MC4R) reseptörleri ile yiyecek alımını azaltıcı yönde etki eder. Bu reseptörlerin endojen bir antagonisti olan agouti ile ilişkili peptid (AgRP) tarafından indüklenen gıda alımının uyarılması, opioid antagonisti nalokson veya naltrekson uygulaması ile azaldığı gösterilmiştir [26,27]. AgRP uyarımı ile oluşan gıda alımını MOR ve KOR opioid reseptörleri üzerinden olduğu göstermek için yapılan çalışmada, bu reseptörlerin birlikte inhibisyonu sonrası gıda alımı baskılanmıştır [28]. Ayrıca, bu opioid reseptörlerinin ayrı ayrı inhibe edilmesi sonrası AgRP'nin oreksijenik etkisini değiştirmemiştir [28]. Opioid ve melanokortin sistemi arasındaki yakın etkileşim, beta endorfinin (MOR ligandı) oreksijenik etkisinin MC3R ve MC4R reseptörleri için bir agonist tarafından baskılandığı gösterilmiştir [29].

Beslenme davranışı ve enerji dengesinin bir başka önemli nöron grubu NPY nöronlarıdır. Hipotalamik ARC'de birlikte lokalize olan NPY ve AgRP nöropeptidleri güçlü oreksijenik faktörlerdir. Yapılan çalışmalarda, NPY'nin oreksijenik etkisinin opioid sistemlerle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Örneğin, merkezi ve periferik nalokson uygulanması sonrası, NPY ile indüklenen beslenme davranışını azalttığı gösterilmiştir [30-33]. MOR ve KOR reseptörleri NPY'nin oreksijenik etkisine tetikleyen opioid reseptörleridir. NPY ile indüklenen beslenmeyi norBIN (KOR antagonisti) ve β -FNA'nın (MOR antagonisti) baskılamak, (DOR antagonisti) NPY etkilerini değiştirmedığı gösterilmiştir [30].

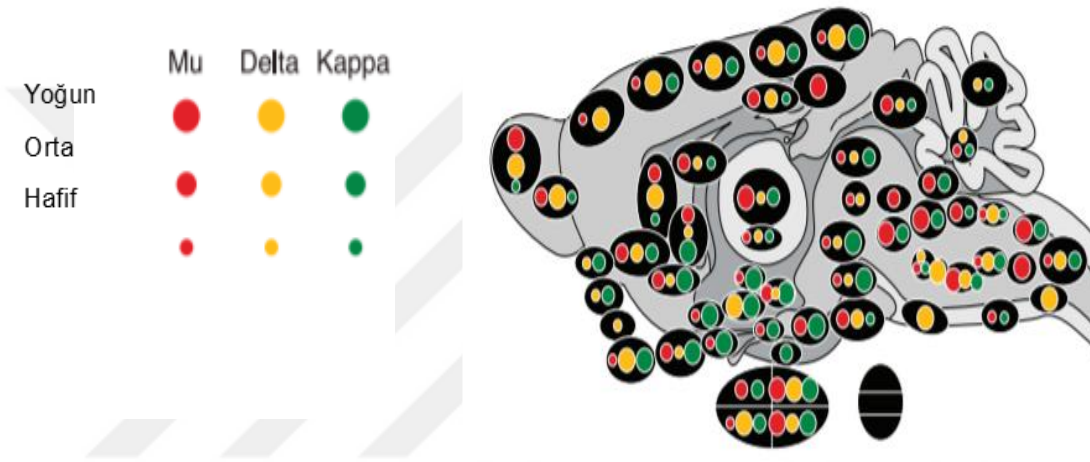
Oreksin A, lateral hipotalamusta bulunan başka bir oreksijenik nöropeptiddir. Yapılan çalışmalarda, oreksin uyarımı ile oluşan beslenme davranışının modülasyonu opioidler tarafından kontrol edildiği gösterilmiştir. Hipotalamik oreksin enjeksiyonu sonrası ventral tegmental alanda (VTA), paraventriküler çekirdekte (PVH) ve amigdalanın merkezi çekirdeğinde enkafalin gen ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir [34]. Buna karşı olarak sıçanlara naltrekson uygulanması sonrası oreksin-A'nın oreksijenik etkisinin azaldığı gösterilmiştir [35]. İlginç bir şekilde, naltrekson ayrıca, doğrudan akübens çekirdeğine uygulandığında oreksin A'nın etkilerini bloke etmekte, bu da oreksinin, beslenme davranışını uyarıcı etkisinin gıdanın ödüllendirici özellikleriyle ilgili olduğunu göstermektedir [23]. Bunun aksine opioidler, lateral

hipotalamusta lokalize olan melanin-konsantre edici hormonun oreksijenik etkilerine aracılık etmemektedirler [36]. Diğer bir önemli bulgu da, MOR agonisti olan DAMGO'nun akümbens çekirdeğe uygulanması sonrası alınan yüksek yağlı diyetin artmasına karşın VTA'da bozulmamış bir oreksin sinyali gösterilmiş olmasıdır [37]. Opioidlerin, oreksin sistemleri ile olan bu bağlantısı homeostatik ve hedonik gıda alım ve enerji homeostazisini modüle ettiğini düşündürmektedir.

Opioidler, homeostatik gıda alımının düzenlenmesinde görev alır ve ayrıca ödül mekanizmalarını uyararak şekerli solüsyonların ya da alınan besinin lezzetini düzenleyerek hedonik yönde katkı sağlamaktadır [38-40]. Hedonik beslemenin edinilmesi, mezolimbik dopamin yolunun aktivasyonunu, VTA'dan NAc bölgesine dopaminerjik projeksiyonu içerir ki bu muhtemelen yiyeceklerin ödül devresinin en önemli yolağı olarak düşünülmektedir. Endojen opioidler, mezolimbik dopamin yolunu hem VTA hem de NAc bölgelerinde düzenler [41]. Bu nedenle yapılan birçok çalışmada, opioid reseptör agonist / antagonistleri VTA ve NAc bölgelerine enjekte edilerek mezolimbik dopamin yolağı üzerine etkileri araştırılmıştır. Bazı çalışmalarda, opioidlerin ödül mekanizmaları üzerindeki etkilerinin, homeostatik mekanizmaların üzerindeki etkilerinden daha güçlü olduğu ileri sürülmektedir. Bu bakımdan nalokson uygulamasıyla yapılan çalışmada, farelerin su alımına kıyasla şekerli su alımını daha kuvvetli baskıladığı [42] ve ayrıca sakarinli solüsyon tercihini bloke ettiği gösterilmiştir [43]. Buna karşı, DAMGO'nun NAc bölgesine uygulanması sonrası hayvanlarda sakarin alımını artırdığı [44,45] ve VTA yapılan DAMGO enjeksiyonu sonrasında ise tok hayvanlarda gıda alımını indüklediği gösterildi [46]. Kemirgenlere naltrekson uygulanması sonrası sakaroz diyetinin alımını önemli ölçüde azalmasını sağladığı gibi, opioidler ayrıca yemek diyetine kıyasla bazı özel diyetlerin tercihini de modüle etmektedir [47].

Dahası, opioid reseptör antagonisti naltrekson, mezolimbik ödül yollağında ghrelin hormonunu indüklemesine rağmen beslenmeyi değiştirmemektedir [48,49]. Mide tarafından sentezi gerçekleşen peptid yapılı bir hormon olan ghrelin, ghrelin reseptörü aracılığıyla hareket edip hipotalamusta ve mezolimbik dopamin sisteminin farklı bölgelerinde yüksek oranda eksprese edilerek yiyecek alımının artmasına neden olmaktadır [50]. Ghrelin hormonunun VTA veya NAc çekirdeğine uygulandığında beslenme davranışını güçlü şekilde uyarmaktadır [51,52]. Bir başka önemli konu ise opioid antagonistlerinin çoğunun akut uygulanması sonrası gıda alımını azalttığı ancak

bazılarında ise kronik uygulanması sonrası da gıda alımını azalttığı gösterilmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda 3,4-dimetil-4-fenilpiperidinler opioid agonistinin kronik uygulaması sonrası farelerde gıda alımını azalttığı gösterilmiştir. Dahası, MOR ve KOR antagonisti olan LY255582, kronik olarak 7 gün boyunca intraventriküler olarak uygulandığında gıda alımını ve vücut ağırlığını azaltmıştır [53]. Aynı bileşikle yapılan başka bir çalışmada, obez Zucker sıçanlarına 30 gün boyunca subkutan olarak uygulandığında gıda alımının ve vücut ağırlığının azaldığı gösterilmiştir [20]. Ek olarak, yüksek yağlı diyetle beslenen sıçanlara 14 gün boyunca oral olarak opioid antagonistti LY255582 uyguladıklarında, sıçanlarda gıda alımını ve vücut ağırlığının azaldığını gösterilmiştir [21].



Şekil 1. Opioid reseptörlerinin nöroanatomik dağılımı [74].

2.1.2. Klasik Opioid Reseptör Sinyali

Opioid reseptörleri, medulla, locus coeruleus ve periakvaduktal gri alanı içeren ağrıyı modüle edici yollarda ekspres edilirler. Ayrıca limbik, orta beyin ve kortikal yapılarda da ifade edilmektedir. Opioid reseptörlerinin bu lokasyonlardaki aktivasyonu, doğrudan nöronları inhibe eder ve bu da omurilik ağrısı iletimini engeller [54,55]. Bu reseptörlerin disinhibisyona girme süreci çoğunlukla analjezi ile ilgili olarak anlaşılrsa da; opioid devrelerindeki yeni düzenleyici mekanizmaları ortaya çıkarmak için bu alandaki çalışmalar hala aktif şekilde devam etmektedir. Tüm opioid reseptörleri, inhibe edici G proteinlerine bağlanan transmembran proteinlerdir. Endojen opioid peptidi olan endorfin tarafından aktive olduğunda ya da morfin ve fentanil gibi eksojen agonistleri tarafından aktive edildikten sonra, $G\alpha$ ve $G\beta$ alt birimlerine ayrılır ve çeşitli hücre içi efektör yolları üzerine etki ederler [56,57]. Opioid reseptör farmakolojisindeki ilk çalışmalar, guanozin trifosfat (GTP) gibi guanin nükleotidlerinin, beyin dokusundan membran

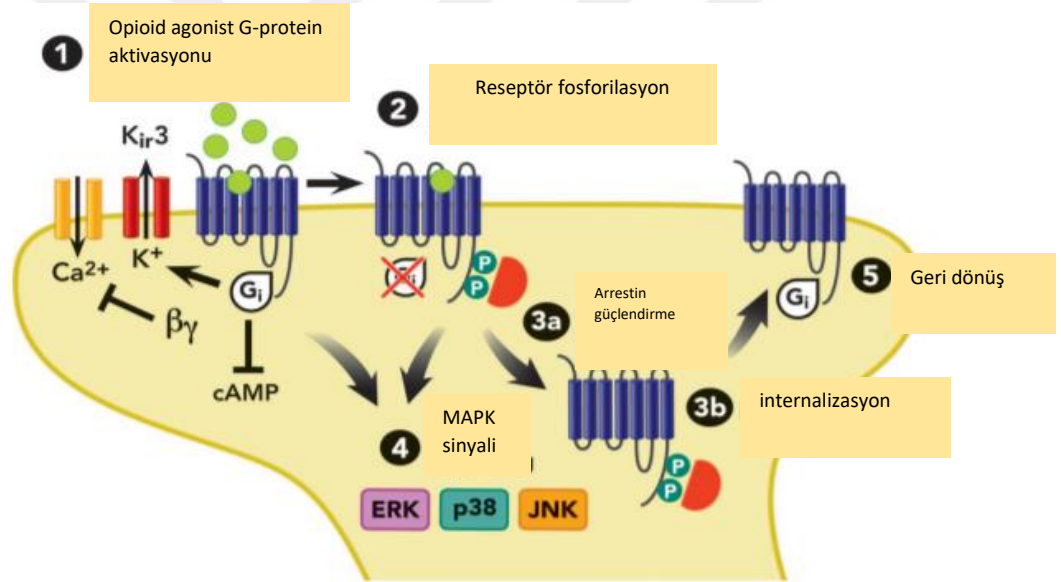
preparasyonlarında opioid reseptörlerine bağlanmayı modüle ettiğini göstermiştir. Daha sonra, GTPaz aktivitesinin opioid agonistleri ve endojen opioid peptidleri tarafından uyarıldığı gösterilmiştir [58]. Ayrıca opioid reseptörlerinin agonist stimülasyonunun, diğer G protein bağlı reseptör tiplerine (GPCR) benzer bir şekilde siklik adenosin monofosfat (cAMP) üretimini inhibe ettiği de gösterilmiştir [59]. Boğmaca toksini (pertussis toxin) kullanılarak seçici G protein adenosin difosfat (ADP) ribosil edildiğinde, opioid reseptörlerin G proteinleri üzerinden cAMP sinyali inhibe ettiği bulunmuştur [60,61].

Günümüzde, dört opioid reseptör türünün, boğmaca-toksine duyarlı G proteinleriyle birleştiği ve cAMP inhibisyonunu $G_{\alpha i}$ üzerinden gerçekleştirdiği yaygın olarak kabul edilmektedir. Opioid reseptör sinyal transdüksiyonunun klasik ve belki de en önemli yönü, opioidlerin kalsiyum ve potasyum iyon kanallarını modüle etme kabiliyetiyle ilgili olmasıdır (Şekil 2). $G_{\alpha i}$, $G\beta\gamma$ 'den ayrıldıktan sonra, G_{α} proteini alt birimi, G-proteini kaplı içe doğru rektifiye edici potasyum kanalı (Kir3) ile doğrudan etkileşime girer. Kanal deaktivasyonu, GTP'den guanozin difosfat hidrolizine ve $G\beta\gamma$ 'nin kanalla etkileşimden uzaklaştırılmasından sonra gerçekleşir [62-64]. Bu süreç hücrel hiperpolarizasyona neden olur ve tonik sinir aktivitesini engeller.

Yapılan bazı çalışmalarda, opioidlerin nöral uyarılabilirlik üzerindeki inhibe edici etkilerinin, opioid reseptörlerinin G proteini ile düzenlenen Kir3 ile etkileşimlerinden kaynaklandığı gösterilmiştir [65,66]. Aktive edildiğinde, dört opioid reseptörünün tümü, P / Q-tipi, N-tipi ve L-tipi kanal blokerlerine duyarlı olan Ca^{+2} akımlarında bir azalmaya neden olmaktadır [67]. Opioid reseptörünün neden olduğu kalsiyum iletkenliği inhibisyonu ayrılmış $G\beta\gamma$ alt biriminin doğrudan kanala bağlanması aracılık eder [67]. Bu bağlanma olayının, kanal gözenek açıklığının voltaj aktivasyonunu azalttığı düşünülmektedir [68,69]. Yapılan araştırmalarda, opioid reseptörlerinin Ca^{+2} kanalları ile etkileşime girdiğini ve modüle ettiği gösterilmiştir ki bu bulgular opioid reseptör modülasyonunda yer alabilecek spesifik Ca^{+2} kanal alt birimlerinin incelenmesine yol açmıştır. Örneğin, MOR stimülasyonunun $\alpha 1a$ ve $\alpha 1b$ alt birimlerinin G proteinine bağımlı inhibisyonuyla sonuçlandığı gösterilmiştir [70]. Opioid agonistlerinin akut uygulamasının, opiat toleransının gelişimi sırasında veziküler Ca^{+2} içeriğinin telafi edici düzenleme regülasyonu ile sinaptik veziküller ve sinaptozomlardaki Ca^{+2} içeriğini azalttığı da açık şekilde gösterilmiştir [71,72]. Bunlara ek olarak, μ , γ ve κ opioid

reseptörlerinin aktivasyonu adenilil siklaz aktivitesini inhibe ederek, cAMP'ye bağlı Ca^{+2} akışı da azalır.

Opioid reseptörlerinin, potasyum kanallarına pozitif olarak bağlanırken kalsiyum kanallarını negatif olarak modüle ettiğine dair kanıtlar, çok sayıda model sistem ve hücre tipinde bildirilmiştir. Uzun yıllar boyunca bunun, sinir sistemindeki opioid reseptörlerinin birincil eylemi olduğu düşünülüyordu. Opioid reseptörlerinin potasyum ve kalsiyum kanallarına olan bu etkileşim, hipokampustaki nöronlardan, locus coeruleus ve ventral tegmental alandaki nöronlardan dorsal kök ganglionlara kadar geniş bir sistem yelpazesinde gösterilmiş ve bu kanalların yüksek oranda korunmuş opioid reseptör substratları olduğu fikrini desteklemiştir. Her ne kadar opioid reseptörlerinin iyon kanalı modülasyonu üzerinde güçlü etkilere sahip olsa da diğer sinyal iletim yolları üzerinde güçlü etkilere sahip oldukları öne sürülmektedir.



Şekil 2. Opioid reseptör sinyalleşmesinin özeti [73].

2.2. Arkuat Çekirdek NPY Nöronları

AgRP nöronları, vücudumuzun beslenme ve enerji metabolizmasından sorumlu olan beynin hipotalamus bölgesinde lokalize olan nöron popülasyonlarıdır. Açlık durumunda ARC AgRP nöronlarında mRNA ekspresyonunda gözlenen artışla birlikte sirkadiyen aktivite seviyeleri de değişim göstermektedir. Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, AgRP nöron aktivitesinin karanlık fazın başlamasına kısa süre kala en yüksek aktivite seviyelerine ulaştığı gösterilmektedir [75-77]. Ayrıca ARC AgRP nöronları, vücut ağırlığı kontrol mekanizmasında ve enerji homeostazında görev alan, NPY ve γ -

aminobütirik asit (GABA) nörotransmitter maddelerin ekspresyonlarını da arttırmaktadır [78-84].

Hipotalamus tabanında median eminence (ME) yakınında bulunan ARC [85,86], kan yoluyla taşınan sinyaller tarafından erişilirdir. Enerji homeostazının düzenlenmesinden sorumlu moleküller, periferik uygulama sonrası ARC parankimasına (parankimine) hızlı difüze olarak ARC nöron aktivasyonunda değişime neden olmaktadır [87-92].

AgRp nöronlarının yapısında yer alan metabolik olarak aktif kabul edilen leptin, insülin ve ghrelin hormon reseptörleri bu nöronlarda periferik sinyallerle olan modülasyonunu desteklemekte ve sağlamaktadır [93-97]. Yapılan çalışmalarda ARC ve sirkumventriküler organlar arasındaki nöronal bağlantılara ek olarak ARC nöronlarının aktivitesini modüle eden alternatif bir periferik sinyal mekanizmasının olduğu öne sürülmüştür [98,99].

ARC AgRP nöronları, enerji homeostatik kontrolü için doğrudan veya dolaylı şekilde sinaptik uyarılar alabilmektedir. Örneğin hipotalamusun paraventriküler çekirdeğinden, tiotropin salgılatıcı hormon ve hipofiz adenilat siklaz aktive edici polipeptit eksprese eden nöronlar AgRP nöronlarına projeksiyon yapmaktadır [100].

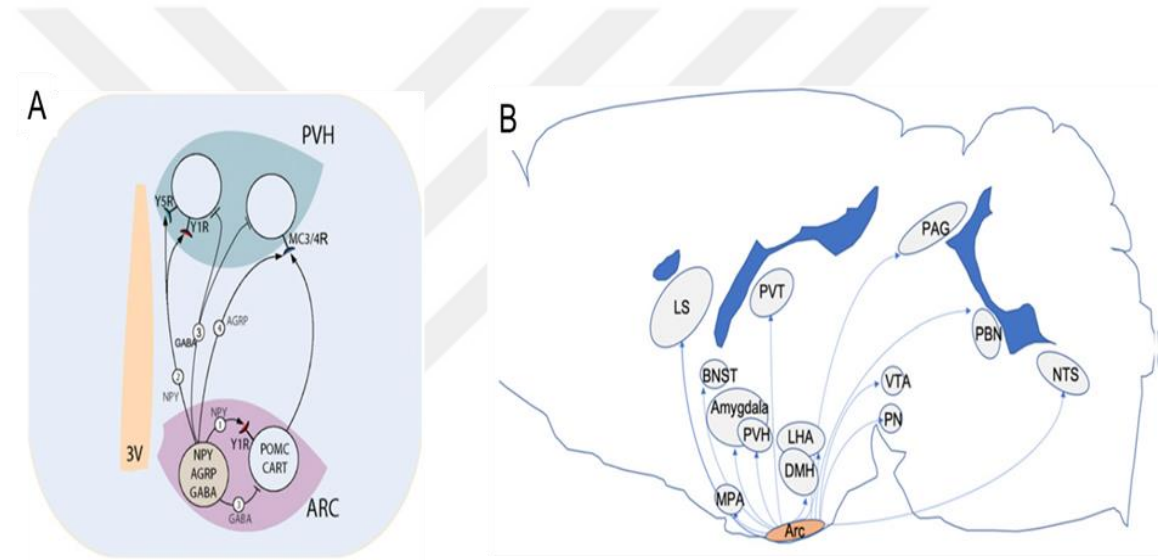
Ayrıca AgRP nöronları üzerinde bulunan nöropeptid FF reseptör 2 (NPFFR2) aracılığıyla hem doğrudan hem de dolaylı mekanizmalar ile başka afferent girdiler olarak sinyalleşmeyi sağlamaktadır [92].

ARC nöronlarından gelen AgRP ve birlikte ifade edilen nörotransmitterleri, beslenmeyi teşvik eden ve enerji tüketiminin azaltılmasını dört farklı sinyalleşme üzerinden yapmaktadır. (Şekil 2.3). Bu sinyalleşmelerden ilki olan NPY, POMC (komşu anoreksijenik proopiomelanokortin) ve CART (kokain-amfetamin düzenlenen transkript) nöronlarında yer alan postsinaptik Y1 reseptörlerine doğrudan etki ederek işlevini inhibe eder [78, 101]. ARC POMC ve CART nöronları tarafından salgılanan α -MSH, MC4R (melanokortin-4 reseptör)'nin aktivitesini sağlayarak hem beslenmenin azalmasını hem de enerji tüketimini artmasına neden olmaktadır [101,102].

İkinci sinyalleşme yolunda NPY, PVH'de ve farklı postsinaptik Y1 ve Y5 reseptörlerinin ekspresyonuna etki eden nöronları uyararak beslenmeyi teşvik etmektedir [101,103]. Üçüncü sinyal yolunda AgRp tarafından salgılanan GABA, POMC ve CART

nöronlarının ve diğer alt hedeflerin inhibitörü olarak görev yapmaktadır [101,104]. Dördüncü sinyalleşme yolunda ise AgRP, POMC tarafından salgılanan α -MSH'in postsinaptik MC3R ve MC4R reseptörleri üzerine olan etkisini inhibe etmektedir [101,105]. ARC AgRP nöronlarının yapmış olduğu projeksiyon ağı Şekil 3'de gösterilmiştir.

POMC ve MC4R sinyalinin düzenlenmesi için ARC NPY nöronlarından gelen sinaptik uyarıların aksine melanokortin reseptör agonistlerinin ve AgRP agonistlerinin, NPY nöronlarının elektriksel özelliklerini büyük ölçüde etkilemediği gösterilmiştir [106]. Bu bulgu ARC NPY nöronlarının beslenme ve enerji metabolizmasında oldukça önemli rol aldığını desteklemektedir.



Şekil 3. Arkuat AgRP nöronlarının yapmış olduğu projeksiyon haritası [117].

NPY eksprese eden hücre popülasyonlarının beyindeki geniş dağılımı, kapsamlı, çoklu ve örtüşen terminal bağlantıların kurulmasına olanak sağlar [106]. Fakat, bu hücrelerin AgRP ile ortak olarak bulunduğu bölge oldukça sınırlı ve bu ortak lokalize olunan popülasyon sadece ARC'da bulunmaktadır [79,80].

ARC'da AgRP'nin bu lokalize ve kısıtlı ifadesi, ARC NPY nöron projeksiyonlarını ve AgRP immünoreaktivitesini tanımlamak veya NPY promotörü yerine AgRP gen promotörüne dayalı araçlar kullanarak bu nöronları manipüle ederek fonksiyonları incelenmiştir. ARC NPY nöronlarının büyük bir bölümünü kapsamasına rağmen, AgRP ifade etmeyen bir ARC NPY nöron alt kümesinin varlığını göstermeyi amaçlayan çalışmalar yapılmıştır [79,107-110]. Bu nedenle, AgRP eksprese eden

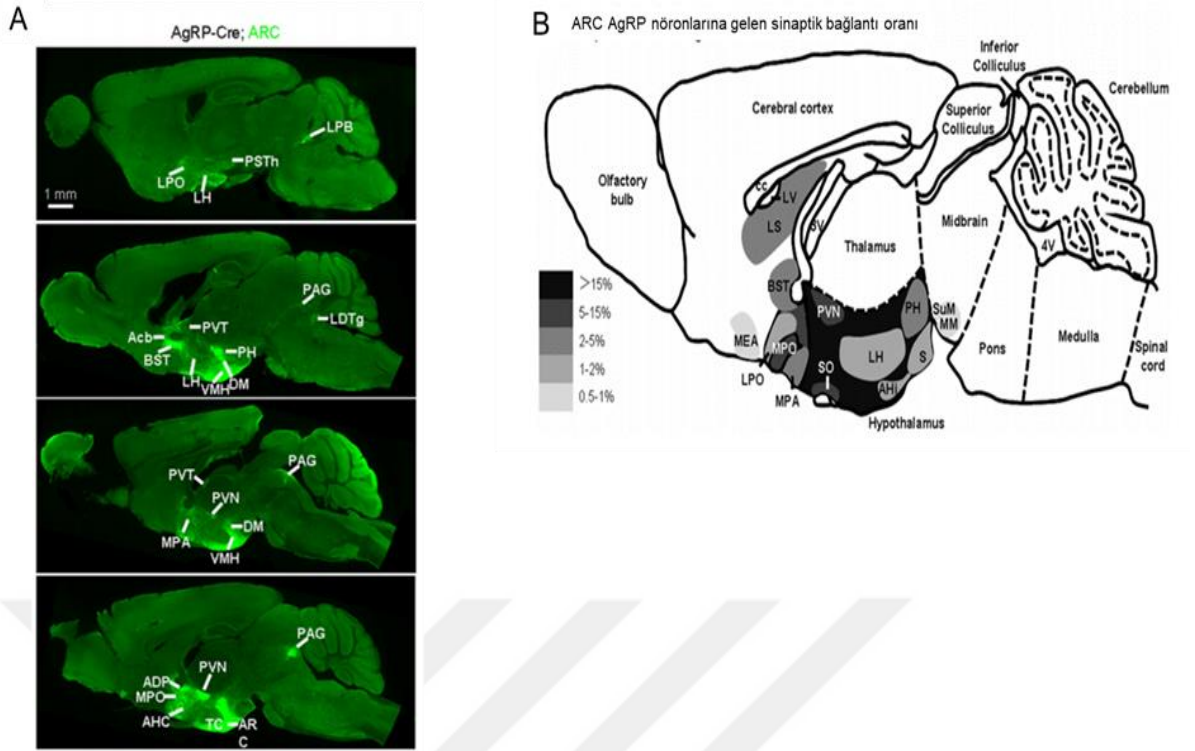
nöronlar bir “toksin reseptörü aracılı hücre nakavtı” yaklaşımı ile ablasyona tabi tutulduğunda, ARC'da hala NPY-pozitif hücrelerin %15'i kalmaktadır [108].

Benzer şekilde, NPY Cre farelerde, AgRP eksprese eden hücreler spesifik olarak silindiğinde ARC'da %15 oranında NPY pozitif hücre görülmüştür. Bunlara ek olarak, AgRP eksprese eden hücrelerin kırmızı floresan protein td-TOMATO ile NPY eksprese eden hücrelerin yeşil floresan protein ile işaretlendiğinde ARC'daki bir nöron popülasyonunun NPY ifade ettiğini ancak AgRP'yi ifade etmediğini gözlemlenmiştir [107]. Bu nedenle, bir işaretleyici olarak AgRP veya AgRP Cre hattı kullanan çalışmalar, tüm ARC NPY popülasyonu yerine yalnızca ARC NPY nöronlarının bir alt kümesini inceleyebilir.

Ayrıca, tek hücreli dizileme ve diğer teknolojik yollarla, ARC NPY popülasyonunda yukarıda bahsedilen ikiye bölünmüş sınıflandırmaya göre çok daha fazla heterojenlik olduğu gösterilmiştir [109,110]. ARC NPY nöronlarının farklı nörokimyasal özellikleri ve buna karşılık gelen projeksiyonları ve işlevleriyle sonuçlanan bu heterojenliğe ek araştırmalar yapılması gerekmektedir. Çünkü beslenme ve enerji metabolik kontrol çalışmalarında kullanılan AgRP Cre farelerden bahsedilirken “ARC NPY/AgRP” kullanılmaktadır.

AgRP nöronlarının projeksiyonlarını belirlemek için yapılan çalışmada ARC AgRP nöronları hem hipotalamik hem de ektrahipotalamik alanlara sinaptik bağlantılar kurarak innervasyon oluşturduğu gösterilmiştir.

Bu bağlamda AgRP nöronları ön beyinde bulunan lateral septal (LA), stria terminalis (BNST) ve amigdala bölgesine, orta beyinde yer alan medial preoptik alan (MPA), periventriküler alan (PVH), dorsomedial hipotalamus (DMH), (LHA), talamusun paraventriküler çekirdeklerine (PVT), arka beyinde bulunan paranigral çekirdek (PN) ve (VTA), dorsal rafe çekirdek (DR), periakvaduktal gri (PAG) ve parabrakiyal çekirdek (PBN) bölgelerine farklı yoğunlukta sinaptik projeksiyonlar (Şekil 4) yaptığı gösterilmiştir [79].



Şekil 4. Arkuat AgRP nöronlarının GFP ile işaretlenmesi sonrası projeksiyon yoğunluk haritası [116].

ARC NPY/AgRP nöronların bu bölgelerdeki hedef nöronlara yollamış olduğu inhibisyon akımlarını, yapılan çalışmada AgRP nöron ablasyonu gerçekleştirilerek, projeksiyon yaptığı bu bölgelerden c-fos aktivitesi bakılarak gösterilmiştir [111,112]. Yapılan bu haritalama sonuçları değerlendirildiğinde, NPY/AgRP nöronlarının hedefi olan birçok beyin bölgesinde, ARC, PVH, DMH, MPA, LS, PAG dahil olmak üzere ARC NPY/AgRP nöronlarının ablasyonundan sonra c-fos ekspresyonunun güçlü aktivasyonunu gösterirken, BNST, VTA ve PN, c-fos aktivitesi göstermedi veya çok az gösterdiği saptanmıştır [79, 112,113]. ARC NPY/AgRP nöronlarının ablasyonundan sonra bu beyin bölgelerinde c-fos ekspresyonun olmaması, oluşan zayıf bir uyarıcı girdiden kaynaklanabilir veya alternatif olarak ARC NPY/AgRP nöronlarından gelen inhibisyon, toplam inhibitörün sadece küçük bir kısmını oluşturabilmektedir [114,115].

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Deneyler, Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Beyin Araştırmaları ve University of Iowa Sinirbilim ve Farmakoloji Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Deney protokolü Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu (YÜDHEK) 27.08.2020 tarihinde 2020/08-9 no'lu kararla onaylanmıştır.

3.1. Kullanılan Deney Hayvanı

Bu tez çalışmasında, yirmişer adet dişi ve erkek (6-8 haftalık) transgenik Agrp-Ires-cre (Jax. Lab. #012899) fareler kullanılmıştır. Bu fareler Jackson Laboratuvarından (ABD) ithal edilmiş ve üretilmiştir. Deney hayvanları 21 ± 1 °C oda ısısı ve 12 saat aydınlık-karanlık ortamda tutuldular. Farelere standart fare yemi ve normal musluk suyu *ad libitum* olarak verildi. Deneyler, in-vivo (n=11 fare) ve ex-vivo (n=29) olmak üzere iki grup oluşturularak yürütüldü.

3.1.1. Farelerin Üretim Stratejisi

Bu çalışmada kullanılan Agrp-Ires-cre (Jax. Lab. #012899) transgenik fare hattı Jackson laboratuvarından 1 erkek ve 1 dişi fare olacak şekilde ithal edilmiştir. Jackson laboratuvarının önerdiği şekilde Homozigot x Homozigot çiftleşme stratejisi uygulandı. Bu stratejiye uygun olarak iki dişi ve bir erkekten oluşan çiftleşme kafesi oluşturuldu. Sonrasında farelerin siklus takibi yapıldı ve gebe kalan fareler bireysel kafeslere alındı. Tüm bu AgRP-Cre fare hattının üretimi ve bakımı Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde (YÜDETAM) yapıldı.

3.1.2. Genotipleme

Yeni doğan yavruların laktasyon dönemi beklendi ve 22. günde hayvanlar cinsiyetlerine göre ayrıldı. Daha sonra 22. günde yavruların kulaklarına küpe takılarak, kulak dokusu alındı. Kulak dokuları +4 °C'de DNase'den arındırılmış deney tüplerine alındı. Her bir örneğe 100 µl 25 mM NaOH/0.2 mM EDTA solüsyonundan eklendi. Bu örnekler 98 °C'de 60 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 19 °C'ye alınan dokular 100 µL 40 mM Tris-HCl solüsyonu ile 4000 rpm'de 3 dakika santrifüj (Mikrosantrifüj, Sigma 1-14) edildi. Hazırlanan solüsyon genotipleme için yeni tüplere aktarıldı.

3.1.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Elde edilen yeni solüsyondaki DNA tabloda belirtilen malzemeler ile karıştırılarak PZR karışımı oluşturuldu. PZR deneyi için her biri için kontrol ve transgenik PZR karışımı oluşturuldu. Ardından, yeni tüplerin son hacimleri 12µl olacak şekilde üzerlerine ddH₂O eklendi.

Tablo 1. Kontrol PZR içerikleri.

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

Tablo 2. Transgenik PZR içerikleri.

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

Tablo 3. Kullanılan Primer Dizileri.

Primer	Dizi (5' → 3')
Ortak primer	GAAAAGATAAGGCCTTCAAGTGCT
İç pozitif kontrol geri primer	GATCTTCTGCAGTATCTTCCTC
Transgenik primer	ATCGACCGGTAATGCAGGCAA

Hazırlanan PZR tüpleri aşağıda tabloda (Tablo 4'te) belirtilen protokolü uygulamak üzere (Multigene Optimax, TC9610) cihazına yerleştirildi.

Tablo 4. PZR protokolü.

Döngü	Sıcaklık	Süre
1	95°C	30 sn
38	95°C	30 sn
38	60°C	30 sn
38	68°C	60 sn
1	68°C	5 dk

Hazırlanan karışım PCR cihazına (Labnet, Multigene Optimax) konularak, reaksiyon başlatıldı. Reaksiyon sonunda, 1 X Tris-Borik asit- EDTA (TBE) (40 mM Tris-Cl, 45 mM borik asit, 1 mM EDTA) içerisinde %2 agaroz hazırlandı. Görüntülemeye DNA'nın seçilebilmesi için 200 ml jel içerisine 10 µl EzView Stain (Biomatik, A4205, Kanada) eklendi. Sonrasında hazır hale gelen jel 0,5 X TBE içeren elektroforez tankına (BioRad, ABD) yerleştirildi. PZR ürünleri 8X jel yükleme boyası (NEB, B7024S, İngiltere) ile 1:8 oranında karıştırıldı. Kuyucuklara 12 µl PZR ürünü ve ilk kuyucuğa 4 µl DNA ladder (NEB, N3232, İngiltere) yüklendi. Tank kapağı yavaş şekilde kapatılarak protokole uygun şekilde 120 V 300 mA 25 dakika elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Deney sonrası jel Biorad Chemidoc sistemi kullanılarak görüntülendi. Alınan görüntü Şekil 5'de gösterilmiştir.



Şekil 5. AgRP Cre fare PCR sonucu.

3.2. Cre rekombinaz Bağımlı AAV virüslerin İntrakraniyal Enjeksiyonu

Intrakraniyal enjeksiyonu için ABD'de bulunan AddGene firmasından (www.addgene.org) AAV-CAG-Flex-GFP virüsü satın alındı. Tercih edilen bu virüsün genetik haritasında GFP geni ile Cre enziminin bağlandığı LoxP genlerini de içermesidir. Bu sistemin sunmuş olduğu avantaj Cre bağımlı transgenik fare hatlarında cre rekombinat enzimini içeren spesifik nöronları işaretleyerek, bu nöronların GFP sentezlemesine olanak sağlamasıdır. Bu çalışmada AgRP-Cre farelere AAV-CAG-Flex-GFP virüsü enjekte edilerek AgRP nöronlarının GFP ile işaretlenmesi gerçekleştirildi. Virüs enjeksiyonları stereotaksik (David Kopf) cihaz içerisinde izofluran gaz anestezisi kullanılarak yapıldı (Şekil 6). İntrakraniyal enjeksiyonların yapım aşaması, fareler hafif izofluran anestezisi altında stereotaksik cihazına yerleştirildiler. Cihaza yerleştirildikten sonra, solunabilir oksijen ile %1,5-2 izofluran uygulanarak fareler derin anestezide alındı.

Gaz anestezi işlemi operasyon boyunca devam etti. Fareler derin anesteziye girdiklerinden emin olduktan sonra tıraş makinası vasıtasıyla kafa derisi üzerindeki kılların kesimi gerçekleştirildi. Bu işlem bittikten sonra tıraş edilen kısım kulak pamuğu kullanılarak antiseptik uygulandı. Sonrasında farelerin kafa derisine insizyon yapıldı. Manipülasyon yapacağımız kısma soğuk Hidrojen Peroksit (H_2O_2) ve serum fizyolojik uygulayarak kafatasında bulunan Bregma – Lambda noktalarının görünürlüğü artırıldı. Elektrot tutucu ile fare Bregma- Lambda noktaları arası uzunluk ölçüldü. Hipotalamik ARC bölgesinin koordinat noktaları fare beyin atlasında belirtildiği gibi 1,35 mm posteriyor, $\pm 0,35$ mm lateral ve 5,85 mm vertikal olarak belirlendi [118]. Stereotaksik cihazına yerleştirilen her farenin Bregma-Lambda noktaları arasındaki mesafe ölçümü yapılarak, bu koordinatlara göre oranlaması yapıldı. Yeni oluşan enjeksiyon noktasına cerrahi matkap (tur aleti) kullanılarak küçük bir delik açıldı. Beyin içi enjeksiyonlarda kullanılan mikro pipetlerin (Drummond Scientific, Wiretrol, Broomall-PA) uçlarının beyin dokusuna daha az zarar vermesi için pipet çekme cihazı (Narishige, Japonya) ile uçları daha ince ($50\mu m$) çap genişliği olacak şekilde ayarlandı. İşleme uğramış pipetlerin içlerine mineral yağ ile dolduruldu ve mikro manipülatör cihazına yerleştirildi. Pipet içindeki mineral yağın bir kısmı dışarı çıkartılarak, yerine $1,2\mu l$ virüs çekildi. Hipotalamik ARC bölgesine iki taraflı intrakraniyal olarak 600 nl virüs enjekte edildi. Her bir bölgeye enjeksiyon yapıldıktan sonra 15 dakika beklenildi. Tüm işlemler bittikten sonra kafa derisi 4.0 cerrahi iplikle dikiş atıldı. Dikiş sonrası manipülasyona uğrayan bölge tekrar antiseptik kullanılarak temizlendi. Enjeksiyon sonra AgRP nöronlarının GFP üretmeleri için yaklaşık iki hafta beklendi. Sonrasında deney protokolüne göre işlemler yapılmaya başlandı.



Şekil 6. Stereotaksik cihaza yerleştirilen farede cam pipetle virüs enjeksiyonu.

3.3. Beyin Kesiti Hazırlanması

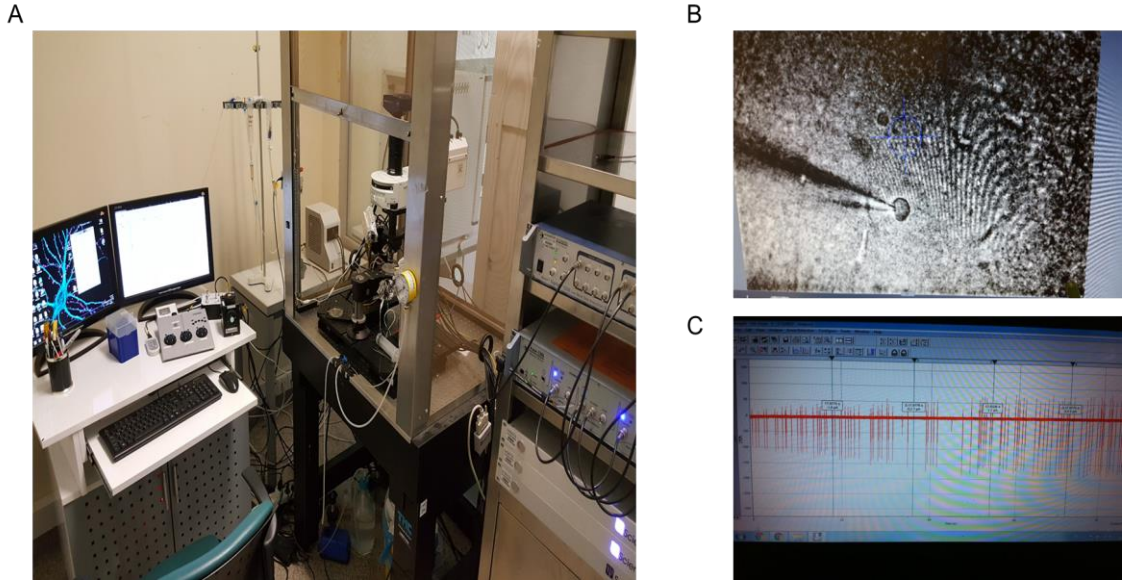
Etik kurul başvurusunda belirtildiği gibi GFP virüsü ile enjeksiyon yapılan AgRP-Cre fareler uygun şekilde anestezi altında dekapite edildi. Fare beyinleri hızlı bir şekilde kesme (cutting) solüsyonu içerisine aktarılarak vibratom (Campden Instruments 5100mz) cihazı ile 250 μ M kalınlığının da arkuat çekirdeği içeren kesitler alındı (Şekil 7’de). Kesme (cutting) solüsyon içeriği: (92 mM NMDG, 2.5 mM KCl, 1.25 Mm NaHPO₄, 30 mM NaHCO₃, 20 mM HEPES, 25 mM Glikoz, 2 mM Tiyoüre, 5mM Na-askorbat, 3 mM Na-piruvat, 0.5 mM CaCl₂·2H₂O ve 10 mM MgSO₄·7H₂O). Beyin dokuları kesim ve bekleme süreleri boyunca daima %95 O₂ /%5 CO₂ gazı ile müdahale edildi. Vibrotom cihazı ile alınan kesitler, pastör pipet vasıtasıyla HEPES içeren yapay beyin omurilik solüsyonu (aCSF). HEPES- aSCF içeriği: (92 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 30 mM NaHCO₃, 20 mM HEPES, 25 mM Glikoz, 2 mM Tiyoüre, 5mM Na-askorbat, 3 mM Na-piruvat, 2 Mm CaCl₂ · 2H₂O ve 2mM MgSO₄ · 7H₂O) aktarıldı. Kesitler bu solüsyon içerisinde en az 1 saat inkübe edildi. Daha sonra elektrofizyoloji banyosunda perfüze edilen kayıt solüsyonu içerisine aktarılarak, işaretlenmiş nöronlardan elektrofizyoloji patch clamp tekniği kullanılarak, gevşek kayıt (cell-attach) ve tüm hücre (whole cell) kayıtları alındı. Kayıt solüsyonu (recording aSCF içeriği): (124 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 24 mM NaHCO₃, 12.5 mM Glikoz, 5 mM HEPES, 2 Mm CaCl₂·2H₂O ve 2 mM MgSO₄·7H₂O) [119].



Şekil 7. Beyin kesitlerinin alınması.

3.4. Elektrofizyoloji kayıtları (Patch clamp)

Protokole uygun olarak hazırlanan fare beyin kesitleri, pastör pipet vasıtasıyla patch clamp (MultiClamp 700B Axon CNS) banyosuna yerleştirildi. Şekil 8’de Faraday kafesi içindeki cam pipet sistemi ve banyo, amplifikatörler ve kayıt sistemi görülmektedir. Elektrofizyoloji cihazının banyosunda daima kayıt solüsyonu gazlanarak perfüze edildi. Öncelikle hipotalamus arkuat çekirdekte lokalize olan ve GFP ile işaretlenmiş AgRP nöronlarından gevşek kayıt tekniği ile popülasyon kayıtları alındı. Her fare beyin kesitlerinden yaklaşık 20 nöron kaydı alındı. Sonrasında cihazın banyosuna 2 μ M DAMGO perfüze edilerek AgRP nöronlarından aynı şekilde popülasyon kayıtları alındı. Bu teknikle alınan kayıtlarda (gevşek kayıt) pipetinin içerisinde kayıt solüsyonu bulunmaktadır ve pipet direnci 7-9 M Ω olacak şekilde ayarlandı. Gevşek kayıt tekniği ile alınan bu bulgular, AgRP nöronlarının üzerinde oluşan ateşleme frekansının DAMGO varlığında nasıl değiştiğinin göstermektedir. Aynı şekilde farklı beyin kesitlerinde Nalokson (opioid antagonisti) denenerek kayıtlar alındı. Tüm hücre (whole-cell) kayıtlarında pipet direnci 3-5 M Ω olacak şekilde ve pipet içerisinde intenal solüsyon ile dolduruldu. Bu teknikle alınan kayıtlarda, AgRP nöronlarına gelen inhibisyon ve uyarıcı akımların kayıtları alındı. Öncelikle hücre zarına sıkı şekilde mühür yapılarak, hücre zarının kırılması gerçekleştirildi. Diğer protokole benzer şekilde her beyin kesitinden kontrol kayıtları alındıktan sonra elektrofizyoloji banyosuna DAMGO ve Nalokson perfüze edildi. Uyarıcı post sinaptik akımların (EPSC) kaydı alınması sırasında banyoda daima GABA_a (50 μ M) antagonisti PicROTOXIN kimyasalı bulunurken, inhibe edici post sinaptik akım (sIPSC) kayıt alma sırasında ise banyoda AMPA / kainate glutamat reseptör antagonisti ve NMDA reseptör antagonisti olan CNQX (10 μ M) ve AP5 (50 μ M) kimyasalı bulunarak hücreyi V=-65mV da kenetleyerek (Patch Clamp) kayıtlar alındı. Voltaj clamp (voltaj kısaç) kayıtları için kullanılan solüsyon içeriği: 125 CsCl mM, 5 NaCl mM, 10 HEPES mM, 0.6 EGTA mM, 4 Mg-ATP mM, 0.3 Na₂GTP mM, 10 lidokain N-etil bromür (QX-314) mM, (pH 7.35 ve 290 mOsm⁻¹). Current clamp (akım kısaç) kayıtları için kullanılan solüsyon içeriği: 125 potassium gluconate mM, 6.7 KCl mM, 10 HEPES mM, 1 EGTA mM, 4 Mg-ATP mM, 10 sodium phosphocreatine mM (pH 7.25; 290 mOsm⁻¹). AgRP nöronlarından alınan elektrofizyoloji kayıtlarının frekans, peak amplitude (tepe genliği) değerlerini analiz etmek için Clampfit 10.7 programı kullanıldı.



Şekil 8. Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin Araştırmaları Laboratuvarı

A) Elektrofizyoloji kayıt cihazı B) Kayıt pipetiyle nörona seal (mühürleme) yapılması
C) Elektrofizyoloji kayıt örneği

3.5. Beslenme davranışı

Enjeksiyonu yapılan farelere (n=11) virüs enfekte süresi beklenildikten sonra tekli davranış kafeslerine alındı. Dört gün kafeslere alışma süresi verildi. Sonrasında farelerden 24 saatlik periyotlarda beslenme davranışı alındı. Bu farelerden 5 gün boyunca 200µl saline i.p enjeksiyonu yapıldı ve her gün saat 16:00 da tüketilen yem miktarı ölçümü alındı. Aynı farelere 5 gün boyunca 1mg/kg i.p DAMGO enjekte edilerek, yem tüketimleri takip edildi. Farelerin tüketmiş oldukları yem miktarları excell dosyasına aktarılarak analizleri yapıldı.

3.6. Lokomotor aktivite (Home Cage Activity)

GFP virüs enjeksiyonu yapılmış AgRP fareleri (n=11) virüs enfekte süresi (yaklaşık 2 hafta) süre beklendikten sonra davranış kafeslerine alındılar. Bu kafeslerin özelliği farelerde yem ve su tüketimi hızlı ve doğru şekilde takip ediliyor olmasıdır. Ayrıca kafeslerde sensör ve kamera takılabilecek aparatların olması, farelerle yapılacak davranış deneylerinde kolaylık sağlamaktadır. (Şekil 3.6.) Bu tez çalışmasında DAMGO (µ opioid agonistinin) farelerde lokomotor davranışlarına etkileri araştırıldı. Tüm fareler davranış kafeslerine alındıktan sonra, bu kafeslere alışmaları için 3 gün beklendi. Farelerden lokomotor aktivite kayıtları alabilmek için, davranış kafeslerine gece görüşlü kamera sistemi takıldı. Böylelikle kameralar vasıtasıyla 24 saat boyunca farelerin aktivite

davranışları kayıt altına alındı. Farelere DAMGO i.p enjeksiyonu yapılmadan önce 5 gün boyunca normal davranış kayıtları kaydedildi. Bu süre zarfında farelere her gün 200µl (i.p) saline uygulandı. Altıncı gün aynı farelere 1mg/kg dozunda DAMGO enjekte edilerek farelere 7/24 şeklinde kamera kayıtları takip edildi. DAMGO enjeksiyon protokolüne 5 gün boyunca devam edildi. Alınan tüm görüntü kayıtları Noldus EthoVision XT 15.0 davranış programında analiz edilerek ısı haritası (heat map) grafikler oluşturuldu.

3.7. Virüs enjeksiyonu ve fiberoptik yerleştirme (In vivo)

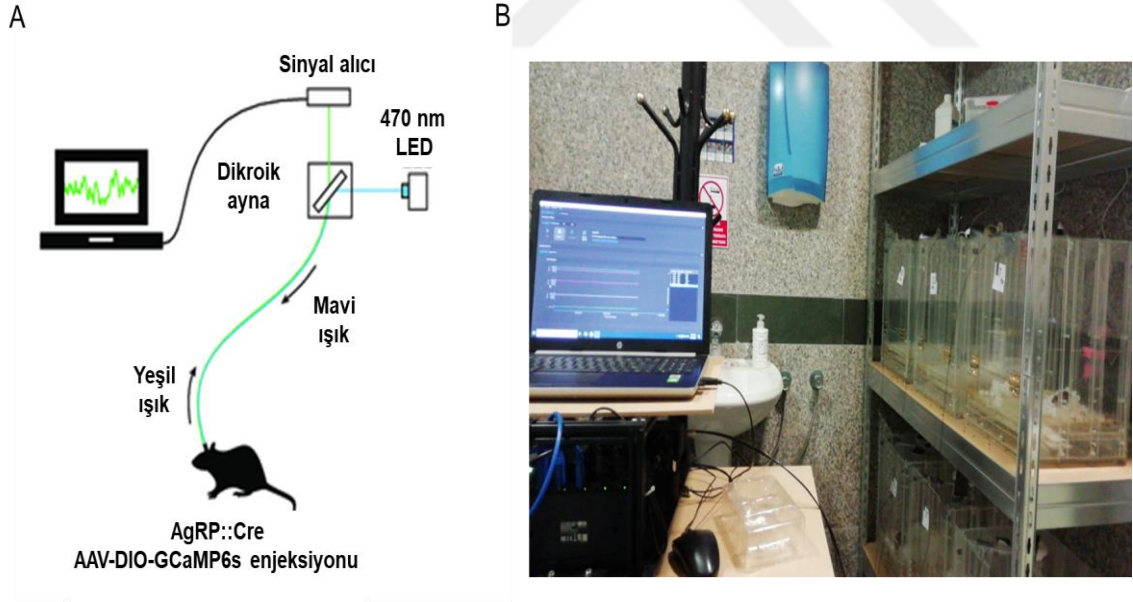
Yukarıda koordinat belirleme protokolü detaylı anlatıldığı şeklinde AgRP-Cre farelerde ARC bölgesine Ca^{+2} sinyaline duyarlı Cre bağımlı AVV.Syn.Flex.GCAMP6s.WPRE.SV40 virüs enjeksiyonu yapıldı. Koordinatları 1,35 mm posteriyor, $\pm 0,35$ mm lateral ve 5,85 mm vertikal olarak belirlendi. *In vivo* kayıt alabilmek için farelerin ARC üzerine fiberoptik bir kablo (200 µm diameter açıklık; BFH37-200 Multimode; NA 0,37 Thor labs) yerleştirildi. Işık geçirgenliği %80 üzeri olan fiber kablolar kullanıldı [120]. Beyin içine yerleştirilen fiber kablonun, kafatası üzerine seramik kısmını tutturmak için C&B Metabond Quick Cement ve dental akrilik kullanıldı (Şekil 9).



Şekil 9. In vivo kayıtlar için ferül yerleştirilmiş fare.

3.8. Fiber Fotometri (Ca²⁺ görüntüleme)

In vivo fiber fotometri için öncelikle AgRP-Cre farelere intrakraniyal AVV.Syn.Flex.GCaMP6s.WPRE.SV40 virüs enjekte edildi. Virüs enjeksiyonu yapıldıktan sonra aynı koordinatları kullanılarak beyin içerisine (200 µm diameter açıklık; BFH37-200 Multimode; NA 0,37 Thor labs) yerleştirildi ve kafatasına dental akrilik ile tutturuldu. Aynı şekilde virüs enfekte süresi (2 hafta) beklenildi. Sonrasında 2 eksitasyon ve 1 emisyon portu ile donatılmış bir fiber fotometri Mini Cube (Doric Lensler) kullanıldı. Birinci eksitasyon portu (400-420 nm) ikinci eksitasyon portu (460-490 nm) ve emisyon portu (500-550 nm) dir. Tüm deneyler sırasında fiber ucundan çıkan ışık yoğunluğu (10-15 µW) aralığında sabit tutuldu. Alınan Ca²⁺ sinyal verisi içerisinde, Ca²⁺ sinyaline ait olmayan sinyaller filtre edildi. Alınan sinyaller $\Delta F / F$ formülü kullanılarak hesaplandı. $\Delta F / F = (473 \text{ nm} - 405 \text{ nm}) / 405 \text{ nm}$. Tüm *in vivo* kayıtlar (Doricstudio) programı kullanılarak analiz edildi [120]. Elde edilen bulgular excell programına aktarılarak, grafik hazırlandı. Tipik bir fiber fotometri sistemi üç ana bileşenden oluşur: Şekil 10'da gösterilmiştir.

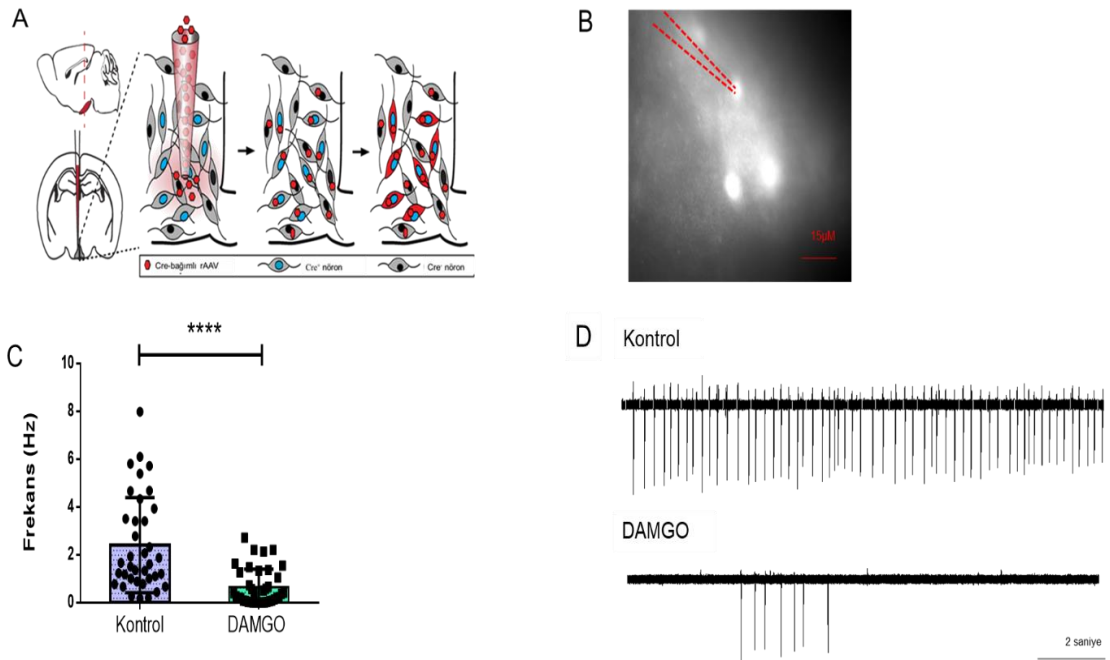


Şekil 10. A) Standart bir fiber fotometri çalışma şeması B) Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin Araştırmaları Laboratuvarı.

4. BULGULAR

4.1. DAMGO'nun (μ opioid agonisti) arkuat AgRP nöronlarının ateşleme frekansına etkisi

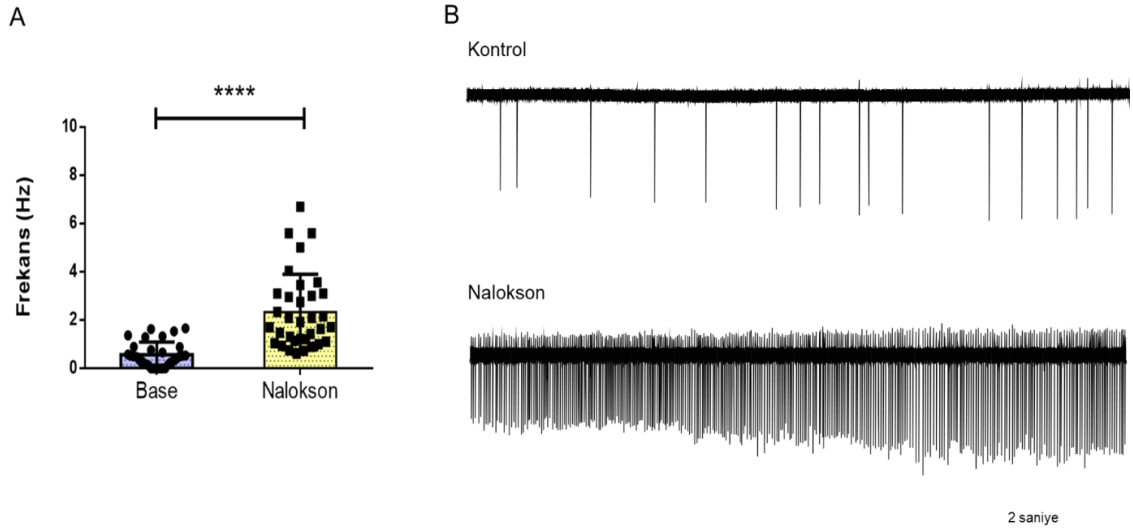
Açlık durumunda AgRP nöronlarında artan elektriksel aktivite cell-attach tekniği kullanılarak sıklıkla gösterilmiştir [121]. Bu bağlamda hipotez doğrultusunda aç bırakılan AgRP-Cre farelerden alınacak olan cell-attach kayıtlarına, μ opioid agonisti olan DAMGO'nun bu nöronlarda oluşan ateşleme frekansına etkisi araştırıldı. Öncelikle GFP enjeksiyonu yapılan AgRP faresi uygun şartlarda dekapite edilerek hipotalamus bölgesini içeren kesitler alındı. Metot kısmında detaylı anlatıldığı gibi, alınan kesitler elektrofizyoloji cihazının banyosuna aktarıldı. Sonrasında elektrofizyoloji banyosuna GABAa (50 μ M) antagonisti Picrotoxin ve AMPA / kainate glutamat reseptör antagonisti ve NMDA reseptör antagonisti olan CNQX (10 μ M) ve AP5 (50 μ M) perfüze edilerek AgRP nöronlarından popülasyon kayıtları alındı. Yeteri düzeyde kayıtlar alındıktan sonra elektrofizyoloji banyosuna bu sefer DAMGO perfüze edilerek tekrar aynı beyin kesitleri üzerinden GFP ile işaretlenmiş AgRP nöronlarından kayıtlar alındı. Elde edilen bulgular, açlıkla birlikte ateşleme frekansı artan AgRP nöronlarının, banyoya DAMGO eklenmesiyle anlamlı derece inhibe olduğu Şekil 11'de gösterilmiştir. (Kontrol: 2.4 ± 0.32 Hz n=37 nöron, DAMGO: 0.64 ± 0.12 Hz n=39 nöron / 4 fare) Alınan frekans sonuçları T-test nonparametric Kolmogorov-Smirnov testi ile karşılaştırıldı (P < 0,0001).



Şekil 11. DAMGO'nun arkuat AgRP nöronlarının ateşleme frekanslarına etkisi A) Transgenik farelerde Cre bağımlı virüsün ekspresyonu B) GFP ifade eden AgRP nöronlarının konfokal mikroskopi görüntüleri. C) Beyin kesitlerinden alınan elektrofizyoloji kayıt sonuçları (Kontrol: 2.4 ± 0.32 Hz n=37 nöron, DAMGO: 0.64 ± 0.12 Hz n=39 nöron / 4 fare) Alınan frekans sonuçları T-test nonparametric Kolmogorov-Smirnov testi ile karşılaştırıldı (P <0,0001). D) GFP enfekte olan AgRP nöronlarından alınan örnek elektrofizyoloji kayıtları.

4.2. Nalokson'un (μ opioid antagonisti) arkuat AgRP nöronlarının ateşleme frekansına etkisi

AgRP nöronlarında açlık durumunda artan ateşleme frekansı, DAMGO uygulandığında inhibe olduğu gösterildi. Elde edilen ilk sonuçlar doğrultusunda opioid reseptör agonisti açlık AgRP nöron ateşleme frekansını inhibe ediyor olması, farelerde yem tüketimi ve tokluk sinyallerinde önemli derecede rol aldığı düşündürmektedir. Bu bağlamda AgRP nöronları opioid reseptör agonistine anlamlı derecede duyarlı olması, bu reseptörlerin bloklanması durumunda AgRP nöron ateşleme frekansının nasıl etkileneceği araştırıldı. Bu deney setinde tok AgRP-Cre fareler kullanıldı. Elektrofizyoloji banyosunda GABA ve Glutamat reseptör antagonisti varlığında AgRP nöronlarından cell-attach tekniği ile popülasyon kayıtları alındı. Yeterli kayıt sonrası banyoya Nalokson perfüze edilerek nöronlarda ateşleme frekansı ölçüldü. Alınan sonuçlar doğrultusunda tok farelerden alınan beyin kesitlerine opioid reseptör antagonisti (Nalokson) uygulandığında AgRP nöronlarında ateşleme frekansı anlamlı derece arttığı (Şekil 12'de) gösterilmektedir. (Kontrol: 0.57 ± 0.09 , n=31nöron, Nalokson: 2.33 ± 0.26 n=34 nöron/ 4 fare) Alınan frekans sonuçları T-test nonparametric Kolmogorov-Smirnov testi ile karşılaştırıldı (P <0,0001).

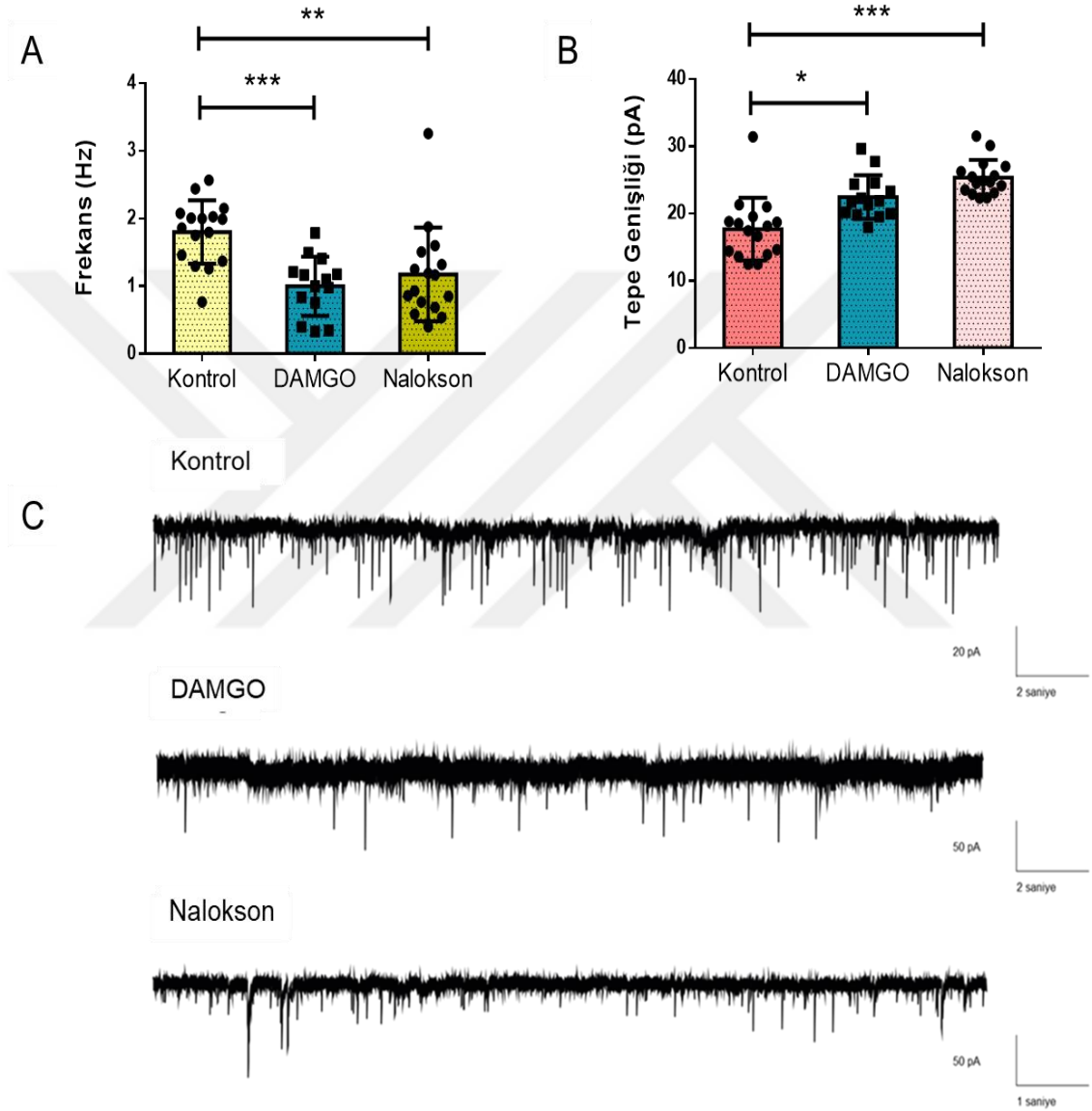


Şekil 12. Nalokson'un arkuat AgRP nöronlarının ateşleme frekanslarına etkisi A) Beyin kesitlerinden alınan elektrofizyoloji kayıt sonuçları (Kontrol: 0.57 ± 0.09 Hz $n=31$ nöron, Nalokson: 2.33 ± 0.26 Hz $n=34$ nöron/ 4 fare). Alınan frekans sonuçları T-test nonparametric Kolmogorov-Smirnov testi ile karşılaştırıldı ($P < 0.0001$). B) GFP enfekte olan AgRP nöronlarından alınan örnek elektrofizyoloji kayıtları.

4.3. DAMGO'nun AgRP nöronlarına gelen sinaptik akımlara etkisi (EPSC/IPSC)

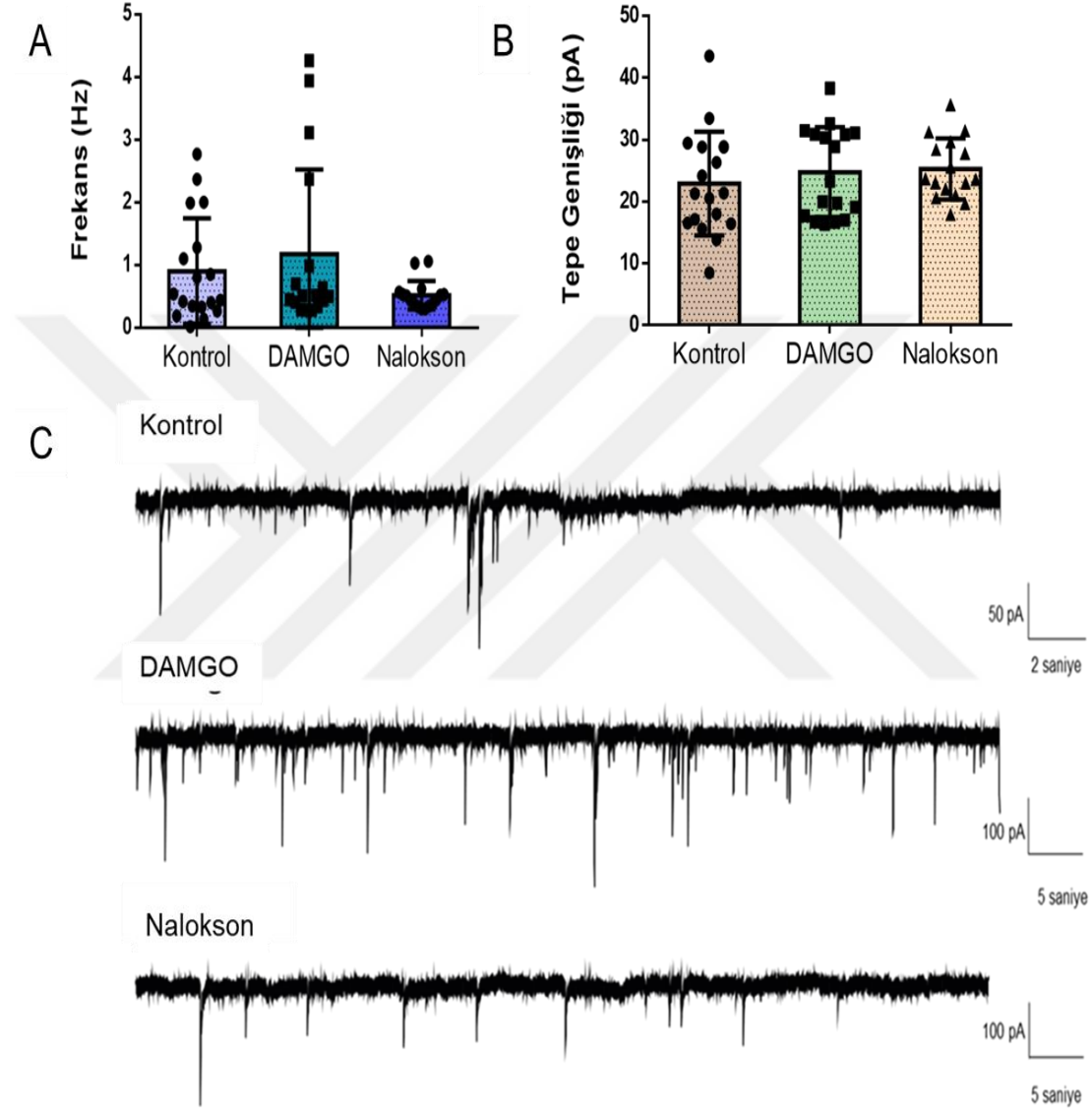
Cell-attach kayıt tekniği ile alınan AgRP nöron kayıtlarında, uygulanan opioid agonistinin AgRP nöronlarındaki elektriksel aktiviteye olan etkisi araştırıldı. Bu deney düzeneğinde ise opioid agonistinin AgRP nöronlarına olan etkisi değil de bu nöronlara gelen sinaptik akımlara olan etkisi araştırıldı. İlk olarak AgRP nöronlarına gelen spontan post sinaptik akım (sEPSC) kayıtları alındı. Elektrofizyolojik kayıtlar CsCl'i internal solüsyonu varlığında ve whole-cell tekniği kullanılarak alındı. Deney süresi boyunca elektrofizyoloji banyosuna GABAa ($50\mu\text{M}$) antagonisti Picrotoxin perfüze edildi. Alınan popülasyon kontrol verileri sonrası banyoya DAMGO eklenerek kayıtlara devam edildi. Sonuçlar analiz edildiğinde opioid agonisti AgRP nöronlarına gelen sEPSC akım frekanslarını anlamlı derecede inhibe ederken tepe genişliğini anlamlı derecede artırdığı (Şekil 13'te) gösterilmektedir (Kontrol: 1.80 ± 0.11 , $n=16$ nöron, DAMGO: 1.0 ± 0.11 $n=14$ nöron, Nalokson: 1.17 ± 0.17 $n=16$ nöron / 3 fare) (One-way ANOVA, $P < 0.05$, Dunn's multiple comparisons test). Aynı şekilde AgRP nöronlarından spontan inhibe edici post sinaptik akım (sIPSC) kayıtları alındı ve bu akımlara DAMGO'nun etkisi araştırıldı. IPSC akım kayıtları alma sırasında banyoda daima AMPA / kainate glutamat reseptör antagonisti ve NMDA reseptör antagonisti olan CNQX ($10\mu\text{M}$) ve AP5 ($50\mu\text{M}$)

perfüze edildi. Elde edilen sonuçlar analiz edildiğinde opioid agonistinin AgRP nöronlarına gelen sIPSC akım frekanslarına ve tepe genliğine etki etmediği (Şekil 14'te) gösterilmektedir (Kontrol: 0.90 ± 0.19 , n=18 nöron, DAMGO: 1.17 ± 0.32 n=17 nöron, Nalokson: 0.52 ± 0.05 n=16 nöron / 3 fare) (One-way ANOVA, P=0.7, Dunn's multiple comparisons test).



Şekil 13. DAMGO'nun arkuat AgRP nöronlarına gelen uyarıcı sinaptik akımlara etkisi
A) Whole-cell (tüm hücre kaydı) tekniği ile alınan sEPSC frekans grafiği (Kontrol: 1.80 ± 0.11 Hz, n=16 nöron, DAMGO: 1.0 ± 0.11 Hz n=14 nöron, Nalokson: 1.17 ± 0.17 Hz n=16 nöron / 3 fare) (One-way ANOVA, P<0.05, Dunn's multiple comparisons test).
B) sEPSC kayıtların tepe genişliği (peak amplitude) grafiği (Kontrol: 17.69 ± 1.16 pA, n=16 nöron, DAMGO: 22.46 ± 0.86 pA n=14 nöron, Nalokson: 25.36 ± 0.65 pA n=16

nöron / 3 fare). C) GFP enfekte olan AgRP nöronlarından alınan örnek whole-cell elektrofizyoloji kayıtlar.

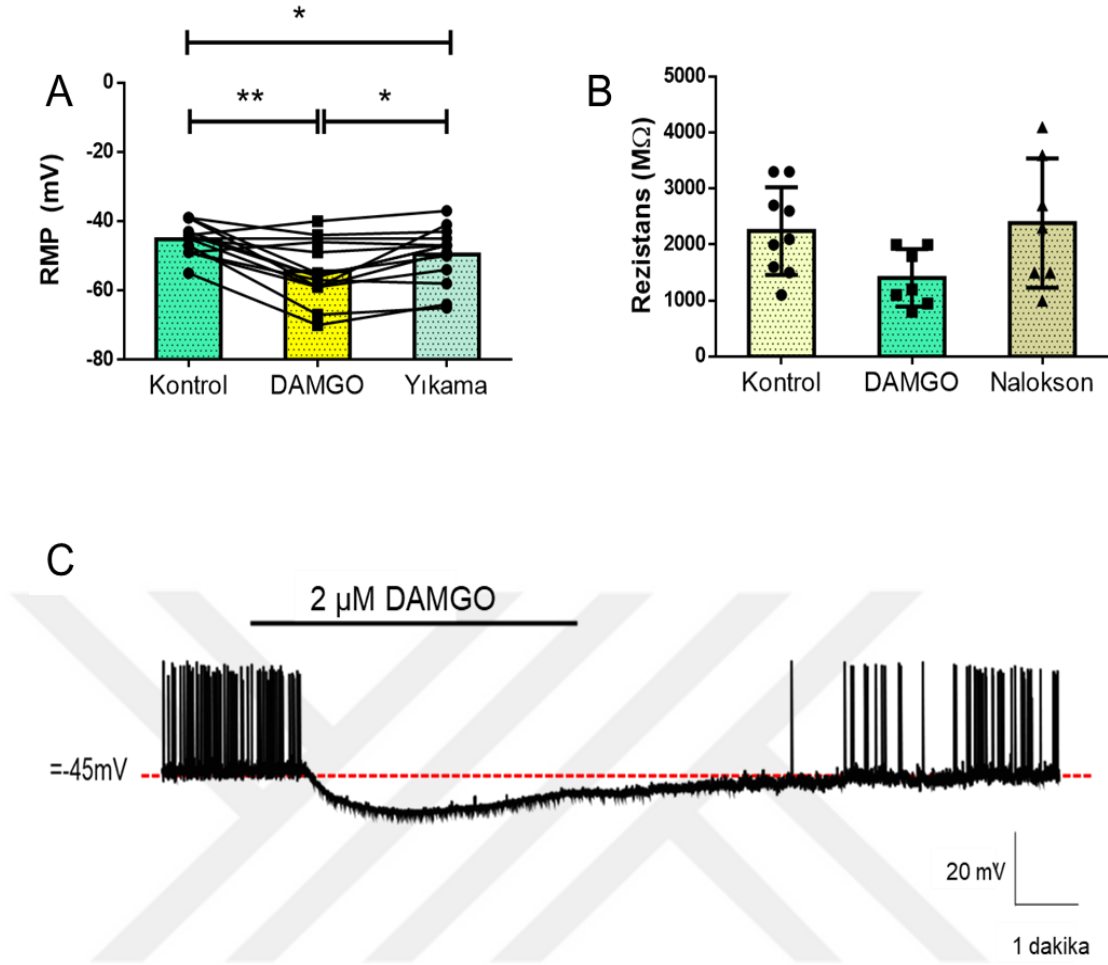


Şekil 14. DAMGO'nun arkuat AgRP nöronlarına gelen inhibe sinaptik akımlara etkisi A) Whole-cell (tüm hücre kaydı) tekniği ile alınan sIPSC frekans grafiği (Kontrol: 0.90 ± 0.19 Hz, $n=18$ nöron, DAMGO: 1.17 ± 0.32 Hz $n=17$ nöron, Nalokson: 0.52 ± 0.05 Hz $n=16$ nöron / 3 fare) (One-way ANOVA, $P=0.7$, Dunn's multiple comparisons test). B) sIPSC kayıtların tepe genişliği (peak amplitude) grafiği (Kontrol: 22.94 ± 1.97 pA, $n=18$ nöron, DAMGO: 24.77 ± 0.86 pA $n=17$ nöron, Nalokson: 25.29 ± 1.23 pA $n=16$

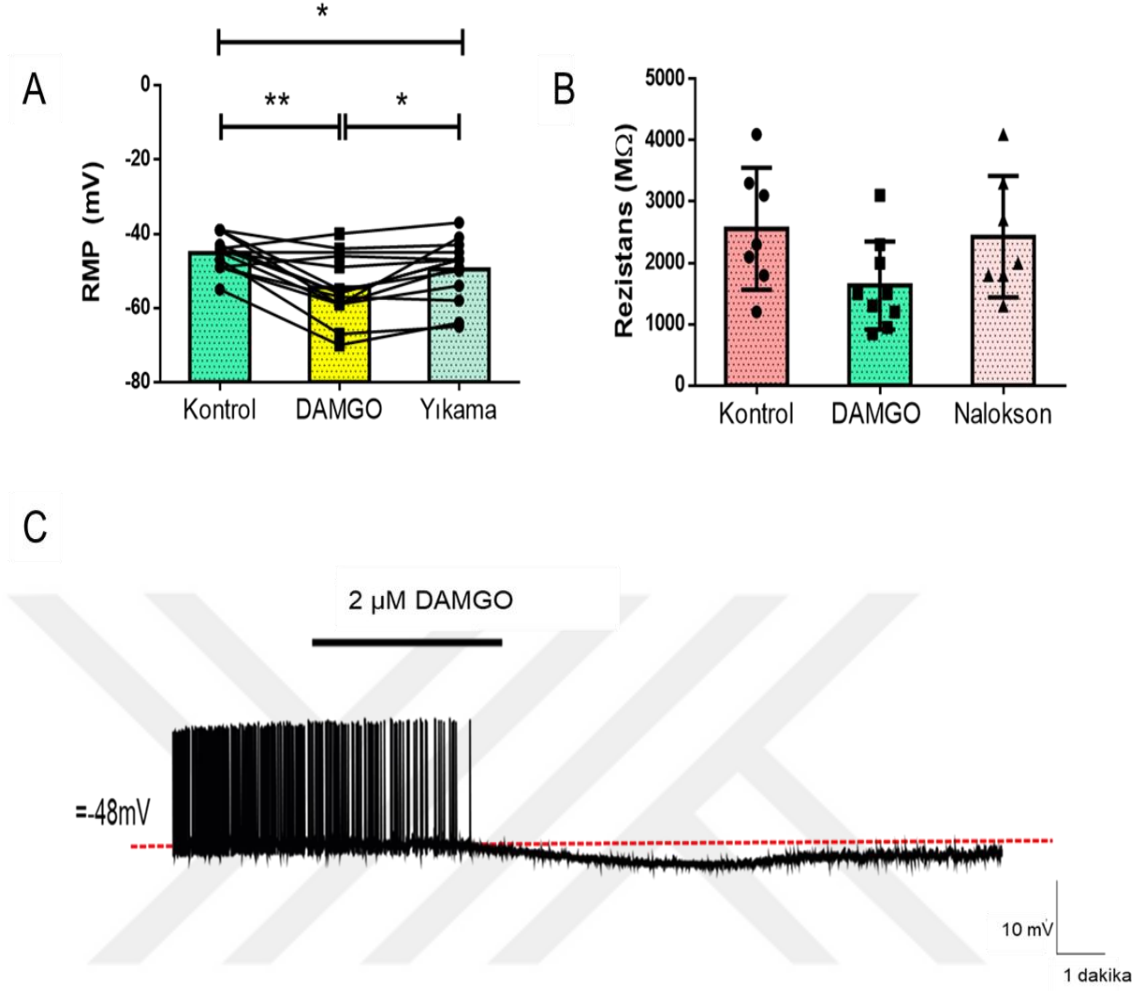
nöron / 3 fare). C) GFP enfekte olan AgRP nöronlarından alınan örnek whole-cell elektrofizyoloji kayıtlar.

4.4. DAMGO' nun AgRP nöron membran özelliklerine etkisi

Opioid agonistinin AgRP nöronlarına gelen sinaptik akımlara olan etkisini belirledikten sonra, bu nöronların membran özelliklerine etkisini araştırdı. Whole-cell current clamp (tüm hücre akım kenetleme) tekniği kullanılarak elektrofizyoloji kayıtları alındı. İlk etapta kayıt pipetinin içerisine GTP'li Potasyum D-glukonat internali varlığında kayıtlar alındı. Kayıt esnasından GABA ve Glutamat reseptör antagonistleri elektrofizyoloji banyosunda daima perfüze edildi. AgRP nöronlarına elektrofizyoloji cam pipetlerle $G\Omega$ düzeyinde bağlanılarak, hücrenin kırılması gerçekleştirildi. Emin olunduktan sonra hücreyi -60mV düzeyinde tutularak kayıt alındı. Kayıt başladıktan sonra yaklaşık 3-4 dakika sonra banyoya DAMGO perfüze edildi. Etki gözükmesinden sonra banyodan DAMGO'nun uzaklaştırılması sağlandı. Bu deney aşamaları sırasında her beyin kesitinden yalnızca bir nörona manipülasyon edildi. Alınan veriler, DAMGO, AgRP nöronlarında RMP'ni (dinlenim zar potansiyeli) anlamlı derece hiperpolarize duruma çekerken, hücre direncine bir trend olmakla birlikte anlamlı bir fark olmadığı (Şekil 15'te) gösterilmektedir. (Kontrol: -50.8 ± 1.97 mV $n=15$ nöron, DAMGO: -62.26 ± 2.55 mV $n=15$ nöron, Nalokson: -56.4 ± 2.44 mV $n=16$ nöron / 4 fare) (One-way ANOVA, $P<0,0001$, Tukey's multiple comparisons test). DAMGO'nun AgRP nöronlarını hiperpolarize ediyor olması G proteinler vasıtasıyla mı gerçekleşiyor sorusuna cevap vermek için bu set çalışmasına ek deneyler yapıldı. Kayıt pipetinin içerisine GDP β S (Guanosine 5'-[β -thio]diphosphate trilithium salt) eklenerek benzer kayıtlar alındı. Eklenen kimyasalın G protein aktivasyonu inhibe etmek için kullanıldı. G protein aktivasyonunu inhibe ediliyor olması, DAMGO'nun AgRP nöronlar üzerine etkisini değiştirmedir. Sonuçlar analiz edildiğinde DAMGO AgRP nöronlarını anlamlı derecede hiperpolarize etmekte ve hücre dirençlerinde anlamlı bir fark olmadığı (Şekil 16'da) gösterilmektedir. (Kontrol: -45.14 ± 1.20 mV $n=14$ nöron, DAMGO: -54.42 ± 2.32 mV $n=14$ nöron, Nalokson: -49.57 ± 2.17 mV $n=14$ nöron / 3 fare) (One-way ANOVA Tukey's multiple comparisons test, $P=0,0003$).



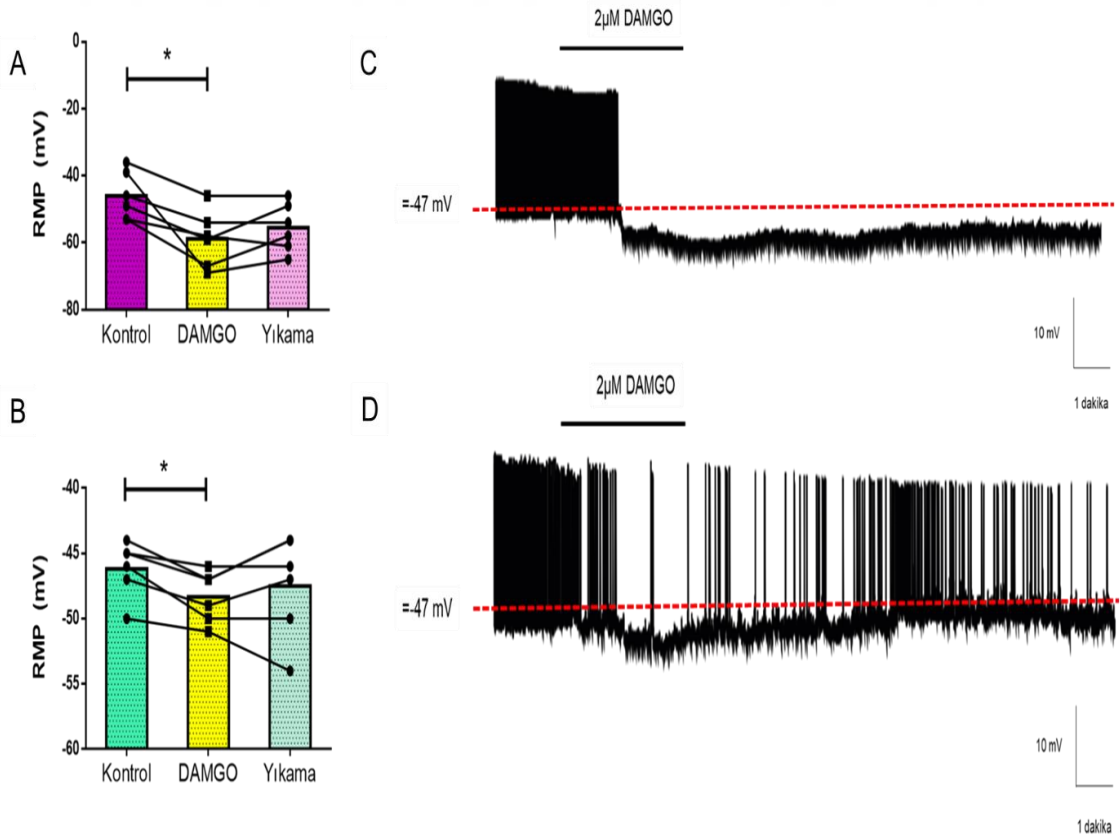
Şekil 15. GTP’li internal ile AgRP nöron membran özellikleri. A) DAMGO’nun AgRP nöron dinlenme zar potansiyeline etkisi grafiği (Kontrol: -50.8 ± 1.97 mV $n=15$ nöron, DAMGO: -62.26 ± 2.55 mV $n=15$ nöron, Nalokson: -56.4 ± 2.44 mV $n=16$ nöron / 4 fare) (One-way ANOVA, $P<0,0001$, Tukey's multiple comparisons test). B) AgRP nöron direnç grafiği (Kontrol: 2244.44 ± 261.46 MΩ $n=9$ nöron, DAMGO: 1407.14 ± 193.473 MΩ $n=7$ nöron, Nalokson: 2385.71 ± 436.67 MΩ $n=7$ nöron / 4 fare) (One-way ANOVA, $P=0,0868$, Tukey's multiple comparisons test). C) whole-cell current clamp elektrofizyoloji kaydı.



Şekil 16. GDPβS'li AgRP nöron membran özellikleri. A) DAMGO'nun AgRP nöron dinlenme zar potansiyeline etkisi grafiği (Kontrol: -45.14 ± 1.20 mV $n=14$ nöron, DAMGO: -54.42 ± 2.32 mV $n=14$ nöron, Nalokson: -49.57 ± 2.17 mV $n=14$ nöron / 3 fare) (One-way ANOVA, $P=0.0003$, Tukey's multiple comparisons test). B) AgRP nöron direnç grafiği (Kontrol: 2557.14 ± 375.34 MΩ $n=7$ nöron, DAMGO: 1633.33 ± 239.93 MΩ $n=9$ nöron, Nalokson: 2428.57 ± 378.97 MΩ $n=7$ nöron / 3 fare) (One-way ANOVA, $P=0.1011$ Tukey's multiple comparisons test). C) whole-cell current clamp elektrofizyoloji kaydı.

4.5. DAMGO' nun GTP ve GDPβS'li internal ve banyoda CMPD101 varlığında AgRP membran özelliklerine etkisi

Alınan sonuçları daha detaylandırmak için elektrofizyoloji banyosuna CMPD101 (G proteinine bağlı reseptör kinaz GRK2 ve GRK3 inhibitörü) eklenerek yeni set whole-cell current clamp kayıtlar alındı. Yapılan bu deneyin amacı, DAMGO, AgRP nöronlarını hangi yolak üzerinden inhibe ediyor, sorusuna cevap aramaktır. Yapılan ilk deneyde kayıt pipetinin içerisinde GTP'li solüsyon varlığında kayıtlar alındı. Deney süresince elektrofizyoloji banyosunda CMPD101 kimyasalı perfüze edildi. İlk deney seti sonuçları analiz edildiğinde DAMGO, AgRP nöronlarını anlamlı derecede inhibe ettiği Şekil 4.7 gösterilmektedir (Kontrol: -46 ± 9.92 mV n=6 nöron, DAMGO: -58.83 ± 3.45 mV n=6 nöron, Nalokson: -55.5 ± 2.95 mV n=6 nöron / 2 fare) (One-way ANOVA, $P < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test). Aynı şekilde kayıt pipetinin içerisine GDPβS eklenerek benzer deneyler yapıldı. Alınan sonuçlar benzer şekilde anlamlı derece DAMGO, AgRP nöronlarını inhibe ettiği (Şekil 17'de) gösterilmektedir. (Kontrol: -46.16 ± 0.87 mV n=6 nöron, DAMGO: -48.33 ± 0.80 mV n=6 nöron, Nalokson: -47.5 ± 1.58 mV n= 6 nöron / 2 fare) (One-way ANOVA, $P < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test).



Şekil 17. CMPD101’li varlığında AgRP nöron membran özellikleri A) GTP’li internal ve DAMGO’nun AgRP nöron dinlenim zar potansiyeline etkisi grafiği (Kontrol: -46 ± 9.92 mV n=6 nöron, DAMGO: -58.83 ± 3.45 mV n=6 nöron, Nalokson: -55.5 ± 2.95 mV n=6 nöron / 2 fare) (One-way ANOVA, $P < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test). B) GßDP’li internal ve DAMGO’nun AgRP nöron dinlenim zar potansiyeline etkisi grafiği (Kontrol: -46.16 ± 0.87 mV n=6 nöron, DAMGO: -48.33 ± 0.80 mV n=6 nöron, Nalokson: -47.5 ± 1.58 mV n=6 nöron / 2 fare) (One-way ANOVA, $P < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test) C-D) whole-cell current clamp elektrofizyoloji kayıtları.

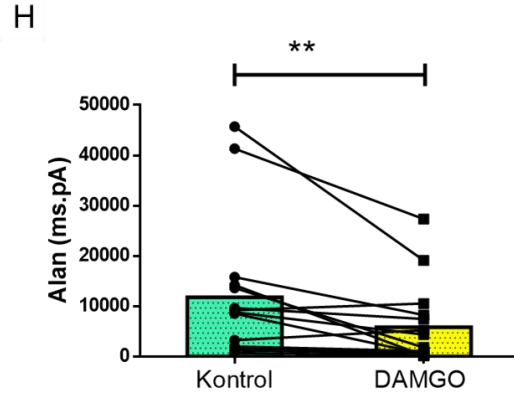
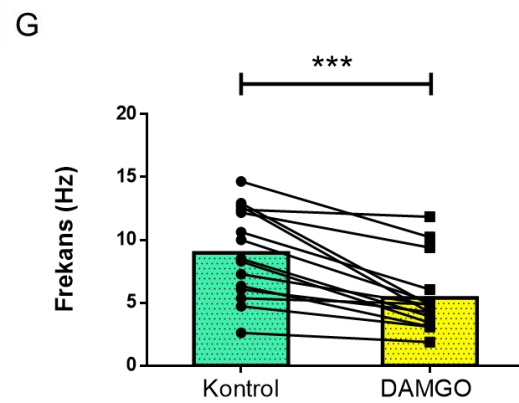
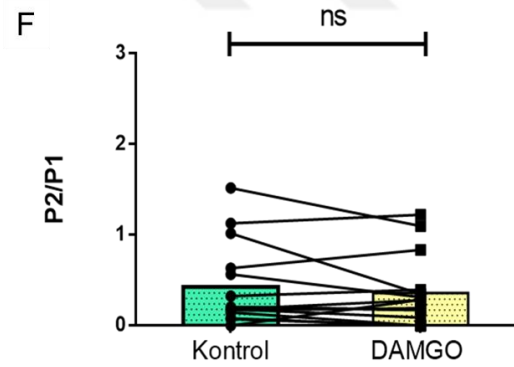
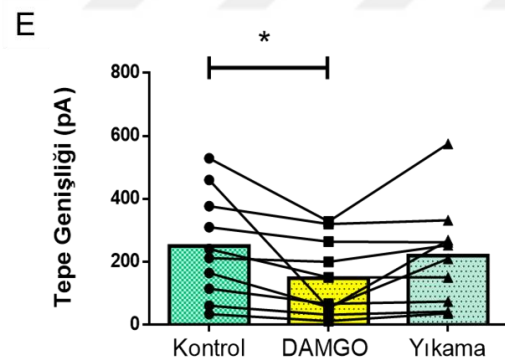
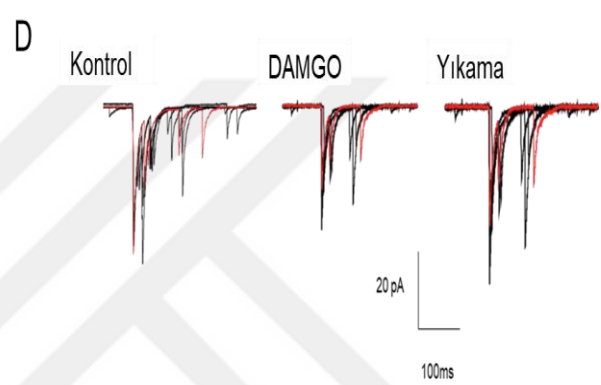
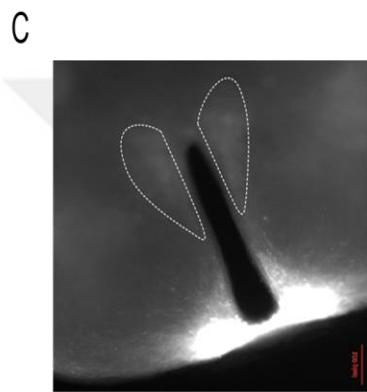
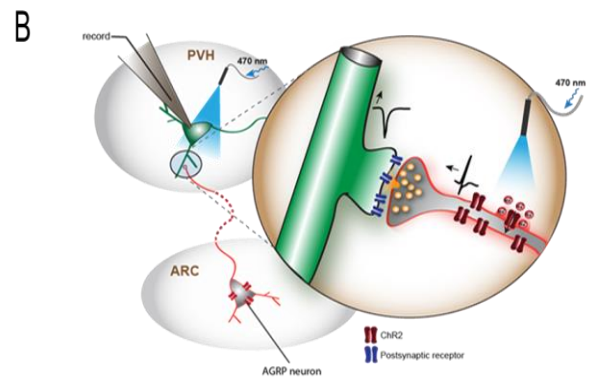
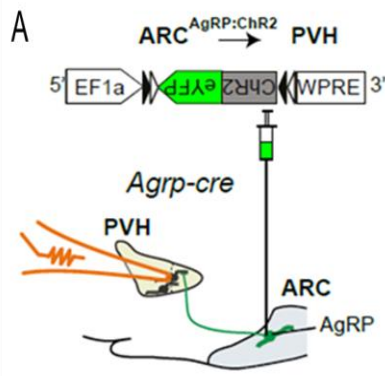
4.6. DAMGO’ nun $\text{Arc}^{\text{AgRP} \rightarrow \text{PVH}}$ projeksiyonuna etkisi

Hipotalamik ARC’de lokalize olan AGRP nöronları, iştah, metabolizma ve enerji düzenlenmesinde merkezi bir role sahiptir. Bu nöron grubuna uygulanan manipülasyonlar sonrası beslenme davranışını akut olarak düzenlemek için gerekli olduğu gösterilmiştir. AGRP nöronları paraventriküler çekirdeğe (PVH) yoğun aksonal projeksiyonlar gönderir ve sinaptik bağlantılar kurar. $\text{Arc}^{\text{AgRP} \rightarrow \text{PVH}}$ sinaptik bağlantısı enerji, metabolizma ve daha da önemlisi beslenmenin düzenlenmesinde önemli rol oynadığından, bu bağlantıya etki edecek ilaçların da iştah düzenlemesi için de önemli olması muhtemeldir. Bu deney setinde opioid reseptör agonistinin AgRP nöronların PVH bölgesine yollamış olduğu sinaptik bağlantıları üzerine farmakolojik etkileri araştırıldı. Öncelikle AgRP-Cre farelere Chr2 virüs enjeksiyon yapıldı. Enfekte süresi (2 hafta) beklendikten sonra fareler uygun şartlarda dekapite edildiler. Beyin kesitlerinde PVH bölgesini içeren kısımları elektrofizyoloji banyosuna aktarıldı. PVH nöronlarından rastgele whole-cell voltage clamp (tüm hücre voltaj kenetleme) kayıtları alındı. Kayıt alma sırasında banyoda daima Glutamat inhibe edici kimyasallar perfüze edildi. Hücrelere kayıt almaya başladıktan sonra sinaptik bağlantı olup-olmadığını kontrol için beyin kesitinin üzerine 470nm dalga boylu mavi lazerle 2 pulse (vuruş) 5 ms dalga genişliğinde uyarım yapıldı. Bağlantı bulunan nöronlardan 5 dakika kontrol kaydı alındı ve banyoya DAMGO perfüze edildi. Perfüze edildikten sonra en az 10 dakika beklenildikten sonra tekrar aynı hücreden kayıtlar alındı.

Alınan veriler analiz edildiğinde arkuat AgRP nöronları uyarıldıklarında PVH bölgesinden alınan peak amplitude (tepe genliği) değerleri, DAMGO uygulandıktan sonra anlamlı derecede azaldığı (Şekil 18’de) gösterilmektedir (Kontrol: 250.4 ± 52.81 pA, DAMGO: 148.3 ± 38.6 pA, Nalokson: 220.5 ± 51.11 pA n=10 nöron / 4fare) (One-way

ANOVA, $P < 0,05$, Tukey's multiple comparisons test). Aynı zamanda AgRP nöronlarından gelen sinaptik inputların salıverme olasılığı (release probability) özelliklerini inceledik. Presinaptik hücreden nörotransmitter salınım olasılığı (PPR) olarak ifade edilir. Farklı iki uyarı sonucu oluşan postsinaptik akımlardan ikincinin birinciye oranı olarak hesaplanır. Uyarılan presinaptik hücre nörotransmitter salınım özelliği yüksekse, uygulanılacak ilk uyarım ile birlikte yüksek oranda nörotransmitter salınır. Bunun sonucu olarak da küçük PPR oranı ortaya çıkar. Düşük nörotransmitter salınım özelliğine sahip presinaptik hücrede ise PPR oranı daha yüksek olur. Yapılan sinaptik bağlantı deneylerinden elde edilen veriler PPR için tekrar analiz edildi. Sinaptik inputların nörotransmitter salınım özelliği olan PPR sonucu her iki grup arasında anlamlı bir fark olmamakla birlikte benzer sonuçlar Şekil 4.9'da gösterilmektedir (Kontrol: 0.42 ± 0.11 , DAMGO: 0.36 ± 0.09 , $n=15$ nöron / 4fare) (T-test nonparametric Wilcoxon matched-pairs signed rank $P=0.45$) test ile karşılaştırıldı.

Arkuat AgRP nöronlarının presinaptik olarak uyarılması sonucu nörotransmitter salınımını PVH nöronlarından alınan elektrofizyolojik kayıtlarla incelendi. Ayrıca DAMGO'nun, postsinaptik nöronlarda lazer ile uyarım sonrası oluşabilecek depresyon veya nörotransmitter duyarsızlaşma olayları üzerine etkisini araştırıldı. Postsinaptik nöronlardan alınan elektrofizyoloji kayıt, lazer uyarımın (2 pulse-5 ms) hemen sonrasındaki 200ms lik kısmının, frekans ve tepe genlik datasının altında kalan alan analiz edildi. Elde edilen sonuçlara bakıldığında DAMGO, postsinaptik nöronlarda uyarım sonrası oluşan frekans ve tepe genlik alan grafiğinde anlamlı derecede kontrol grubuna göre azalttığı şekil 4.10'da gösterildi. Alınan frekans sonuçları (Kontrol: 8.97 ± 0.92 Hz $n=15$ nöron, DAMGO: 5.37 ± 0.92 Hz $n=15$ nöron / 4 fare) ve tepe genlik alan sonuçları (Kontrol: 11827.30 ± 3580.14 ms.pA $n=15$ nöron, DAMGO: 5857.75 ± 2053.75 ms.pA $n=15$ nöron / 4 fare) (T-test nonparametric Wilcoxon matched-pairs signed rank $P < 0.0001$, $P=0,0054$).

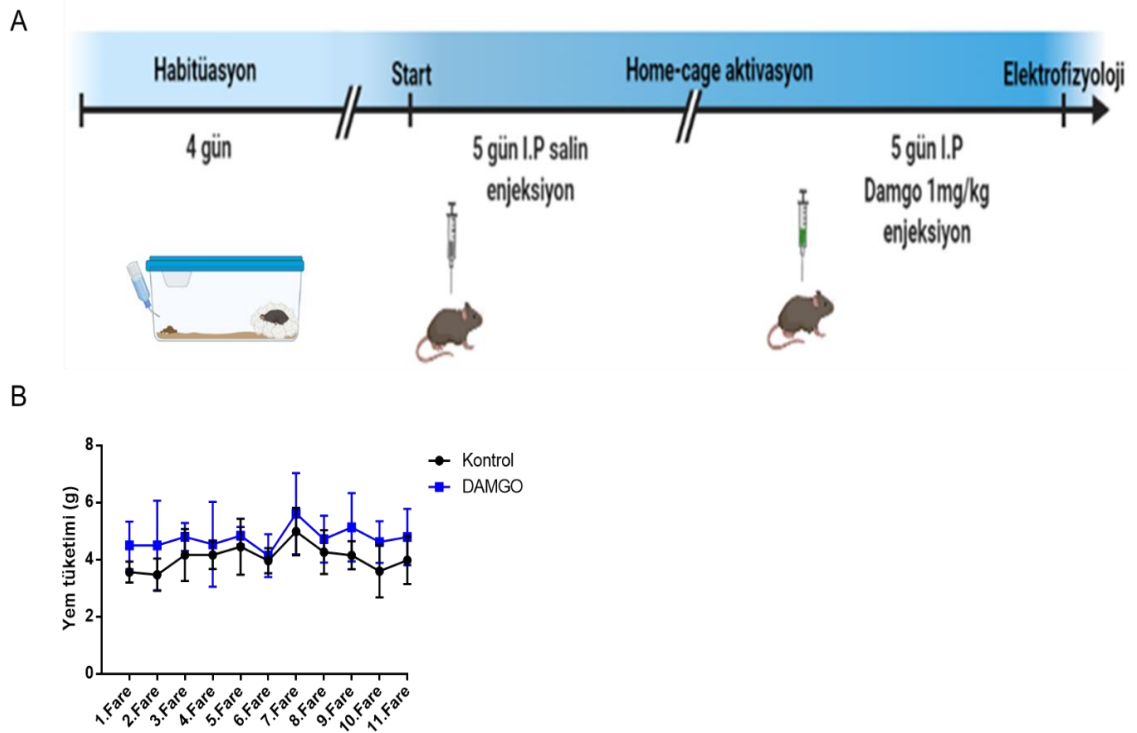


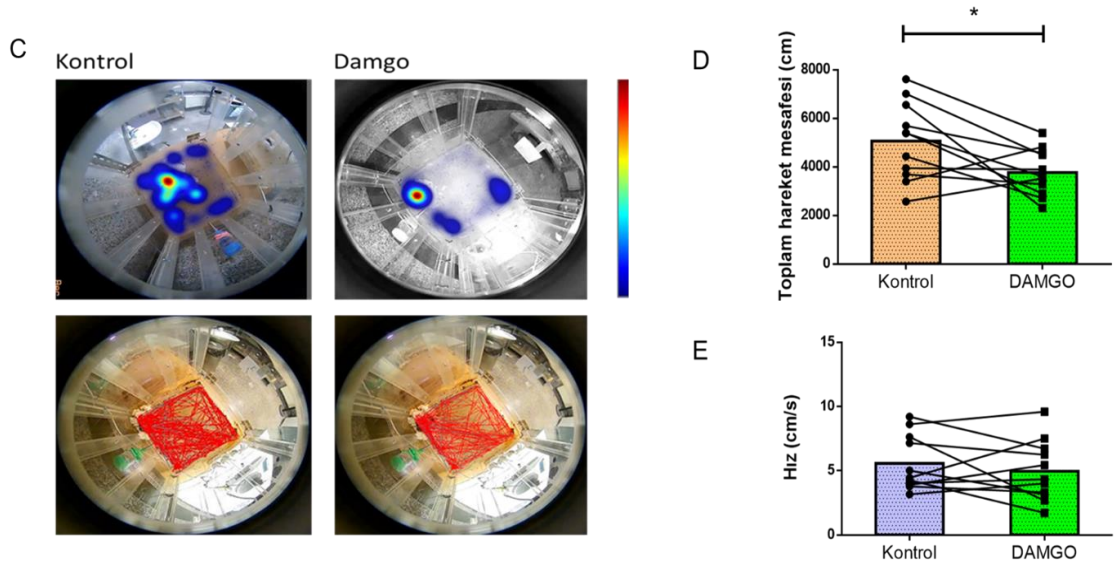
Şekil 18. Arc^{AgRP→PVH} sinaptik bağlantı özellikleri A) Hipotalamus arkuat bölgesine Chr2 enjeksiyon görseli. B) PVH bölgesinden nöronlardan kayıt alma sırasında AgRP nöron aksonlarının optogenetik uyarımı. C) Chr2 enjeksiyonu yapılan AgRP-Cre fare beyin kesitinden konfokal gösterimi. D) Arc^{AgRP→PVH} projeksiyonundan alınan tepe genlik kaydı. Arc^{AgRP→PVH} sinaptik bağlantıları üzerine DAMGO'nun etkisi. E) DAMGO'nun AgRP nöron aksonlarının uyarımı sonrası PVH nöronlarında oluşturduğu tepe genlik grafiği (Kontrol: 250.4±52.81 pA, DAMGO: 148.3±38.6 pA, Nalokson: 220.5±51.11 pA n=10 nöron / 4 fare) (One-way ANOVA, P<0,05, Tukey's multiple comparisons test). F) AgRP nöronlarından gelen sinaptik inputların release probability grafiği (Kontrol: 0.42±0.11, DAMGO: 0.36±0.09, n=15 nöron / 4 fare) (T-test nonparametric Wilcoxon matched-pairs signed rank P=0.45). G-H) Postsinaptik nöronlarda AgRP nöron aksonlarının uyarımı sonrası oluşan frekans ve tepe genlik alan grafiği (Kontrol: 8.97±0.92 Hz n=15 nöron, DAMGO: 5.37±0.92 Hz n=15 nöron / 4 fare), (Kontrol: 11827.30±3580.14ms.pA n=15 nöron, DAMGO: 5857.75 ±2053.75 ms.pA n=15 nöron / 4 fare) (T-test nonparametric Wilcoxon matched-pairs signed rank P<0.0001, P=0,0054).

4.7. Yeme davranışı ve home cage aktivite sonuçları

Besin alımının merkezi düzenlenmesi, enerji homeostazına katkıda bulunan çok önemli bir mekanizmadır. Beslenme davranışını düzenlediği düşünülen birçok nöral devre hem anatomik hem de işlevsel olarak beyin ödül devresi ile örtüşür. Çok sayıda sinir ağının manipülasyonu, aynı anda gıda alımını ve ödül merkezini etkileyebilir. Bu süreçlerin altında yatan iki anahtar sistem homeostatik ve hedonik beslenmeyi kontrol edenler, genellikle bağımsız olarak kabul edilir. Hedonik beslenme duyusal algı veya zevk tarafından uyarılırken, homeostatik beslenme ise temel metabolik süreçler ve hayatta kalmak için gereklidir. Hipotalamik ARC'de lokalize olan AgRP nöron popülasyonu homeostatik beslenmede önemli rol oynamaktadır. Opioidler ise hedonik beslenmede önemli derece katkı sağlamaktadır. Yapılan çalışmalarla bu etki birçok kez gösterildi. Burada, mevcut veriler göz önüne alındığında, homeostatik beslenmeyi ve hedonik beslenmeyi kontrol eden sinir devrelerinin tamamen birbirinden ayrı şekilde hareket edip etmediği araştırıldı. Öncelikle GFP enjeksiyonu yapılan farelerin enfekte süresi beklenildi. Daha sonra fareler kafeslere yerleştirildi ve alışmaları için 4 gün beklendi. Aynı zamanda kafeslere kamera sistemleri kurularak farelerden 24 saat aktivite kaydı alınması sağlandı. Alışma sürelerinden sonra 5 gün boyunca 200µl fizyolojik salin

(i.p) enjeksiyon yapıldı ve her gün farelerin tükettikleri yem miktarı tartıldı. Altıncı gün farelere 1mg/kg DAMGO i.p uygulanmaya başlandı. DAMGO uygulanması 5 gün boyunca devam etti. Kamera kayıtları saline ve DAMGO uygulama günlerinin ortalaması şeklinde analiz edildi. Alınan sonuçlar analiz edildiğinde, opioid uygulanması sonrası farelerin yem tüketim miktarı anlamlı olmamakla birlikte artış trendi izlemekte (Şekil 19'da) gösterilmektedir. (Kontrol: 4.06 ± 0.13 gr, DAMGO: 4.74 ± 0.11 gr / 11 fare) (Two-way ANOVA, $P > 0.05$, Sidak's multiple comparisons test). Kamera kayıtları analiz edildiğinde ise DAMGO uygulanan süreç zarfında, salin uygulanan sürece göre farelerde toplam hareket mesafesi anlamlı derece azalırken, hızlarında anlamlı bir fark oluşmadı. Bu veriler Şekil 5.1'de gösterilmektedir (Kontrol: 3770.47 ± 290.17 cm, DAMGO: 5061.84 ± 482.12 cm / 11 fare) (T-test, $P < 0.05$). Farelerin hız değerleri (Kontrol: 4.97 ± 0.71 cm/s, DAMGO: 5.56 ± 0.65 cm / 11 fare) (T-test, $P > 0.05$).





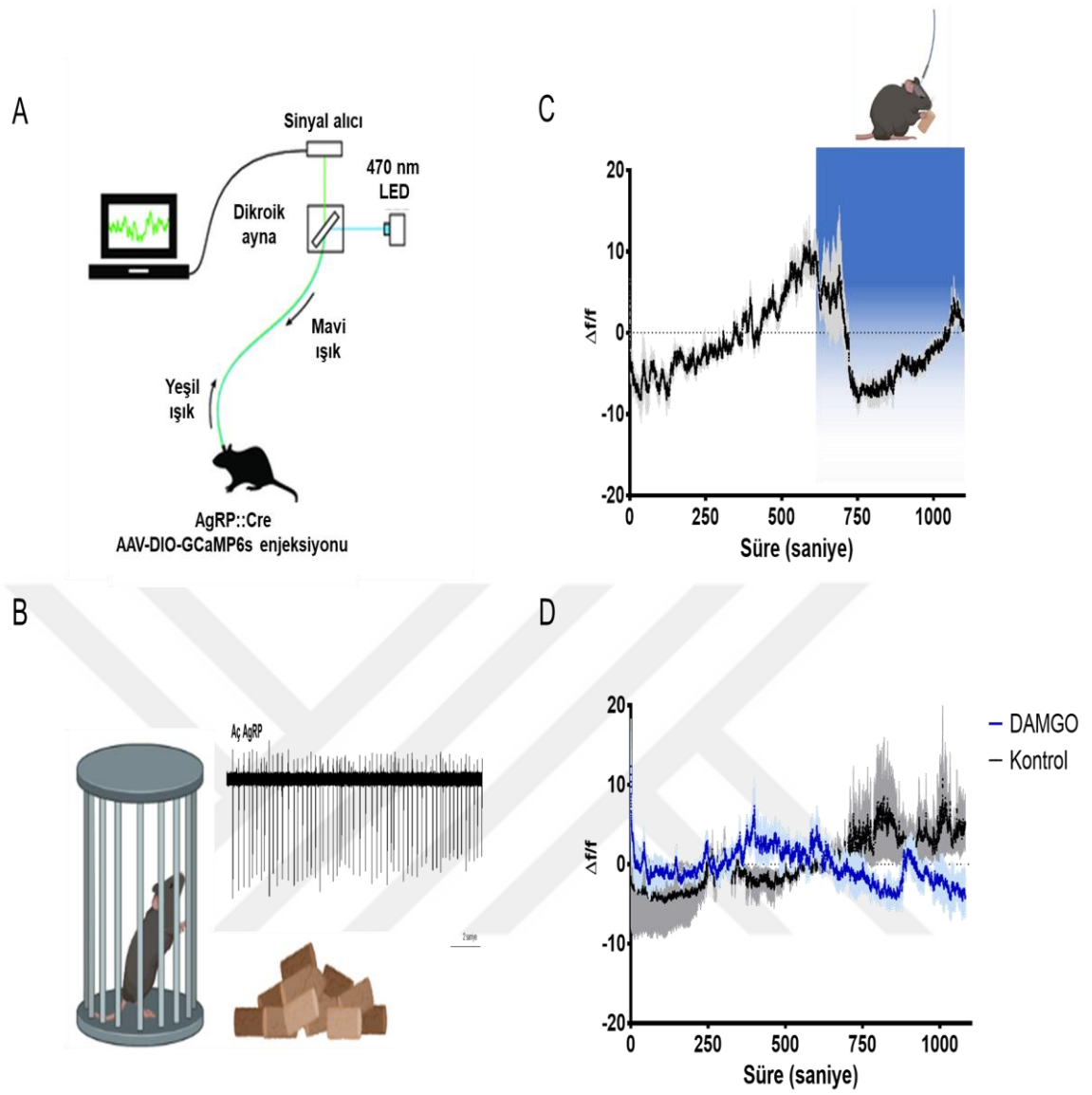
Şekil 19. AgRP-Cre farelerde DAMGO'nun yeme davranışına ve lokomotor aktivite özelliklerine etkisi. A) AgRP farelere uygulanan deney protokol şeması. B) Fizyolojik salin ve DAMGO uygulanması sonrası farelerin yem tüketim grafiği (Kontrol: 4.06 ± 0.13 gr, DAMGO: 4.74 ± 0.11 gr / 11 fare) (Two-way ANOVA, $P > 0.05$, Sidak's multiple comparisons test). C) Metabolik kafeslere yerleştirilen kameralardan alınan ortalama günlük aktivite kaydı. D-E) Farele uygulanan DAMGO sonrası toplam hareket mesafesi (Kontrol: 3770.47 ± 290.17 cm, DAMGO: 5061.84 ± 482.12 cm / 11 fare) (T-test, $P < 0.05$) ve hız değerleri (Kontrol: 4.97 ± 0.71 cm/s, DAMGO: 5.56 ± 0.65 cm / 11 fare) (T-test, $P > 0.05$).

4.8. In vivo AgRP nöron kayıtları ve DAMGO' nun etkisi

Son yıllarda geliştirilen sistemlere bakıldığında transgenik hayvan modellemeleri, optogenetik, kemogenetik gibi teknikler nöronal devreleri anlamada ve işlevini çözmede büyük kolaylık sağlamaktadır. Bu teknikler kullanılarak istenen spesifik nöron grubunu işaretleyip ve bu nöronlar üzerinde manipülasyonlar yaparak (uyarılma veya inhibe etme) hayvanlarda fizyolojik veya davranışa etkileri araştırılmaktadır.

Homeostatik beslenmede önemli rolü olan arkuat AgRP nöronlarının üzerinde yapılan çalışmalarda, bu nöronların dışarıdan optogenetik veya kemogenetik tekniği kullanılarak uyarılması veya inhibe edilmesi sonucu farelerin istem dışı yem tüketim miktarının düzenlenmesin mümkün olduğu gösterilmiştir. Bu teknolojilere ek olarak son zamanlarda sıklıkla kullanılan başka bir teknik olan Ca^{+2} görüntüleme veya Ca^{+2} sinyal okuma methodu olan fiber fotometre sistemleri, Cre teknoloji ile birlikte artık istenilen

nöron grubunun 24 saatlik spontan ateşlemesi takip etmede veya farelerde test edilecek endokrin ilaçların, işaretlenmiş nöronlarda oluşturmuş olduğu elektriksel değişiklik ve davranışa olan çıktısı anlık takip etme fırsatı sunmaktadır. Biz de bu deney setinde DAMGO'nun AgRP nöron elektriksel özelliklerine olan etkisini *in vivo* şeklinde fiber fotometre kullanarak gerçekleştirdik. Öncelikle AgRP-Cre farelere AVV.Syn.Flex.GCAMP6s.WPRE.SV40 virüs enjeksiyonu yapıldı. Aynı zamanda virüs enjeksiyonun ardında 200µm çapında fiber kablo beyin içi hipotalamus bölgesine yerleştirildi. Virüs enfekte süresi beklenildikten sonra Ca^{+2} sinyal kaydı alınmaya başlandı. Aç bırakılan farelerde AgRP nöron ateşleme frekansının yüksek olduğu bilinmektedir. Deneylere başlamadan önce sistemi optimize etmek için fareler 16 saat aç bırakıldı. Kayıt alınmaya başladıktan sonra 10 dakika sonra farelere yem verildi. Sonuçlar analiz edildiğinde açlıkla artan AgRP aktivitesi, farelerin yeme ulaşmasıyla birlikte anlamlı derecede azaldığı (Şekil 20'de) gösterilmektedir. Daha sonra alınan *ex vivo* kayıtlarda DAMGO AgRP nöronlarını inhibe ediyor olmasından *in vivo* deney seti datasını kıyaslamak için fareler aç bırakılarak, farelerden öncelikle 20 dakika kontrol kaydı alındı sonrasında 1mg/kg i.p DAMGO enjekte edilerek tekrar 20 dakika kayıt alındı. Alınan sonuçlar analiz edildiğinde AgRP nöronlarının Ca^{+2} aktivitesinin anlamlı derecede azaldığı Şekil 20'de gösterilmektedir ($P<0,05$).



Şekil 20. AgRP-Cre farelerden Ca^{+2} görüntüleme ve DAMGO'nun etkisinin araştırılması. A) Fiber fotometre Ca^{+2} görüntüleme sistem çalışma şeması. B) Aç bırakılan AgRP -Cre farelerden alınan fiber fotometre datası. C) Aç bırakıldığında AgRP nöronlarının ateşleme frekansını gösteren data. D) Aç farelere DAMGO uygulanması ve AgRP nronalarından alınan Ca^{+2} sinyal grafiği.

5. TARTIŞMA

Opioid reseptörleri, homeostatik ve hedeonik gıda alımını uyaran sinir ağlarının üzerlerinde lokalize olmuşlardır. Ancak opioidler, hedonik beslenmede yağ ve şeker bakımından zengin olan gıdaların alımının modülasyonunda daha etkili olduğu bilinmektedir. Opioid antagonistlerin ise iştahı baskıladığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu sebeple, lezzetli gıdalar için oluşan istek, arzu ve kendini kontrol edememe durumu opioidle ilişkili bir bağımlılık türü olarak düşünülebilir.

Endojen opioid peptidler, endorfinler, enkefalinler, dinorfinler ve endomorfine içerir ve üç tip reseptör aracılığıyla etki ederler: bunlar G proteinine bağlı reseptör süper ailesine ait olan μ -, δ - ve κ -opioid reseptörleridir (MOR, DOR ve KOR) (1,2). Bu öncü proteinler endorfinlere, enkefalinlere veya dinorfinlere bölünerek endojen opioidlerin faaliyetine aracılık etmek için nörotransmisyon sırasında salınırlar. β -endorfin, MSS'nin farklı bölgelerinde özellikle beyin sapında ve hipotalamik ARC nöronları tarafından üretilir ve MOR reseptör aracılığıyla iştah ve cinsel davranış mekanizması üzerine etkiler gösterir (3).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda ayrıca enerji harcaması ve besin alımının kontrolünde endojen MOR ve KOR'un önemli bir rol oynadığı öne sürülmektedir (4). Çok sayıda çalışmada, genel opioid reseptör antagonistlerinin hem sistemik hem de beyin içi uygulamasının kemirgenlerde gıda alımını ve vücut ağırlığını azalttığı gösterilmiştir. Opioidlerin gıda alımını azalttığına moleküler mekanizması tam olarak anlaşılmassa da, merkezi opioid ve melanokortin sistemlerinin etkileştiği bilinmektedir.

Bu bağlamda, proje önerimizde de belirttiğimiz gibi, μ opioid reseptör agonisti ve antagonistinin homeostatik beslenmede önemli değere sahip ARC'de lokalize olan ve aynı zamanda enerji tüketiminde de görev alan AgRP nöronlarındaki fonksiyonel değişiklikleri kapsamlı ve sistemik olarak karakterize ettik. Bunlar sırasıyla, AgRP nöronlarında oluşan a) ateşleme frekanslarına olan etkisi b) presinaptik input anomalitelerinin spontan (IPSC ve EPSC) akımların ölçülmesi c) otonom ateşleme ve dinlenme potansiyeli gibi özelliklerinin karakterizasyonu d) AgRP nöronlarının sinaptik çıktılarının üzerine etkisi e) μ opioid reseptör agonistinin i.p. şeklinde uygulanmasından sonra farelerde oluşan davranışsal sonuçları karakterize ettik.

Açlık durumunda AgRP nöron ateşleme frekansının arttığı gösterilmiştir [121]. Bu bilgiler doğrultusunda yapılan ilk deney setinde AgRP-Cre fareleri 16 saat aç

birakıldıktan sonra elektrofizyolojik kayıtlar alındı. Alınan sonuçlar analiz edildiğinde DAMGO'nun (μ opioid agonisti) AgRP nöronlarında artan ateşleme frekansını anlamlı derecede inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Tok farelerden alın AgRP elektrofizyoloji kayıtlarında ise Nalokson (μ opioid antagonisti) uygulanması sonrası AgRP nöron ateşleme frekansının anlamlı derece arttığı gözlenmiştir. Aynı zamanda DAMGO'nun AgRP nöronlarına gelen sEPSC (spontan uyarıcı post sinaptik akım) sinaptik inputlarını anlamlı derecede azaltırken, bu hücrelere gelen sIPSC (spontan inhibe edici post sinaptik akım) sinaptik inputlarına etki etmediği gözlemlenmiştir. Bu gözlem son derece önem arz etmektedir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda opioid agonisti ve antagonistinin homeostatik beslenmede rolü olan AgRP nöronları üzerine etkisi ilk kez bu çalışmada araştırıldı.

Dahası opioid agonistinin AgRP nöronlarına gelen sinaptik akımlara olan etkisini belirledikten sonra, bu nöronların hücre otonom özelliklerini inceledik. Amacımız AgRP nöronlarının temel elektrofizyolojik özelliklerinin opioid reseptör agonistinin uygulanmasıyla birlikte değişip değişmediğini belirlenmesiydi. Bu amaçla “whole-cell current clamp” (tüm hücre akım kenetleme) tekniği kullanılarak elektrofizyolojik kayıtları alındı. İlk etapta kayıt pipetinin içerisine GTP'li Potasyum D-glukonat internali varlığında kayıtlar alındı. Alınan *in vitro* elektrofizyolojik kayıt sonuçlarına göre; DAMGO, AgRP nöronlarında RMP'ni (dinlenme zar potansiyelini) anlamlı derecede hiperpolarize duruma çekerken, hücre direncinde anlamlı olmamakla birlikte azalmaya yönelik bir trendin olduğunu gözlemledik.

DAMGO'nun, AgRP nöronlarını hiperpolarize ediyor olması G proteinler vasıtaıyla mı gerçekleştiriyor yoksa başka bir yolak üzerinden de etki ediyor sorusuna cevap bulmak için ek deneyler yaptık. Bu sefer kayıt pipetinin içerisine G protein aktivasyonu inhibe etmek için G β DP eklenerek kayıtlar alındı. G protein aktivasyonunun inhibe ediliyor olması, DAMGO'nun AgRP nöronlar üzerine etkisini değiştirmedir. Sonuçlar analiz edildiğinde DAMGO, AgRP nöronlarını anlamlı derecede hiperpolarize ettiği ve hücre dirençlerinde değişiklik yapmadığı gözlenmiştir.

μ opioid reseptör agonistinin AgRP nöronlarını G protein kaplı reseptörler üzerinden yapıp yapmadığını daha detaylı araştırmak için ek çalışmalar yapıldı. Yeni set çalışmasında kayıt pipetinin içerisinde G β DP'li internal sölüsyon ve elektrofizyoloji banyosuna CMPD101 (G proteinine bağlı reseptör kinaz GRK2 ve GRK3 inhibitörü)

eklenerek yeni set “whole-cell current clamp” kayıtları alındı. Sonuçlara bakıldığında DAMGO, AgRP nöronlarını benzer şekilde anlamlı derecede hiperpolarize ettiği gözlemlenmiştir. Bu bulgular, μ opioid reseptör agonistinin AgRP nöronlarını elektrofizyolojik özelliklerini etkileyebilecek şekilde en az iki farklı yolağın olduğunu göstermektedir. Daha önceki çalışmalarda, opioid antagonistlerin hücre içerisine G protein kaplı reseptörlerden başka şekilde β -arrestin yollağını kullanarak hücre içerisine difüze oldukları gösterilmiştir [122].

Sonuçlarımıza bakıldığında, DAMGO’nun beyin kesitlerinde uygulamış olduğumuz G protein bağlı reseptör inhibitörlerine rağmen, AgRP nöronlarını inhibe ediyor olması, β -arrestin yollağını kullanarak AgRP hücrelerini inhibe ediyor olması muhtemeldir. Bu bağlamda elde ettiğimiz sonuçların, oreksijenik nöron gruplarından AgRP nöronlarında ilk kez bu kadar detaylı çalışılıyor olması bakımından önem arz etmektedir.

Bununla birlikte, hipotalamik ARC’de lokalize olan AgRP nöronları, PVH bölgesine yoğun aksonal projeksiyonlar gönderir ve sinaptik bağlantılar kurar. $Arc^{AgRP \rightarrow PVH}$ sinaptik bağlantısı enerji, metabolizma ve beslenmenin düzenlenmesinde önemli rol oynar. Bu bağlantıya etki edecek ilaçların da iştah düzenlemesi için önemli olabileceği düşünülmektedir. Bundan dolayı, opioid reseptör agonistinin AgRP nöronların PVH bölgesine gönderdiği sinaptik bağlantıları üzerine farmakolojik etkilerini araştırdık. Bunun için optogenetik tekniğinden yararlandık. Bu amaçla AgRP-Cre farelere ChR2 virüs enjeksiyonu yapıldı. Arkuat AgRP nöronlarını 470 nm dalga boylu lazer ile 5 ms genişliğinde 2 pulse olacak şekilde uyararak, PVH nöronlarından kayıt alındı. Sinaptik bağlantı bulunan nöronlar üzerine DAMGO perfüze edildiğinde peak amplitude (tepe genliği) değerleri anlamlı derecede azaldığı görüldü. AgRP nöronlarının yeme davranışı sırasında PVH nöronlarına GABA salgılayarak nöron gruplarının inhibisyonunu sağlar. Alınan sonuçlara bakıldığında DAMGO, AgRP nöronların PVH nöronlarına oluşturduğu inhibisyonu, inhibe ettiği gözlenmiştir.

Aynı zamanda, AgRP nöronlarından gelen sinaptik inputların “release probability” (salıverme olasılığı) özelliklerini inceledik. Presinaptik hücreden nörotransmitter salınım olasılığı (PPR) olarak ifade edilir. Yapılan sinaptik bağlantı deneylerinden elde edilen veriler PPR için analiz edildiğinde nörotransmitter salınım özelliği olan PPR sonucu her iki grup arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir.

Ex vivo beyin kesitlerinde uygulamış olduğumuz μ opioid reseptör agonistinin AgRP nöron elektriksel özelliklerine ve projeksiyonlarına olan etkisini gözlemledik. Sistemik olarak uygulanacak opioid agonistinin AgRP nöron grubunda aynı etkileri gösterip göstermeyeceğini araştırdık. Bunun için fiber fotometre Ca^{+2} görüntüleme metodunu kullandık. Bu amaçla AgRP-Cre farelere AVV.Syn.Flex.GCAMP6s virüs enjeksiyonu yapıldı ve beyin içerisine 200 μ m çapında fiber kablo yerleştirildi. Bu teknoloji farenin günlük aktiviteleri sırasında AgRP nöronlarında oluşan elektriksel aktivite değişikliklerinin kaydını almayı mümkün kılmaktadır. Beyin kesitlerinden alınan elektrofizyolojik kayıtlarda DAMGO'nun AgRP nöronlarını inhibe ediyor olmasından, Ca^{+2} görüntüleme fiber fotometre deneylerini aç bırakılmış fareler üzerinden aldık. Öncelikle 16 saat aç bırakılan AgRP-Cre farelerden kontrol kaydı alındı. Sonrasında farelere DAMGO (1mg/kg) i.p. şeklinde uygulandı ve Ca^{+2} kaydı alındı. Alınan sonuçlar doğrultusunda, sistemik olarak uygulanan DAMGO, AgRP nöronlarının ateşleme frekansını anlamlı derecede azalttığı gözlemlendi. Ayrıca bunlara ek olarak 5 gün boyunca farelere DAMGO uygulanarak farelerin yem tüketimi ve kafes içi lokomotor aktivitesi 24 saat kamera ile gözlemlendi. Aynı farelerden beşer gün ortalama yem tüketim miktarları ölçümü yapıldı. Sonrasında 5 gün boyunca DAMGO uygulandı. Tüketilen yem miktarları öncesi/sonrası şeklinde analiz edildiğinde, DAMGO uygulandığında farelerin yem tüketimi anlamlı olmamakla birlikte arttığı görüldü. Bunlara ek olarak kafes içi lokomotor aktivitesine bakıldığında, farelerin DAMGO uygulanmaya başladıktan sonra anlamlı derecede hareket mesafelerinin azaldığı ama hızlarında bir değişiklik olmadığı gözlemlendi.

Bu tez çalışmada μ opioid reseptörlerin AgRP nöronlarının aktivitesi üzerine etkileri ilk defa olarak incelenmiştir. Çalışmamızın bulgularına göre, μ opioid agonizminin iştah düzenlenmesinde önemli bir role sahip olan AgRP nöronlarının aktivitesinin modülasyonunda etkili olduğu önerilebilir.

6. KAYNAKLAR

1. Rossi MA, Stuber GD. Overlapping Brain Circuits for Homeostatic and Hedonic Feeding. *Cell Metab.* 2018 Jan 9;27(1):42-56.
2. Yilmaz B, Gilmore DP. Opioid modulation of hypothalamic catecholaminergic neurotransmission and the pre-ovulatory LH surge in the rat. *Neuro Endocrinol Lett.* 1999;20(1-2):115-121.
3. Yu YH, Vasselli JR, Zhang Y, Mechanick JI, Korner J, Peterli R. Metabolic vs. hedonic obesity: a conceptual distinction and its clinical implications. *Obes Rev.* 2015 Mar;16(3):234-47.
4. Leigh SJ, Morris MJ. The role of reward circuitry and food addiction in the obesity epidemic: An update. *Biol Psychol.* 2018 Jan;131:31-42.
5. Brown DR, Holtzman SG. Suppression of deprivation-induced food and water intake in rats and mice by naloxone. *Pharmacol Biochem Behav.* 1979 Nov;11(5):567-73.
6. Cooper SJ. Naloxone: effects on food and water consumption in the non-deprived and deprived rat. *Psychopharmacology (Berl).* 1980;71(1):1-6.
7. Frenk H, Rogers GH. The suppressant effects of naloxone on food and water intake in the rat. *Behav Neural Biol.* 1979 May;26(1):23-40.
8. Holtzman SG. Effects of narcotic antagonists on fluid intake in the rat. *Life Sci.* 1975 May 1;16(9):1465-70.
9. St-Pierre DH, Rabasa-Lhoret R, Lavoie ME, Karelis AD, Strychar I, Doucet E, Coderre L. Fiber intake predicts ghrelin levels in overweight and obese postmenopausal women. *Eur J Endocrinol.* 2009;161(1):65-72.
10. St-Pierre DH, Karelis AD, Coderre L, Malita F, Fontaine J, Mignault D, Brochu M, et al. Association of acylated and nonacylated ghrelin with insulin sensitivity in overweight and obese postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(1):264-269.
11. Beck B. Neuropeptide Y in normal eating and in genetic and dietary-induced obesity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2006;361(1471):1159-1185.
12. Atasoy D, Aponte Y, Su H.H, and Sternson Scott M. A FLEX Switch Targets Channelrhodopsin-2 to Multiple Cell Types for Imaging and Long-Range Circuit Mapping. *Journal of Neuroscience* (28) 7025-7030.

13. Bodnar RJ. Endogenous opiates and behavior: 2008. *Peptides*. 2009 Dec;30(12):2432-79.
14. Berthoud HR, Morrison C. The brain, appetite, and obesity. *Annu Rev Psychol*. 2008;59:55-92.
15. Ferenczi S, Núñez C, Pintér-Kübler B, Földes A, Martín F, Márkus VL, Milanés MV, Kovács KJ. Changes in metabolic-related variables during chronic morphine treatment. *Neurochem Int*. 2010 Oct;57(3):323-30.
16. Yeomans MR, Gray RW. Opioid peptides and the control of human ingestive behaviour. *Neurosci Biobehav Rev*. 2002 Oct;26(6):713-28.
17. Holtzman SG: Suppression of appetitive behavior in the rat by naloxone: lack of effect of prior morphine dependence. *Life Sci* 1979;24:219–226.
18. Levine AS, Grace M, Billington CJ: Beta-funaltrexamine (beta-FNA) decreases deprivation and opioidinduced feeding. *Brain Res* 1991;562:281–284.
19. Shaw WN, Mitch CH, Leander JD, Mendelsohn LG, Zimmerman DM: The effect of the opioid antagonist ly255582 on body weight of the obese Zucker rat. *Int J Obes* 1991;15:387–395.
20. Shaw WN: Long-term treatment of obese Zucker rats with ly255582 and other appetite suppressants. *Pharmacol Biochem Behav* 1993;46:653–659.
21. Statnick MA, Tinsley FC, Eastwood BJ, Suter TM, Mitch CH, Heiman ML: Peptides that regulate food intake: antagonism of opioid receptors reduces body fat in obese rats by decreasing food intake and stimulating lipid utilization. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 284:R1399–1408.
22. Sahr AE, Sindelar DK, Alexander-Chacko JT, Eastwood BJ, Mitch CH, Statnick MA: Activation of mesolimbic dopamine neurons during novel and daily limited access to palatable food is blocked by the opioid antagonist ly255582. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;295:R463–471.
23. Gosnell BA, Levine AS, Morley JE: The stimulation of food intake by selective agonists of mu, kappa and delta opioid receptors. *Life Sci* 1986;38:1081–1088.
24. Xu L, Zhang F, Zhang DD, Chen XD, Lu M, Lin RY, Wen H, Jin L, Wang XF: Oprm1 gene is associated with BMI in Uyghur population. *Obesity (Silver Spring)* 2009;17:121–125.
25. Pennock RL, Hentges ST: Differential expression and sensitivity of presynaptic and postsynaptic opioid receptors regulating hypothalamic proopiomelanocortin neurons. *J Neurosci*;31:281–288.

26. Hagan MM, Rushing PA, Benoit SC, Woods SC, Seeley RJ: Opioid receptor involvement in the effect of AGRP-(83-132) on food intake and food selection. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 280:R814–821.
27. Olszewski PK, Wirth MM, Grace MK, Levine AS, Giraudo SQ: Evidence of interactions between melanocortin and opioid systems in regulation of feeding. *Neuroreport* 2001;12:1727–1730.
28. Brugman S, Clegg DJ, Woods SC, Seeley RJ: Combined blockade of both micro- and kappa-opioid receptors prevents the acute orexigenic action of agouti-related protein. *Endocrinology* 2002;143:4265–4270.
29. Grossman HC, Hadjimarkou MM, Silva RM, Giraudo SQ, Bodnar RJ: Interrelationships between mu opioid and melanocortin receptors in mediating food intake in rats. *Brain Res* 2003;991:240–244.
30. Kotz CM, Grace MK, Billington CJ, Levine AS: The effect of norbinaltorphimine, beta-funaltrexamine and naltrindole on NPY-induced feeding. *Brain Res* 1993;631:325–328.
31. Levine AS, Grace M, Billington CJ: The effect of centrally administered naloxone on deprivation and druginduced feeding. *Pharmacol Biochem Behav* 1990;36:409–412.
32. Schick RR, Schusdziarra V, Nussbaumer C, Classen M: Neuropeptide Y and food intake in fasted rats: effect of naloxone and site of action. *Brain Res* 1991;552:232–239.
33. Rudski JM, Grace M, Kuskowski MA, Billington CJ, Levine AS: Behavioral effects of naloxone on neuropeptide Y-induced feeding. *Pharmacol Biochem Behav* 1996;54:771–777.
34. Karatayev O, Barson JR, Chang GQ, Leibowitz SF: Hypothalamic injection of non-opioid peptides increases gene expression of the opioid enkephalin in hypothalamic and mesolimbic nuclei: possible mechanism underlying their behavioral effects. *Peptides* 2009;30:2423–2431.
35. Sweet DC, Levine AS, Kotz CM: Functional opioid pathways are necessary for hypocretin-1 (orexin-A)- induced feeding. *Peptides* 2004;25:307–314.
36. Clegg DJ, Air EL, Woods SC, Seeley RJ: Eating elicited by orexin-A, but not melanin-concentrating hormone, is opioid mediated. *Endocrinology* 2002;143:2995–3000.

37. Zheng H, Patterson LM, Berthoud HR: Orexin signaling in the ventral tegmental area is required for high-fat appetite induced by opioid stimulation of the nucleus accumbens. *J Neurosci* 2007;27:11075–11082.
38. Herz A: Opioid reward mechanisms: a key role in drug abuse? *Can J Physiol Pharmacol* 1998;76:252–258.
39. Reid LD: Endogenous opioid peptides and regulation of drinking and feeding. *Am J Clin Nutr* 1985;42:1099–1132.
40. Levine AS, Billington CJ: Why do we eat? A neural systems approach. *Annu Rev Nutr* 1997;17:597–619.
41. Spanagel R, Herz A, Shippenberg TS: Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:2046–2050.
42. Levine AS, Morley JE, Brown DM, Handwerker BS: Extreme sensitivity of diabetic mice to naloxone-induced suppression of food intake. *Physiol Behav* 1982;28:987–989.
43. Lynch WC, Burns G: Opioid effects on intake of sweet solutions depend both on prior drug experience and on prior ingestive experience. *Appetite* 1990;15:23–32.
44. Parker RK, Holtmann B, White PF: Effects of a nighttime opioid infusion with PCA therapy on patient comfort and analgesic requirements after abdominal hysterectomy. *Anesthesiology* 1992;76:362–367.
45. Zhang M, Kelley AE: Intake of saccharin, salt, and ethanol solutions is increased by infusion of a mu opioid agonist into the nucleus accumbens. *Psychopharmacology (Berl)* 2002;159:415–423.
46. MacDonald AF, Billington CJ, Levine AS: Effects of the opioid antagonist naltrexone on feeding induced by DAMGO in the ventral tegmental area and in the nucleus accumbens shell region in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;285:R999–1004.
47. Levine AS, Grace MK, Cleary JP, Billington CJ: Naltrexone infusion inhibits the development of preference for a high-sucrose diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002;283:R1149–1154.
48. Yu WZ, Sclafani A, Delamater AR, Bodnar RJ: Pharmacology of flavor preference conditioning in shamfeeding rats: effects of naltrexone. *Pharmacol Biochem Behav* 1999;64:573–584.

49. Azzara AV, Bodnar RJ, Delamater AR, Sclafani A: Naltrexone fails to block the acquisition or expression of a flavor preference conditioned by intragastric carbohydrate infusions. *Pharmacol Biochem Behav* 2000; 67:545–557.
50. Delamater AR, Sclafani A, Bodnar RJ: Pharmacology of sucrose-reinforced place-preference conditioning: effects of naltrexone. *Pharmacol Biochem Behav* 2000;65:697–704.
51. Naleid AM, Grace MK, Cummings DE, Levine AS: Ghrelin induces feeding in the mesolimbic reward pathway between the ventral tegmental area and the nucleus accumbens. *Peptides* 2005;26:2274–2279.
52. Abizaid A, Liu ZW, Andrews ZB, Shanabrough M, Borok E, Elsworth JD, Roth RH, Sleeman MW, Picciotto MR, Tschoep MH, Gao XB, Horvath TL: Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. *J Clin Invest* 2006;116:3229–3239.
53. Levine AS, Grace M, Billington CJ, Zimmerman DM: Central administration of the opioid antagonist, ly255582, decreases short- and long-term food intake in rats. *Brain Res* 1991;566:193–197.
54. Ahlbeck K: Opioids: A two-faced Janus. *Curr Med Res Opin* 2011; 27:439 – 48.
55. McNicol E, Horowicz-Mehler N, Fisk RA, Bennett K, GialeliGoudas M, Chew PW, Lau J, Carr D, American Pain Society: Management of opioid side effects in cancer-related and chronic noncancer pain: A systematic review. *J Pain* 2003; 4:231–56.
56. Ballantyne JC, Mao J: Opioid therapy for chronic pain. *N Engl J Med* 2003; 349:1943–53. Childers SR, Snyder SH: Guanine nucleotides differentiate agonist and antagonist interactions with opiate receptors. *Life Sci* 1978; 23:759 – 61.
57. Childers SR, Creese I, Snowman AM, Synder SH: Opiate receptor binding affected differentially by opiates and opioid peptides. *Eur J Pharmacol* 1979; 55:11– 8.
58. Barchfeld CC, Medzihradsky F: Receptor-mediated stimulation of brain GTPase by opiates in normal and dependent rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 121:641– 8.
59. Minneman KP, Iversen IL. Enkephalin and opiate narcotics increase cyclic GMP accumulation in slices of rat neostriatum. *Nature*. 1976 Jul 22;262(5566):313-4.

60. Hsia JA, Moss J, Hewlett EL, Vaughan M: ADP-ribosylation of adenylate cyclase by pertussis toxin. Effects on inhibitory agonist binding. *J Biol Chem* 1984; 259:1086–90.
61. Taussig R, Iníiguez-Lluhi JA, Gilman AG: Inhibition of adenylyl cyclase by Gi α . *Science* 1993; 261:218–21.
62. Wickman K, Clapham DE: Ion channel regulation by G proteins. *Physiol Rev* 1995; 75:865–85
63. Sadjá R, Alagem N, Reuveny E: Gating of GIRK channels: Details of an intricate, membrane-delimited signaling complex. *Neuron* 2003; 39:9–12.
64. Ippolito DL, Temkin PA, Rogalski SL, Chavkin C: N-terminal tyrosine residues within the potassium channel Kir3 modulate GTPase activity of Galphai. *J Biol Chem* 2002; 277: 32692–6.
65. Torrecilla M, Quillinan N, Williams JT, Wickman K: Pre- and postsynaptic regulation of locus coeruleus neurons after chronic morphine treatment: A study of GIRK-knockout mice. *Eur J Neurosci* 2008; 28:618–24.
66. Torrecilla M, Marker CL, Cintora SC, Stoffel M, Williams JT, Wickman K: G-protein-gated potassium channels containing Kir3.2 and Kir3.3 subunits mediate the acute inhibitory effects of opioids on locus ceruleus neurons. *J Neurosci* 2002; 22:4328–34
67. Rusin KI, Giovannucci DR, Stuenkel EL, Moises HC: Kappaopioid receptor activation modulates Ca² currents and secretion in isolated neuroendocrine nerve terminals. *J Neurosci* 1997; 17:6565–74
68. Zamponi GW, Snutch TP: Modulating modulation: Crosstalk between regulatory pathways of presynaptic calcium channels. *Mol Interv* 2002; 2:476–8
69. Zamponi GW, Snutch TP: Modulation of voltage-dependent calcium channels by G proteins. *Curr Opin Neurobiol* 1998; 8:351–6
70. Bourinet E, Soong TW, Stea A, Snutch TP: Determinants of the G protein-dependent opioid modulation of neuronal calcium channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 1486–91
71. Díaz A, Ruíz F, Flo'rez J, Pazos A, Hurle' MA: Regulation of dihydropyridine-sensitive Ca channels during opioid tolerance and supersensitivity in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 274:1538–44

72. Díaz A, Flo'rez J, Pazos A, Hurle' MA: Opioid tolerance and supersensitivity induce regional changes in the autoradiographic density of dihydropyridine-sensitive calcium channels in the rat central nervous system. *Pain* 2000; 86:227–35
73. Al-Hasani R, Bruchas MR. Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. *Anesthesiology*. 2011 Dec;115(6):1363-81.
74. Le Merrer J, Becker JA, Befort K, Kieffer BL. Reward processing by the opioid system in the brain. *Physiol Rev*. 2009 Oct;89(4):1379-412.
75. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, MaratosFlier E, Flier JS. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*. 1996;382(6588):250–252.
76. Akabayashi A, Levin N, Paez X, Alexander JT, Leibowitz SF. Hypothalamic neuropeptide Y and its gene expression: relation to light/dark cycle and circulating corticosterone. *Mol Cell Neurosci*. 1994;5(3):210–218. 6.
77. Bi S, Robinson BM, Moran TH. Acute food deprivation and chronic food restriction differentially affect hypothalamic NPY mRNA expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003;285(5):R1030–R1036.
78. Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerd'an MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*. 2001;411(6836):480–484.
79. Broberger C, Johansen J, Johansson C, Schalling M, Hökfelt T. The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(25):15043–15048.
80. Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, Schwartz MW. Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci*. 1998;1(4):271–272.
81. Ebenezer IS, Prabhaker M. The effects of intraperitoneal administration of the GABA(B) receptor agonist baclofen on food intake in CFLP and C57BL/6 mice. *Eur J Pharmacol*. 2007;569(1–2): 90–93.
82. Cooper SJ. Palatability-dependent appetite and benzodiazepines: new directions from the pharmacology of GABA(A) receptor subtypes. *Appetite*. 2005;44(2):133–150.

83. Semjonous NM, Smith KL, Parkinson JR, Gunner DJ, Liu YL, Murphy KG, Ghatei MA, Bloom SR, Small CJ. Coordinated changes in energy intake and expenditure following hypothalamic administration of neuropeptides involved in energy balance. *Int J Obes.* 2009;33(7):775–785.
84. Tang-Christensen M, Vrang N, Ortmann S, Bidlingmaier M, Horvath TL, Tschöpp M. Central administration of ghrelin and agouti-related protein (83-132) increases food intake and decreases spontaneous locomotor activity in rats. *Endocrinology.* 2004; 145(10):4645–4652.
85. Abbott NJ, Ronnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7(1):41–53.
86. Ganong WF. Circumventricular organs: definition and role in the regulation of endocrine and autonomic function. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2000;27(5-6):422–427.
87. Balland E, Dam J, Langlet F, Caron E, Steculorum S, Messina A, Rasika S, Falluel-Morel A, Anouar Y, Dehouck B, Trinquet E, Jockers R, Bouret SG, Prévot V. Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. *Cell Metab.* 2014; 19(2):293–301.
88. Mullier A, Bouret SG, Prevot V, Dehouck B. Differential distribution of tight junction proteins suggests a role for tanycytes in blood-hypothalamus barrier regulation in the adult mouse brain. *J Comp Neurol.* 2010;518(7):943–962.
89. Collden G, Balland E, Parkash J, Caron E, Langlet F, Prevot V, Bouret SG. Neonatal overnutrition causes early alterations in the central response to peripheral ghrelin. *Mol Metab.* 2014;4(1): 15–24.
90. Broadwell RD, Brightman MW. Entry of peroxidase into neurons of the central and peripheral nervous systems from extracerebral and cerebral blood. *J Comp Neurol.* 1976;166(3):257–283.
91. Broadwell RD, Balin BJ, Salzman M, Kaplan RS. Brain-blood barrier? Yes and no. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983;80(23): 7352–7356.
92. Zhang L, Ip CK, Lee IJ, Qi Y, Reed F, Karl T, Low JK, Enriquez RF, Lee NJ, Baldock PA, Herzog H. Diet-induced adaptive thermogenesis requires neuropeptide FF receptor-2 signalling. *Nat Commun.* 2018;9(1):4722.
93. Shi Z, Cassaglia PA, Pelletier NE, Brooks VL. Sex differences in the sympathoexcitatory response to insulin in obese rats: role of neuropeptide Y. *J Physiol.* 2019;597(6):1757–1775.

94. Loh K, Zhang L, Brandon A, Wang Q, Begg D, Qi Y, Fu M, Kulkarni R, Teo J, Baldock P, Brüning JC, Cooney G, Neely G, Herzog H. Insulin controls food intake and energy balance via NPY neurons. *Mol Metab.* 2017;6(6):574–584.
95. Willesen MG, Kristensen P, Rømer J. Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology.* 1999;70(5):306–316.
96. Baskin DG, Breininger JF, Schwartz MW. Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus. *Diabetes.* 1999;48(4):828–833.
97. Baskin DG, Schwartz MW, Seeley RJ, Woods SC, Porte D Jr, Breininger JF, Jonak Z, Schaefer J, Krouse M, Burghardt C, Campfield LA, Burn P, Kochan JP. Leptin receptor long-form splice-variant protein expression in neuron cell bodies of the brain and co-localization with neuropeptide Y mRNA in the arcuate nucleus. *J Histochem Cytochem.* 1999;47(3):353–362.
98. Gruber K, McRae-Degueurce A, Wilkin LD, Mitchell LD, Johnson AK. Forebrain and brainstem afferents to the arcuate nucleus in the rat: potential pathways for the modulation of hypophyseal secretions. *Neurosci Lett.* 1987;75(1):1–5.
99. Yi CX, van der Vliet J, Dai J, Yin G, Ru L, Buijs RM. Ventromedial arcuate nucleus communicates peripheral metabolic information to the suprachiasmatic nucleus. *Endocrinology.* 2006;147(1): 283–294.
100. Krashes MJ, Shah BP, Madara JC, Olson DP, Strohlic DE, Garfield AS, Vong L, Pei H, Watabe-Uchida M, Uchida N, Liberles SD, Lowell BB. An excitatory paraventricular nucleus to AgRP neuron circuit that drives hunger. *Nature.* 2014;507(7491):238–242.
101. Cone RD. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci.* 2005;8(5):571–578.
102. Balthasar N, Dalgaard LT, Lee CE, Yu J, Funahashi H, Williams T, Ferreira M, Tang V, McGovern RA, Kenny CD, Christiansen LM, Edelstein E, Choi B, Boss O, Aschkenasi C, Zhang CY, Mountjoy K, Kishi T, Elmquist JK, Lowell BB. Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell.* 2005;123(3):493–505.
103. Marsh DJ, Hollopeter G, Kafer KE, Palmiter RD. Role of the Y5 neuropeptide Y receptor in feeding and obesity. *Nat Med.* 1998; 4(6):718–721.

104. Horvath TL, Bechmann I, Naftolin F, Kalra SP, Leranath C. Heterogeneity in the neuropeptide Y-containing neurons of the rat arcuate nucleus: GABAergic and non-GABAergic subpopulations. *Brain Res.* 1997;756(1–2):283–286.
105. Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, Kerns JA, Chen Y, Gantz I, Barsh GS. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science.* 1997;278(5335):135–138.
106. van den Pol AN, Yao Y, Fu LY, Foo K, Huang H, Coppari R, Lowell BB, Broberger C. Neuromedin B and gastrin-releasing peptide excite arcuate nucleus neuropeptide Y neurons in a novel transgenic mouse expressing strong Renilla green fluorescent protein in NPY neurons. *J Neurosci.* 2009;29(14):4622–4639.
107. Dietrich MO, Bober J, Ferreira JG, Tellez LA, Mineur YS, Souza DO, Gao XB, Picciotto MR, Ara 'ujo I, Liu ZW, Horvath TL. AgRP neurons regulate development of dopamine neuronal plasticity and nonfood-associated behaviors. *Nat Neurosci.* 2012;15(8): 1108–1110.
108. Luquet S, Perez FA, Hnasko TS, Palmiter RD. NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science.* 2005;310(5748):683–685.
109. Campbell JN, Macosko EZ, Fenselau H, Pers TH, Lyubetskaya A, Tenen D, Goldman M, Verstegen AM, Resch JM, McCarroll SA, Rosen ED, Lowell BB, Tsai LT. A molecular census of arcuate hypothalamus and median eminence cell types. *Nat Neurosci.* 2017;20(3):484–496.
110. Chen R, Wu X, Jiang L, Zhang Y. Single-cell RNA-Seq reveals hypothalamic cell diversity. *Cell Reports.* 2017;18(13):3227–3241.
111. Wu Q, Howell MP, Cowley MA, Palmiter RD. Starvation after AgRP neuron ablation is independent of melanocortin signaling. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(7):2687–2692.
112. Wu Q, Howell MP, Palmiter RD. Ablation of neurons expressing agouti-related protein activates fos and gliosis in postsynaptic target regions. *J Neurosci.* 2008;28(37):9218–9226.
113. Wu Q, Boyle MP, Palmiter RD. Loss of GABAergic signaling by AgRP neurons to the parabrachial nucleus leads to starvation. *Cell.* 2009;137(7):1225–1234.
114. Michaud EJ, Bultman SJ, Stubbs LJ, Woychik RP. The embryonic lethality of homozygous lethal yellow mice (Ay/Ay) is associated with the disruption of a novel RNA-binding protein. *Genes Dev.* 1993; 7(7a, 7A):1203–1213.

115. Betley JN, Cao ZF, Ritola KD, Sternson SM. Parallel, redundant circuit organization for homeostatic control of feeding behavior. *Cell*. 2013;155(6):1337–1350
116. Wang D, He X, Zhao Z, Feng Q, Lin R, Sun Y, Ding T, Xu F, Luo M, Zhan C. Whole-brain mapping of the direct inputs and axonal projections of POMC and AgRP neurons. *Front Neuroanat*. 2015 Mar 27;9:40.
117. Zhang L, Hernandez-Sanchez D, Herzog H. Regulation of Feeding-Related Behaviors by Arcuate Neuropeptide Y Neurons. *Endocrinology*. 2019 Jun 1;160(6):1411-1420.
118. Aklan I, Sayar Atasoy N, Yavuz Y, Ates T, Coban I, Koksalar F, Filiz G, Topcu IC, Oncul M, Dilsiz P, Cebecioglu U, Alp MI, Yilmaz B, Davis DR, Hajdukiewicz K, Saito K, Konopka W, Cui H, Atasoy D. NTS Catecholamine Neurons Mediate Hypoglycemic Hunger via Medial Hypothalamic Feeding Pathways. *Cell Metab*. 2020 Feb 4;31(2):313-326.e5.
119. Ting JT, Lee BR, Chong P, Soler-Llavina G, Cobbs C, Koch C, Zeng H, Lein E. Preparation of Acute Brain Slices Using an Optimized N-Methyl-D-glucamine Protective Recovery Method. *J Vis Exp*. 2018 Feb 26;(132):53825.
120. Bai L, Mesgarzadeh S, Ramesh KS, Huey EL, Liu Y, Gray LA, Aitken TJ, Chen Y, Beutler LR, Ahn JS, Madisen L, Zeng H, Krasnow MA, Knight ZA. Genetic Identification of Vagal Sensory Neurons That Control Feeding. *Cell*. 2019 Nov 14;179(5):1129-1143.e23.
121. Wei W, Pham K, Gammons JW, Sutherland D, Liu Y, Smith A, Kaczorowski CC, O'Connell KM. Diet composition, not calorie intake, rapidly alters intrinsic excitability of hypothalamic AgRP/NPY neurons in mice. *Sci Rep*. 2015 Nov 23;5:16810.
122. Lowe JD, Sanderson HS, Cooke AE, Ostovar M, Tsisanova E, Withey SL, Chavkin C, Husbands SM, Kelly E, Henderson G, Bailey CP. Role of G Protein-Coupled Receptor Kinases 2 and 3 in μ -Opioid Receptor Desensitization and Internalization. *Mol Pharmacol*. 2015 Aug;88(2):347-56.
123. Atasoy D, Betley JN, Su HH, Sternson SM. Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature*. 2012 Aug 9;488(7410):172-7

7. EKLER

7.1. Etik Kurul Onay Formu



T.C. YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK)

ETİK KURUL KARARI

Protokol No	Toplantı Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar No	Proje Yürütücüsü
2020-862	27.08.2020	2020/08	2020/08-9	Prof. Dr. Bayram Yılmaz
‘Transgenik Farelerde Hipotalamik Arkuat AgRP Nöronlarının Opioid Modülasyonu’ isimli proje oy birliğiyle etik açıdan uygun görülmüştür.				
Hayvan Türü /ırkı		Toplam Hayvan Sayısı		Hayvanın Cinsiyeti
Fare / AgRP		60		Erkek veya Dişi

Görevi	Adı Soyadı	Katılım Durumu
Başkan	Prof. Dr. Bayram YILMAZ	Katılmadı
Başkan Vekili	Prof. Dr. Erdem YEŞİLADA	
Üye	Veteriner Hekim Engin SÜMER	
Üye	Prof. Dr. M. Ece GENÇ	
Üye	Prof. Dr. Rukset ATTAR	Katılmadı
Üye	Prof. Dr. Gamze TORUN KÖSE	

Üye	Doç. Dr. Ediz DENİZ	Katılmadı
Üye	Doç. Dr. Aylin YABA UÇAR	
Üye	Doç. Dr. Burcu GEMİCİ BAŞOL	
Üye	Hakan GÖKSEL	
Üye	Ahmet ŞENKARDEŞLER	



7.2. İntihal Raporu İlk Sayfası



7.3. Özgeçmiş

Kişisel Bilgiler

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

Öğrenim Durumu

Derece	Alan	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora	FİZYOLOJİ	YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ	2021
Yüksek Lisans	BİYOFİZİK	MARMARA ÜNİVERSİTESİ	2018
Lisans	FİZİK MÜHENDİSLİĞİ	GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ	2014
Lise	-		

Başarılmış birden fazla sınav varsa (KPDS, ÜDS, TOEFL, IELTS vs), tüm sonuçlar yazılmalıdır

Bildiği Yabancı Dilleri	Yabancı Dil Sınav Notu (#)
İNGİLİZCE	60

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
TEKNİK UZMAN	YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ	2015-DEVAM EDİYOR

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
OFFİCE PROGRAMLARI	ÇOK İYİ

YAZILIM PROGRAMLARI	ÇOK İYİ
---------------------	---------

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Bilimsel Çalışmaları

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Aklan I, Sayar Atasoy N, Yavuz Y , Ates T, Coban I, Koksalar F, Filiz G, Topcu IC, Oncul M, Dilsiz P, Cebecioglu U, Alp MI, Yilmaz B, Davis DR, Hajdukiewicz K, Saito K, Konopka W, Cui H, Atasoy D. NTS Catecholamine Neurons Mediate Hypoglycemic Hunger via Medial Hypothalamic Feeding Pathways. <i>Cell Metab.</i> 2020 Feb 4;31(2):313-326.e5.
Jensen-Cody SO, Flippo KH, Claflin KE, Yavuz Y , Sapouckey SA, Walters GC, Usachev YM, Atasoy D, Gillum MP, Potthoff MJ. FGF21 Signals to Glutamatergic Neurons in the Ventromedial Hypothalamus to Suppress Carbohydrate Intake. <i>Cell Metab.</i> 2020 Aug 4;32(2):273-286.e6.
Dilsiz P, Aklan I, Sayar Atasoy N, Yavuz Y , Filiz G, Koksalar F, Ates T, Oncul M, Coban I, Ates Oz E, Cebecioglu U, Alp MI, Yilmaz B, Atasoy D. MCH Neuron Activity Is Sufficient for Reward and Reinforces Feeding. <i>Neuroendocrinology.</i> 2020;110(3-4):258-270.
Tuna BG, Yesilay G, Yavuz Y , Yilmaz B, Culha M, Maharramov A, Dogan S. Electrophysiological effects of polyethylene glycol modified gold nanoparticles on mouse hippocampal neurons. <i>Heliyon.</i> 2020 Dec 28;6(12):e05824.
Ates T, Oncul M, Dilsiz P, Topcu IC, Civas CC, Alp MI, Aklan I, Ates Oz E, Yavuz Y , Yilmaz B, Sayar Atasoy N, Atasoy D. Inactivation of Magel2 suppresses oxytocin neurons through synaptic excitation-inhibition imbalance. <i>Neurobiol Dis.</i> 2019 Jan;121:58-64.

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

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

Yavuz Y , Aklan i, Sayar Atasoy N, Ağuş S, Bilgin V.A, Atasoy D and Yılmaz B. (2019). Investigation of Synaptic Neurotransmission in the Orexigenic ARCAGRP→PVN Neural Circuit by Optogenetic and Electrophysiological Methods. FENS Regional Meeting 10-13 July Belgrade. ISBN 978-86-917255-3-2. Serbian Neuroscience Society, Belgrade
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
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. Karger, 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
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
Aklan I, Sayar Atasoy N, Yavuz Y , Atasoy D. MCH neuron activity is sufficient for reward and reinforces feeding. SFN 19-23 October Chicago
Atasoy D, Aklan I, Sayar Atasoy N, Yavuz Y , Modulation of hypothalamic hunger circuits by an ascending catecholamine pathway. SFN 19-23 October Chicago
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
Aklan i, Sayar Atasoy N, Yavuz Y , Ateş T, Çoban i, Filiz G, Köksalar Alkan F, Topçu İ C, Öncül M, Dilsiz P, Cebecioğlu U, Alp Muhammed İkbāl, Yılmaz B. Atasoy D. (2019). Modulation of Hypothalamic Hunger Circuits by a Catecholaminergic Pathway in TH-cre Transgenic Mice. 17th Turkish Neuroscience Congress, 4–7 April 2019. <i>Anatomy</i> 2019;
Dilsiz P, Aklan i, Sayar Atasoy N, Yavuz Y , Filiz G, Köksalar Alkan F, Ateş T, Öncül M, Çoban I, Ateş Öz E, Cebecioğlu U, Alp Muhammed İkbāl, Yılmaz B. Atasoy D. (2019). Role of MCH Neurons on Reward and Appetite Regulation in Pmch-cre Transgenic Mice. 17th Turkish Neuroscience Congress, 4–7 April 2019. <i>Anatomy</i> 2019;.
Yavuz Y , Ateş T, Sayar Atasoy N, Atasoy D, Yılmaz B. (2018). Synaptic pharmacology of orexigenic ARCAGRP → PVN connection. 3rd International Congress of Turkish Neuroendocrinology Society, 29 June-1 July 2018. <i>Neuroendocrinology</i> 2018; 107 (suppl 1): 1–40
Yavuz Y , Doğan S, Kuku G, Çulha M, Maharramov A, Güvenç Tuna B, Yılmaz B. (2017).Altın nanoparçacıkların ve polietilen glikol modifiyeli formunun hipokampal nöronlar üzerine etkisi 15. Ulusal Sinirbilim Kongresi, Sakarya Üniversitesi, 7-10 Mayıs. SS022.(oral presentations)
Güler S, Yavuz Y , Eyuboğlu S, Başer Ö, Atasoy D, Yılmaz B. (2017). Transgenik Farelerde Paraventriküler Çekirdekte Bulunan Oksitosin Nöronlarının İncelenmesi. 15. Ulusal Sinirbilim Kongresi, Sakarya Üniversitesi, 7-10 Mayıs. PS024.

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

--

Diğer (Görev Aldığı Projeler/Sertifikaları/Ödülleri)

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.