



T.C.

**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MATERNAL BESİN KISITLAMASININ SURİYE
HAMSTERLERİNDE YAVRU GELİŞİMİ VE NPY/AGRP GEN
EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

PINAR İNAN

Tez Danışmanı

Prof. Dr. BÜLENT GÜNDÜZ

ÇANAKKALE – 2023



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MATERNAL BESİN KISITLAMASININ SURIYE HAMSTERLERİNDE
YAVRU GELİŞİMİ VE NPY/AGRP GEN EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

PINAR İNAN

Tez Danışmanı

Prof. Dr. BÜLENT GÜNDÜZ

Bu çalışma, Bilimsel Araştırma Projeleri kurumu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 3196

ÇANAKKALE – 2023



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



Pınar İNAN tarafından Prof. Dr. Bülent GÜNDÜZ yönetiminde hazırlanan ve **25/07/2023** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Maternal Besin Kısıtlamasının Suriye Hamsterlerinde Yavru Gelişimi ve NPY/AGRP Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**’nda **DOKTORA TEZİ** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir

Jüri Üyeleri

İmza

Prof. Dr. Bülent GÜNDÜZ

(Danışman)

Prof. Dr. Murat TOSUNOĞLU

Prof. Dr. Cahit AKGÜL

Prof. Dr. Murat YURTCAN

Prof. Dr. Aylin ER

Tez No :

Tez Savunma Tarihi : 25/07/2023

Prof. Dr. Ahmet Evren ERGİNAL

Enstitü Müdürü

25/07/2023

ETİK BEYAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kuralları'na uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada; tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi taahhüt ve beyan ederim.

Pınar İNAN
25/07/2023

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleŐtirilmesinde, çalıŐmam boyunca yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Bülent GÜNDÜZ'e, çalıŐmam süresince öneri ve bilgileriyle katkıda bulunan değerli hocamlarım Prof. Dr. Cahit AKGÜL ve Prof. Dr. Murat TOSUNOğLU'na teŐekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her evresinde maddi manevi en büyük destekçim olan eŐim Salih İNAN'a, kızlarım Sare İNAN ve Sena İNAN'a, çalışma süresince her zorluğu benimle göğüsleyen çalışma arkadaŐım Gülsüm AKKUŐ'a,

Manevi destekleri ile her daim yanımda olan babam Burhanettin GÖK'e, annem Tülay GÖK'e, kardeŐlerim Bahar GÖK ve Engin GÖK'e sonsuz teşekkür ederim.

Pınar İNAN
anakkale, Temmuz 2023

ÖZET

MATERNAL BESİN KISITLAMASININ SURIYE HAMSTERLERİNDE YAVRU GELİŞİMİ VE NPY/AGRP GEN EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ

Pınar İNAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı /Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Bülent GÜNDÜZ

25/07/2023, 75

Maternal besin kısıtlaması, yavrunun enerji homeostazında yer alan hipotalamik nöropeptitler üzerinde kalıcı etkilere yol açabilir. Bu çalışmada, Suriye hamsteri yavrularında beslenme ve fotoperiyod gibi maternal faktörlerin NPY/AgRP gen ekspresyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çalışmada yetişkin dişi hamsterler uzun ve kısa fotoperiyot altında üç farklı beslenme koşulu uygulanmak üzere rastgele ayrılmıştır: Bunlar normal beslenme, geceye kısıtlama ve gündüze kısıtlama gruplarıdır. Beslenme rejimleri uygulanan annelerden doğan yavrulara laktasyon süresinden sonra da 30 günlük olana kadar beslenme rejimleri devam ettirilmiştir. Yavru hamsterlerin 10. 20. ve 30. günde alınan hipotalamus dokuları, NPY/AgRP'nin genlerin mRNA ekspresyonu için RT-PCR ve protein miktarı için ELISA analizi yapılmıştır. Uzun fotoperiyotta yer alan yavrularda besin tüketimi açısından gruplar arasında farklılık belirlenmemiştir ($p>0.05$). Uzun fotoperiyotta ki yavruların vücut ağırlıklarının, normal beslenme grubuna kıyasla geceye ve gündüze kısıtlama gruplarında azalmıştır ($p<0.05$). Kısa fotoperiyotta yer alan yavruların ise normal beslenme grubuna kıyasla besin tüketiminin daha fazla olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Kısa fotoperiyotta maternal beslenme rejimlerinin yavruların vücut ağırlıkları açısından gruplar arasında farklılık belirlenmemiştir ($p>0.05$). Uzun fotoperiyotta yer alan geceye ve gündüze kısıtlama gruplarındaki yavruların, NPY/AgRP mRNA ekspresyonu ve protein miktarı normal beslenmeye kıyasla laktasyon süresince en fazla artmaktadır ($p<0.05$). Kısa fotoperiyotta ise beslenme rejimlerinin normal beslenmeye kıyasla NPY mRNA ekspresyonu hem laktasyon sürecinde hemde laktasyon sonrasında önemli ölçüde artmıştır ($p<0.05$). AgRP'nin gen ekspresyonu ve protein miktarı

laktasyon süresince en fazla artmıştır ($p<0.05$). Gelişimin erken dönemlerindeki maternal faktörler, yavruların NPY/AgRP gen ekspresyonu ve protein miktarını önemli ölçüde etkilediği görülmektedir. Bu sonuçlar enerji dengesinin metabolik düzenlemesinin gelişimin çok erken dönemlerinde maternal faktörler ile değişebileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: ELISA, Maternal transfer, *Mesocricetus auratus*, NPY/AgRP nöronları, RT-PCR.



ABSTRACT

THE EFFECT OF MATERNAL NUTRIENT RESTRICTION ON THE DEVELOPMENT OF OFFSPRING AND NPY/AGRP GENE EXPRESSION IN SYRIAN HAMSTERS

Pınar İNAN

Çanakkale Onsekiz Mart University

School of Graduate Studies

Doctoral Dissertation in Biological Science

Advisor: Prof. Dr. Bülent GÜNDÜZ

25/07/2023, 75

Maternal nutrient restrictions can cause permanent effects on the hypothalamic neuropeptides in the offspring's energy homeostasis. In this study, the effects of maternal factors such as feeding and photoperiod on NPY/AgRP gene expression in Syrian hamster offspring were investigated. In the study, adult female hamsters were randomly separated to apply three different nutritional conditions under long and short photoperiods: These *ad libitum* group, night fasting group and day fasting groups. After the lactation period, feeding regimens were continued for the offspring born from mothers who were given nutritional regimens, until they were 30 days old. Hypothalamus tissues of offspring hamsters were taken at 10, 20 and 30 days, RT-PCR for mRNA expression of NPY/AgRP genes and ELISA analysis for protein amount were performed. There was no difference between the groups in terms of food consumption in the offspring in the long photoperiod ($p>0.05$). The body weights of the offspring in the long photoperiod were decreased in the night and day fasting groups compared to the *ad libitum* group ($p<0.05$). It was determined that the food consumption of the offspring in the short photoperiod was higher compared to the *ad libitum* group ($p<0.05$). In the short photoperiod, no difference could be determined between the groups in terms of the body weights of the offspring of maternal feeding regimens ($p>0.05$). In the night fasting and day fasting groups with long photoperiods, NPY/AgRP mRNA expression and protein content increase the most during lactation compared to *ad libitum*. ($p<0.05$). In the short photoperiod, NPY gene expression has

significantly increased compared to control of diet regimes ($p < 0.05$). AgRP's gene expression and protein quantity decreased after lactation ($p < 0.05$). Early stages of development have shown that maternal factors have significantly affected the offspring's NPY and AgRP gene expression and protein quantity. These results show that the metabolic regulation of energy balance may change with maternal factors during the very early stages of development.

Keywords: ELISA, Maternal transfer, *Mesocricetus auratus*, NPY/AgRP neurons, RT-PCR.



İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
JÜRİ ONAY SAYFASI.....	İ
ETİK BEYAN.....	İi
TEŞEKKÜR.....	İii
ÖZET	İv
ABSTRACT	Vi
İÇİNDEKİLER	Viii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	Xi
TABLolar DİZİNİ.....	Xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	Xiii

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

	1
1.1. Beslenmenin Hipotalamik Kontrolü.....	3
1.2. Arkuat Nükleus (ARC).....	5
1.3. Oreksijenik (İştah Arttıran) Peptidler.....	
1.3.1. Nöropeptit Y (NPY).....	8
1.3.2. Agouti İlişkili Peptid (AgRP).....	9
1.3.3. Ghrelin.....	10
1.4. Anoreksijenik (İştah Azaltan) Peptidler	11
1.4.1. Pro-opiomelanokortin (POMC)/Kokain ve amfetamin ilişkili peptit (CART).....	11
1.4.2. Leptin.....	13
1.5. Melatonin.....	14
1.6. Biyolojik Ritim ve Enerji Dengesi.....	15
1.7. Maternal Transfer.....	16
1.8. Fotoperiyot ve Vücut Ağırlığı İlişkisi.....	17
1.9. Suriye Hamsteri.....	18

İKİNCİ BÖLÜM	
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	20

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM	
MATERYAL YÖNTEM	27

3.1. Hayvan Materyali.....	27
3.2. Kullanılan Cihazlar ve Diğer Gereçler.....	27
3.3. DeneY Gruplarının Oluşturulması.....	28
3.1.1. Uzun Fotoperiyota Ait Gruplar.....	28
3.1.2. Kısa Fotoperiyota Ait Gruplar.....	29
3.4. Besin Tüketimi	30
3.5. Vücut Ağırlığı Ölçümü	30
3.6. Doku Örneklerinin Alınması.....	31
3.7. Toplam RNA İzolasyonu.....	31
3.8. cDNA Sentezi.....	32
3.9. RT-qPCR Reaksiyonu.....	33
3.10. RT-qPCR Analizi.....	34
3.11. Toplam Protein İzolasyonu.....	35
3.12. Toplam Protein Miktarı Ölçümü.....	36
3.13. ELISA Testi.....	37
3.14. İstatistiksel Analizler.....	38

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM	
ARAŞTIRMA BULGULARI	39

4.1. Gen Ekspresyonu Bulguları	39
4.1.1. Toplam RNA İzolasyonu	39
4.1.2. cDNA Sentezi ve Real Time PCR.....	40
4.1.3. Çalışmada Kullanılan Genlerin Erime Eğrileri ve Çoğaltma Görüntüleri.....	40
4.2. Toplam Protein Miktarı.....	45
4.3. Uzun Fotoperiyot Gruplarına Ait Bulgular.....	46
4.3.1. Besin Tüketimi.....	46

4.3.2. Vücut Ağırlıkları.....	47
4.3.3. NPY'nin mRNA Ekspresyonu ve Protein Miktarı.....	48
4.3.4. AgRP'nin mRNA Ekspresyon ve Protein Miktarı.....	50
4.4. Kısa Fotoperiyot Gruplarına Ait Bulgular.....	52
4.4.1. Besin Tüketimi	52
4.4.2. Vücut Ağırlıkları.....	53
4.4.3. NPY'nin mRNA Ekspresyonu ve Protein Miktarı.....	54
4.4.4. AgRP'nin mRNA Ekspresyonu ve Protein Miktarı.....	56
4.5 Tartışma.....	58

BEŞİNCİ BÖLÜM
SONUÇ ve ÖNERİLER

63

KAYNAKÇA	65
EKLER	I
EK 1. HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURULU İZİNİ.....	I
ÖZGEÇMİŞ	II

SİMGELER VE KISALTMALAR

NPY	Nöropeptit Y
AgRP	Agouti ilişkili peptit
POMC	Pro-omelanocortin
CART	Kokain ve amfetamin ilişkili peptit
SCN	Suprakiasmatik nükleus
ARC	Arkuat nükleus
VMH	Ventromedial hipotalamus
DMH	Dorsamedial hipotalamus
PVH	Paraventriküler hipotalamus
LHA	Lateral hipotalamus alan
NTS	Nükleus traktus solitarus
MSH	Melanosit uyarıcı hormon
Lep-Rb	Leptin reseptörü
MCH	Melanokortin hormon
MCR	Melanokortin reseptör
CCK	kolesis-tokinin
TRH	Tiroksin
CRH	Kortikotropin salıcı hormon
GABA	Gama aminobütirik asit
GH	Büyüme hormonu

TABLULAR DİZİNİ

Tablo No	Tablo Adı	Sayfa No
Tablo 1	Beslenme ve enerji metabolizmasını düzenleyen moleküller	6
Tablo 2	Uzun fotoperiyota ait gruplar	29
Tablo 3	Kısa fotoperiyota ait gruplar	30
Tablo 4	cDNA sentezinin hazırlanışı	33
Tablo 5	cDNA sentez reaksiyon koşulları	33
Tablo 6	Hedef ve kontrol genlerin primer dizileri	34
Tablo 7	Sybergreen reaksiyon sentezi	35
Tablo 8	Sybergreen reaksiyon RT-PCR koşulları	35
Tablo 9	Protein tayini standart stok çözeltilerinin hazırlanması	36
Tablo 10	Deney gruplarının toplam RNA miktarları	38
Tablo 11	Deney gruplarının toplam protein miktarları	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1	Enerji dengesi ve iştahı düzenleyen hipotalamus bölgeleri	4
Şekil 2	Beslenme davranışının hipotalamik kontrolü	7
Şekil 3	Hamilelik döneminde iştahın programlama mekanizmaları	17
Şekil 4	Stereodiseksiyon mikroskobu altında <i>Mesocricetus auratus</i> beyin görüntüsü	31
Şekil 5	Deney gruplarına ait NPY geninin Real-Time PCR tepkimesine ait erime eğrisi görüntüsü.	41
Şekil 6	Deney gruplarına ait NPY geninin Negatif kontrolünün Real-Time PCR tepkimesine ait çoğaltma görüntüsü.	41
Şekil 7	Deney gruplarına ait NPY geninin Real-Time PCR tepkimesine ait çoğaltma görüntüsü	42
Şekil 8	Deney gruplarına ait AgRP geninin Real-Time PCR tepkimesine ait erime eğrisi görüntüsü	42
Şekil 9	Deney gruplarına ait AgRP geninin Negatif kontrolünün Real-Time PCR tepkimesine ait çoğaltma görüntüsü.	43
Şekil 10	Deney gruplarına ait AgRP geninin Real-Time PCR tepkimesine ait çoğaltma görüntüsü	43
Şekil 11	Deney gruplarına ait ACTB geninin Real-Time PCR tepkimesine ait erime eğrisi görüntüsü	44
Şekil 12	Deney gruplarına ait ACTB geninin Negatif kontrolünün Real-Time PCR tepkimesine ait çoğaltma görüntüsü.	44
Şekil 13	Deney gruplarına ait ACTB geninin Real-Time PCR tepkimesine ait çoğaltma görüntüsü	45
Şekil 14	Beslenme rejimlerinin <i>M. auratus</i> yavrularında laktasyon sürecinden sonra besin tüketimi üzerine etkileri.	47
Şekil 15	Beslenme rejimlerinin yavru Suriye hamsterlerinin (<i>M. auratus</i>) vücut ağırlığı üzerine etkileri	48
Şekil 16	Yavru Suriye hamsterlerinin (<i>M. auratus</i>) normal beslenmeye oranla NPY mRNA ekspresyonu	49

Şekil 17	Farklı beslenme rejimlerine maruz kalan yavru Suriye hamsterlerinin (<i>M. auratus</i>) NPY protein miktarları	50
Şekil 18	Yavru Suriye hamsterlerinin (<i>M. auratus</i>) normal beslenmeye oranla AgRP mRNA ekspresyonu	51
Şekil 19	Farklı beslenme rejimlerine maruz kalan yavru Suriye hamsterlerinin (<i>M. auratus</i>) AgRP protein miktarları	52
Şekil 20	Kısa fotoperiyota ait beslenme rejimlerinin <i>M. auratus</i> yavru gruplarında laktasyon sonra besin tüketimi üzerine etkileri	53
Şekil 21	Kısa fotoperiyota ait beslenme rejimlerinin yavru Suriye hamsterlerinin (<i>M. auratus</i>) vücut ağırlığı üzerine etkileri	54
Şekil 22	Kısa fotoperiyotta yavru Suriye hamsterlerinin (<i>M. auratus</i>) NPY mRNA ekspresyonu	55
Şekil 23	Kısa fotoperiyotta farklı beslenme rejimlerine maruz kalan yavru Suriye hamsterlerinin (<i>M. auratus</i>) NPY protein miktarları	56
Şekil 24	Kısa fotoperiyotta yavru Suriye hamsterlerinin (<i>Mesocricetus auratus</i>) AgRP mRNA ekspresyonu	57

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

Beslenme; yaşam kalitesinin artırılması ve sağlığın korunması için vücudun ihtiyacı olan besin öğelerinin dengeli ve uygun zamanda tüketilmesidir. Günümüzde bilim ve teknoloji alanındaki ilerlemeler hızla artmakta ve modern yaşam, aşırı beslenme ve fazla enerji alımına ilişkin sorunların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Besinlerle alınan enerjinin harcanan enerjiden fazla olmasıyla oluşan obezite, bireyleri ve toplumları etkileyen çok faktörlü kronik bir hastalıktır. Obezite ve buna bağlı metabolik hastalıkların artan prevalansı, dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Aşırı kilo, tip II diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve yaşlanma dahil olmak üzere çok sayıda kronik bozukluğun gelişmesi için önemli bir risk oluşturmaktadır (Gao vd., 2021).

Obezite üzerinde çeşitli faktörler (gen, nöroendokrin ve çevre) etkili olsa da en önemli çevresel faktör beslenmedir (Kauwell, 2005). Metabolizmanın dış (beslenme ve çevre gibi) ve içsel faktörlerden (cinsiyet ve yaş gibi) etkilendiği açıkça bilinmektedir. Yetersiz beslenme veya aşırı beslenme, enerji metabolizmasının veya enerji homeostazının sürekli olarak bozulmasına neden olmaktadır. Beslenme ile ilgili sinyalleri algılamada merkezi rol oynayan hipotalamus, enerji homeostazisinin kontrolünde en önemli beyin bölgesidir (Blouet, and Schwartz 2010). Beslenme davranışı ve vücut ağırlığı, hipotalamik nöronlar olan Nöropeptid Y (NPY), ve Agouti ile ilgili peptit (AgRP) tarafından düzenlenmektedir (Aponte vd., 2011).

İnsanlarda olduğu gibi doğada da birçok hayvan vücut ağırlığını, üremesini ve enerji dengesini birçok çevresel faktörlere (fotoperiyot, sıcaklık, nem ve besin alımı gibi) göre düzenlemektedir. Fotoperiyodik canlılar, ışık bilgisinin uyarımı ile enerji metabolizması, vücut ağırlığı ve üreme gibi birçok önemli fizyolojik mekanizmalarında değişiklikler göstermektedir. Fotoperiyodik hayvanlar olan hamster ve gerbil türlerinde ise şişmanlık görülmemekte ve vücut ağırlığındaki değişimler mükemmel bir şekilde fotoperiyot tarafından kontrol edilmektedir. Ayrıca fotoperiyot bilgisi maternal transfer yolu ile yavrulara aktarılabilmektedir.

Maternal transfer yoluyla anneden yavruya bilgi aktarımı gerçekleşmekte ve annenin maruz kaldığı olumlu ya da olumsuz çevresel faktörler yavru için oldukça önem arz etmektedir. Fotoperiyodik bilgilerin anneden fetüse aktarılmasında büyük önem taşıdığı ve gelişmekte olan fetüsü etkilediği bildirilmiştir (Gündüz ve Stetson, 2003). Hamilelik, oldukça zor bir fizyolojik süreç olup bu süreçte anne yavru için tüm gereksinimleri karşılamak durumundadır. Aksi takdirde doğumdan önce ve gebelik sürecindeki beslenme, fotoperiyot gibi maternal faktörlerin yavrunun yaşam süresini, büyümesini, vücut kompozisyonunu etkilemektedir. Yavrunun gelişimi sırasında annenin karşılaştığı olumsuz koşullar yavrunun düşük doğum ağırlığıyla doğmasına neden olduğu ve insanlarda yavrunun ileride Tip II diyabet ve obezite riskini arttırdığı gösterilmiştir (Hales ve Barker, 1992).

Gelişimin çok erken dönemlerinde beslenmedeki değişiklikler yavruların sağlığını ve büyümesi üzerinde uzun vadeli olumsuz etkiler yaratabilir (Blouet ve Schwartz, 2010). Hamilelik boyunca annenin beslenme ortamında meydana gelen değişiklikler, fetüs için daha sonraki yaşamda obezite ile ilişkilendirilmiştir (Clarke vd., 2021). Maternal beslenme durumu yavrunun besin alımını düzenleyen hipotalamik bağlantıları etkileyerek NPY ve AgRP artışına bağlı olarak hiperfajiye yol açtığı düşünülmektedir. Maternal besin kısıtlamasına yanıt olarak, yavrular artan bir açlık/tokluk gen ekspresyonu sergilemektedir (Ross ve Desai, 2014). Maternal olarak yetersiz beslenen yavrularda, NPY'nin anoreksijenik nöronların inhibisyonunu artırmaktadır. Gebelik ve laktasyon sürecindeki maternal faktörler (beslenme, sıcaklık ve fotoperiyot vb.) yavrunun yaşam süresini ve gelişimini etkilemektedir.

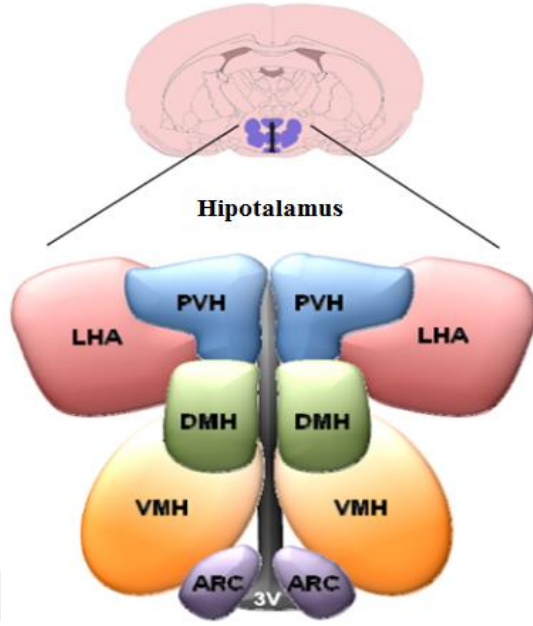
Enerji homeostazını düzenleyen nöronal bağlantılarda bilgi işlemeye aracılık eden moleküler mekanizmaları anlamak, obez hastalara diğer nöronal sistemler üzerinde yan etkileri olmayan veya en aza indirilmiş kilo verme programlarını belirlemede yardımcı olan spesifik farmakolojik stratejiler geliştirmek için önemlidir. Bu çalışmada, beslenme ve fotoperiyot gibi maternal faktörlerin, yavruların hipotalamik nöropeptitler olan NPY/AgRP'nin, gen ekspresyonunu nasıl etkilediği ve gelişimin erken dönemlerinden itibaren 30. güne kadar nasıl değişim gösterdiğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

1.1.Beslenmenin Hipotalamik Kontrolü

Beslenme, hamilelik döneminde başlayan ve yaşamın sonlandığı ana kadar devam eden yaşamın vazgeçilmez bir ihtiyacıdır. Canlı, besin alımıyla vücut yağ oranını ve enerji metabolizmasının sürdürülmesini, aynı zamanda homeostazisinin korunmasını sağlar. Enerjinin alımı ve harcanmasındaki kompleks denge, vücut ağırlığının devamlılığını sağlar. Enerji dengesinin devamlılığı, karşılıklı olarak etkileşim halinde olan negatif ve pozitif enerji dengesi ile sağlanmaktadır. Besin alımı ve enerji tüketimi arasındaki denge, merkezi sinir sistemi tarafından birden fazla nöron popülasyonu arasındaki sıkı koordinasyonlarla kontrol edilir. Enerji metabolizmasının düzenlenmesinde beyindeki merkezler ve nöropeptit aracılı sinyaller önemli rol oynamaktadır. Vücudun ihtiyacı olan besin alımı ve iştahı düzenleyen önemli sinirsel merkezler hipotalamusta bulunur.

Hipotalamus; çeşitli nükleus ve sinir liflerinden oluşan, talamusun altında 3. ventrikülde konumlanmış olup beynin küçük ama işlevsel olarak çok önemli bir bölgesidir. Nöronal bağlantıları aracılığı ile beynin diğer bölgeleriyle (talamus, korteks, beyin sapı gibi) iletişim halindedir. Organizmanın vücut ısısının ayarlanması, günlük yeme içme aktivitesinin kontrolü gibi birçok işleve sahiptir. Ayrıca hipofiz bezi ile olan bağlantıları aracılığı ile endokrin sistemi düzenler. Hipotalamusun lateral hipotalamus bölgesi “açlık merkezi” olarak, ventromedial hipotalamus bölgesi ise “tokluk merkezi” olarak rol oynar.

Hipotalamusun başta arkuat nükleus olmak üzere paraventriküler hipotalamus, dorsomedial hipotalamus ve lateral hipotalamus alan besin alımını düzenlemektedirler. Paraventriküler hipotalamus lezyonları genellikle aşırı yemeye neden olurken, dorsomedial hipotalamus lezyonları yeme davranışını çoğunlukla baskılar. Arkuat nükleus ise sindirim sisteminden ve yağ dokusundan salınan çok sayıda hormonun besin alımı ve enerji harcanmasını düzenlemek üzere etkilerini birleştirdikleri bir hipotalamus bölgesidir (Guyton, 2006). Hipotalamusta bu bölgeler birbirine yakın anatomik yerleşime sahiptir ve nöronları arasında çok yoğun etkileşimler vardır. Hipotalamusun bu bölgeleri hep birlikte yeme davranışını kontrol ederler (Şekil 1).



Şekil 1. Enerji dengesi ve iştahı düzenleyen hipotalamus bölgeleri; Arkuat nükleus (ARC), Ventromediyal hipotalamus (VMH), Dorsamediyal hipotalamus (DMH), Paraventriküler hipotalamus (PVH), Lateral hipotalamus Alan (LHA).

Ventromediyal hipotalamus (VMH); enerji dengesinin korunması, anksiyete, cinsel davranış ve sirkadiyen ritimler gibi birçok homeostatik fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynar. VMH kan şekeri düştüğü durumlarda cevap olarak glukagon salınımının düzenlenmesi ile ilişkilidir. VMH' de yoğun şekilde glukoz duyarlı nöronlar bulunmaktadır. VMH lezyonlarının hiperfaji ile birlikte obeziteye neden olduğu bilinmektedir. VMH, besin alımıyla uyarıldığı zaman, α -adrenerjik reseptörleriyle, tokluk hissi oluşturur ve besin alımını durdurur, lezyonlarında ise kilo alımını arttırarak obeziteye neden olduğu bildirilmiştir (Morley, 1987).

Lateral hipotalamus alan (LHA); bu bölgede glukoz duyarlı nöronlar bulunur ve bunlar leptin ile inhibe edilebilirken, azalan glukoz seviyesiyle aktive olur. LHA'da oreksin ve melanin konsantre edici hormon (MCH) olmak üzere iki farklı nöron grubu sentezlemektedir (Elmqvist vd., 1999). MCH nöronları, 19 aminoasitten oluşan bir peptit olup esas olarak hipotalamusun açlık bölgesi olan lateral hipotalamusta yoğunlaşmıştır. MCH'nin hipotalamusa intraserebroventriküler enjeksiyonu besin alımını uyardığı ve açlık

ile arttığı belirlenmiştir (Qu vd., 1996). Leptin hormonu ile MCH ekspresyonu antagonistik çalışmaktadır ve MCH ablasyonu obeziteye neden olmaktadır.

Dorsomedial hipotalamus (DMH); enerji homeostatisinin korunmasında önemli rol oynar. DMH'de diğer hipotalamik bölgeler ile iletişim içerisinde olup enerji dengesinde beslenmenin hipotalamik düzenlenmesinde görev almaktadır. DMH ve ARC'de NPY gen ekspresyonunun kontrolü ve düzenlenmesi aynı değildir. DMH'de yer alan NPY kontrolü, leptin reseptörleri bulunmadığı için leptinden bağımsızken, ARC'deki NPY leptin kontrolü altındadır (Bi vd., 2003). DMH, hipotalamustaki SCN'den sinyaller alır ve sirkadiyen ritmi düzenlemede işlevi vardır. DMH'nin lezyonu ise hayvanlarda, hipofajiye (az yeme) ve buna bağlı olarak vücut ağırlığında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Saper vd., 2005).

Paraventricüler hipotalamus (PVH); 3.ventrikül'ün dorsal kısmı boyunca uzanan PVH, beslenme ve nöroendokrin sinyalleri birleştirerek hipotalamusun en önemli bölgesini oluşturur (Elmqvist vd., 1999). PVH, gastrointestinal sistemden vagal sinir iletilerini alan NTS (nükleus traktus solitarius) gibi beyin sapında birçok bölge ile ters çaprazlamalar yapmaktadır. PVH'ye α -MSH enjeksiyonu besin alımını azaltırken, NPY enjeksiyonu ise besin alımını uyardığı bilinmektedir. PVH, en başta ARC bulunan NPY/AgRP ve POMC/CART nöronlarından beslenme ile ilgili sinyaller alır (Elmqvist vd., 1999). PVH bölgesi, Oksitosin, TRH (Tiroksin), CRH (Kortikotropin salıcı hormon) ve vasopressin salgılayıcı nöron gruplarını bulundurur. Bu nöron grupları NPY/ AgRP ve α -MSH'in besin alımı ve enerji harcanımı ile ilgili sinyalleri PVH' ye iletir (Elmqvist vd., 1999).

1.2. Arkuat Nükleus (ARC)

Bazal hipotalamusun 3.ventrikülü boyunca uzanmış olarak bulunan arkuat nükleus; beslenme davranışının kontrolü ile ilgili en iyi karakterize edilen beyin bölgelerinden biridir. Hipotalamusun arkuat nükleusunda spesifik olarak iki farklı nöron popülasyonu vardır: Enerji alımını artıran (oreksijenikler) ve enerji alımını azaltan (anoreksijenikler)

çeşitli moleküller bulunmaktadır. Bu iki nöron grubunun enerji dengesinde önemli olduğu bilinmektedir.

Tablo 1

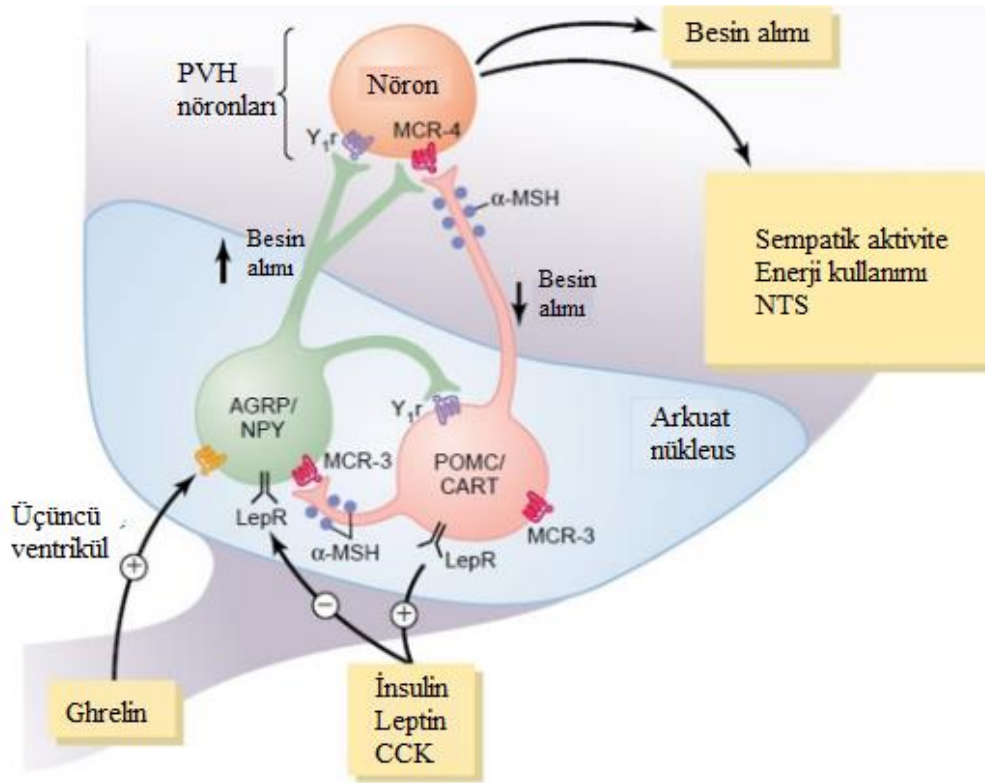
Beslenme ve enerji metabolizmasını düzenleyen moleküller

Besin alımını artıran (Oreksijenik) moleküller	Besin alımını azaltan (Anoreksijenik) moleküller
Nöropeptit Y (NPY)	Leptin
Agouti ilişkili peptid (AgRP)	Pro-opiomelanokortin (POMC)
Nitrik Oksid (NO)	Kokain ve Amfetin ilişkili peptid(CART)
Oreksin A ve B	Kortikotropin salıcı hormon (CRH)
Ghrelin	Melanosit uyarıcı hormon (α MSH)
Hipokretin 1 ve 2	Serotonin
Melanosit Konsantre Edici Hormon(MCH)	İnsülin

Oreksijenik moleküller (iştah arttıran) açlık hissinin başlamasıyla besin alımını uyarırken, anoreksijenik moleküller (iştah azaltan) doyma hissinin oluşması ile besin alımını durduran peptidlerdir (Tablo 1). Oreksijenik peptitler ile anoreksijenik peptitler enerji metabolizmasını dengelemek için etkileşim halindedir. ARC'deki NPY/AgRP nöropeptidleri oreksijenik etkilidir ve leptin hormonu tarafından baskılanırken, POMC ve CART nöropeptidleri anoreksijenik etkilidir ve leptin hormonu tarafından uyarılır.

ARC'deki NPY/AgRP nöronları ayrıca glikoz algılama özelliklerine sahiptir. Bununla birlikte, yüksek glikoz konsantrasyonlarının ARC'deki NPY/AgRP nöronlarını inhibe ettiği gösterilmiştir (Routh, 2010). ARC'deki NPY/AgRP nöron aktivitesinin, enerji dengesini korumak için enerji eksikliği durumlarına yanıt olarak enerji tüketimini azalttığı ve gıda alımını teşvik ettiği gösterilmiştir (Aponte vd., 2011 ; Krashes vd., 2011). NPY/AgRP nöronları besin kısıtlaması veya diyet gibi tüm vücutta yeterli enerjinin bulunmadığı durumlarda aktivitelerinin en yüksek seviyede olması gerektiği için özeldir.

ARC'deki iki farklı nöron grubunun beslenme davranışının hipotalamik kontrolünde önemli olduğu gösterilmiştir. Bu nöron gruplarından biri olan NPY/AgRP nöronları çoğunlukla birlikte eksprese olurken diğer nöron grubu olan POMC/CART nöronları da arkuat nükleusta çoğunlukla birlikte eksprese olurlar. POMC nöronlarının aktivasyonu gıda alımını azaltır ve enerji tüketimini artırırken, NPY ve AgRP nöronlarının aktivasyonu gıda alımını artırır ve enerji harcamasını azaltır. Bu iki nöron grubu, leptin, insülin, kolesis-tokinin (CCK) ve ghrelin dahil olmak üzere iştahı düzenleyen çeşitli hormonların işlevi için ana hedeflerdir.



Şekil 2. Beslenme davranışının hipotalamik kontrolü.

Guyton, 2006'dan modifiye edilmiştir.

POMC ve CART nöronları, özellikle PVH nöronlarında bulunan melanokortin reseptörlerine (MCR) etki eden melanosit uyarıcı hormonunu (α -MSH) serbest bırakır. MCR'nin en az beş alt tipi olmasına rağmen, MCR-3 ve MCR-4 özellikle gıda alımını ve enerji dengesini düzenlemede önemlidir. Bu reseptörlerin aktivasyonu, enerji tüketimini artırırken gıda alımını azaltır. MCR-3 ve 4'ün inhibisyonu ise gıda alımını büyük ölçüde artırır ve enerji tüketimini azaltır. MCR aktivasyonunun enerji harcamasını artırma

etkisinin yanında, kısmen paraventriküler çekirdeklerden NTS'ye uzanan nöronal yolların aktivasyonu aracılık eder ve sempatik sinir sistemi aktivitesini uyarır (Şekil 2).

NPY ve AgRP sentezleyen nöronlar en başta hipotalamusta ARC olmak üzere hipotalamusun DMH, PVH, VMH, ve LHA bölgelerine de yerleşmişlerdir (White ve Kershaw, 1990). Hipotalamusta yer alan ARC nöronlarının anatomik olarak PVH, LH bölgelerine projeksiyonlar yapmaktadır. En fazla ARC ve DMH'den besin alımının düzenlenmesinde diğer hipotalamik bölgelere (LHA PVH ve VMH) uyarıcı ya da inhibe edici projeksiyonlar olmaktadır. NPY'nin projeksiyonları en fazla PVH'ye doğru olmaktadır (Schwartz vd., 2000). NPY, AgRP, POMC ve CART nöronlarının ARC'den diğer hipotalamik bölgeler olan PVN, VMN, DMN ve LHA'ye projeksiyonları olmaktadır.

1.3.Oreksijenik (İştah Arttıran) Peptidler

1.3.1.Nöropeptit Y (NPY)

İlk olarak 1982'de izole edilen NPY, 36 amino asitli bir peptittir ve yapısal olarak benzer peptit YY (PYY) ve pankreatik polipeptit (PP) ile birlikte NPY ailesini oluşturur. NPY, merkezi ve periferik sinir sistemlerinde bol miktarda dağılmış halde bulunmaktadır. Merkezi sinir sisteminde NPY, hipotalamus, serebral korteks ve beyin sapı gibi bölgelerde eksprese edilir ve en yüksek konsantrasyonda ARC'de bulunur (Baraban, 1998). NPY, sempatik sinir sisteminde noradrenalin ile birlikte depolandığı ve korunduğu adrenal bezlerde yüksek oranda eksprese edilir (Schutz vd., 1998). Periferik sinir sisteminde NPY, beyaz yağ dokusu ve kemik hücreleri dahil olmak üzere periferik dokularda bulunmaktadır. NPY, beslenmenin hipotalamik kontrolündeki en güçlü oreksijenik faktördür (Baltacı ve Mogulkoc, 2012).

NPY'nin memelilerde, enerji dengesi ve obezite patofizyolojisinin düzenlenmesinde kilit bir rolü bulunmaktadır. NPY'nin fizyolojik işlevi sadece besin alımının kontrol edilmesi ve enerji metabolizmasının düzenlenmesi değil, aynı zamanda günlük sirkadiyen ritim, uyku uyanıklık siklusunun düzenlenmesi, kan basıncının kontrolü

ve üreme gibi birçok fizyolojik role sahiptir (Yannielli ve Harrington, 2001). Ayrıca NPY doğrudan yağ dokusu üzerinde etki gösterir, bağışıklık ve kardiyovasküler fonksiyonda da önemlidir. (Černelič-Bizjak vd., 2023). NPY, beyinde enerji homeostazını ve yağ depolanmasını düzenleyen nörotransmitter rolünü oynar. NPY'nin sinyal yolkalarındaki etkisi G protein aracılığıyla çalışan reseptörleri (NPY^{Y1}, NPY^{Y2}, NPY^{Y3}, NPY^{Y4}, NPY^{Y5} ve NPY^{Y6}) ile iştah uyarıcı eylemlere aracılık eder. Bunların arasında NPY^{Y1} ve NPY^{Y5} reseptörleri, en fazla hipotalamusta bulunur ve anoreksijenik sinyalleri inhibe eder (Nguyen vd., 2012).

NPY, besin alımını NPY^{Y1} ve NPY^{Y5} reseptörleri aracılığı ile artırır. NPY^{Y1} ve NPY^{Y5} reseptörleri besin alımını uyarırken; α -MSH, MCR-4 reseptörü ile besin alımını inhibe eder (Elmqvist vd., 1999). NPY^{Y4/te} eksik olan farelerde ise ve vücut ağırlığında bir azalma göstermiştir (Sainsbury vd., 2002). NPY^{Y5} antagonistleri potansiyel anti-obezite ilaç hedefleri olarak tanımlanmış ve vücut ağırlığı artışında ve gıda alımında önemli düşüş göstermiştir (Fukasaka vd., 2018). Sonuç olarak, NPY'nin gıda alımının düzenlenmesi için anoreksijenik sinyalleri engelleyen önemli bir nörotransmitter olduğu kanıtlanmıştır.

1.3.2. Agouti İlişkili Peptid (AgRP)

AgRP, hipotalamusta ARC'de yer alan NPY/AgRP nöronlarından salgılır ve insanda 132, kemirgenlerde ise 131 aminoasitlik bir peptitten oluşmaktadır (Brown vd., 2001). AgRP, besin alımında ve besin arama davranışında ARC'de önemli bir role sahiptir. AgRP'nin nöronal aktivitesi hızlı yanıtlıdır, bu sayede beslenme başladığında bazal seviyeler hızla düşer (Chen ve Knight, 2016). Bununla birlikte, AgRP nöropeptitleri, NPY'ye kıyasla uzun vadeli besleme eylemlerinin sürdürülmesinden de sorumludur. NPY'nin etkisi kısa süreli iken AgRP'nin bir haftatayı geçen sürede bile etkisinin devam ettiği bildirilmiştir (Schwartz vd., 2000).

AgRP nöronları, hipotalamik ARC'de besin alımını uyarıcı ghrelin hormonunun önemli hedefidir. Ayrıca AgRP nöronları ARC'de, en başta leptin hormonu tarafından düzenlenmektedir. AgRP ile leptin, zıt etki göstererek besin alımını ve enerji dengesini

düzenlemektedir. AgRP'nin sadece besin alımı üzerine etkisi yoktur aynı zamanda besin seçiminde de etkisi vardır. Sıçanlarda AgRP'nin, yüksek yağ içerikli besini, düşük yağ içerikli besin alımına göre daha fazla olduğunu bildirilmiştir (Ghilardi vd., 1996). AgRP'nin laktasyon ve hamilelik gibi yüksek enerji gerektiren fizyolojik olaylarda da NPY gibi besin alımını artırır.

AgRP eksprese eden nöronlar, leptin, ghrelin ve dolaşımdaki insülin hormonlarından gelen sinyalleri algılar ve aksonal projeksiyonlar yoluyla LHA ve PVH dahil olmak üzere birçok farklı beyin bölgesine yanıt verir (Krashes vd., 2011). Çalışmalar, AgRP'nin rolünün beslenme davranışı ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir (Cone, 2005). AgRP'nin merkezi uygulamasının ve aşırı ekspresyonunun potansiyel olarak hiperfajiye ve obeziteye yol açabileceği kabul edilmiştir. AgRP üzerine yapılan, diğer çalışmalarda AgRP nöronlarının ablasyonunun stres kaynaklı anoreksiye yol açabileceği düşünülmektedir.

AgRP nöronları, POMC projeksiyonlarına karşılık gelen birçok farklı beyin bölgesine projeksiyonları gönderirken, Gama aminobütirik asit (GABA) ve NPY'nin antagonistik eylemleriyle POMC nöronlarını inhibe etmektedir. Bununla birlikte, vücut tarafından salınan periferik hormonal sinyaller, AgRP nöronlarının aktivitesine aracılık ederek enerji dengesi için hipotalamik fonksiyonların kontrolünde anahtar roller oynamaktadır (Cowley vd., 2001). Bu nedenle AgRP, beslenmenin düzenlenmesi için çok önemli kabul edilir.

1.3.3.Ghrelin

Ghrelin, mide mukozasında bulunan oksintik hücreleri tarafından sentezlenmektedir. Ghrelin, somatotropin (büyüme hormonu) salınımını uyararak vücut ağırlığı düzenlenmesinde rol alır. Ghrelinin, hem merkezi hemde çevresel olarak verilmesi, kemirgenlerde besin tüketiminde ve vücut ağırlığında artışa neden olduğu görülmüştür (Tschop vd., 2000). Ghrelinin intraserebroventriküler enjeksiyonu sıçanlarda besin alımında ve vücut ağırlığının artması ile sonuçlanmıştır.

Ghrelın, ARC'deki NPY/AgRP n6ronlarını hedef alan bir hormondur. NPY/AgRP n6ronlarının, enerji eksikliği sırasında ghrelın tepkisi yoluyla beslenmeyi aktive etmektedir. Bu nedenle, v6cut aldığından daha fazla enerji kullandığında, ghrelın seviyeleri artar, bu durum daha sonra gıda alımını uyarmak i7in NPY/AgRP 'yi aktive eder. Ghrelın, iştaha aracılık eden ve hipotalamusta b6y6me hormonu (GH) salınımını destekleyen sinyaller sağlayan oreksijenik sinyalleşmede 6nemli bir role sahiptir. Ghrelın'ın birincil işlevi, beyni v6cudun d6ř6k enerji kullanılabilirliği hakkında bilgilendirmektir.

Ghrelın 6zerine yapılan kapsamlı araştırmalar, AgRP ve NPY'nin iştah a7ıcı davranışların kritik d6zenleyicileri olduğunu a7ık7a g6stermektedir. Ayrıca, ghrelın yaşam boyu metabolik d6zenlemelerde rol oynadığı i7in olduk7a 6nemlidir. Bazı 7alışmalar, ghrelın sinyalleşmesinin farmakolojik inhibisyonu gibi, obeziteyle m6cadelede ghrelın sinyalini hedeflemiştir (Poher vd., 2018). Bu nedenle, ghrelın ve sinyal aracılarının hedeflenmesi, obezite tedavisi i7in potansiyel olarak etkili olabileceği d6ř6n6lmektedir.

6zetle, aktive edilmiş ghrelın, gıda alımını başlatır ve enerji homeostazını kontrol etmeye katkıda bulunan enerji harcanmasını azaltır. Bununla birlikte, bazı 7alışmalar, ghrelın sistemlerinde fonksiyon kaybı olan farelerin v6cut ağırlığını artırmak yerine glikoz metabolizmasını ve ins6lin duyarlılığını değiştirdiğini g6sterdiğinden, ghrelının enerji homeostazının d6zenlenmesindeki rol6 hen6z tam olarak anlaşılamamıştır (Mani ve Zigman, 2017). Diğer hormonlar 6rneğin; leptin, ins6lin ve glukoz sinyali, besin d6zenlemesinde rol alan NPY/AgRP'nin n6ronal aktivitesini etkileyebilmektedir.

1.4. Anoreksijenik (İştah Azaltan) Peptidler

1.4.1. Pro-Opiomelanokortin(POMC)/Kokain ve Amfetamin İlişkili Peptit (CART)

Tokluk sinyali olarak POMC/CART n6ronları, enerji dengesinin kontrol6 i7in sistemik ve sinirsel yolları i7eren melanokortin sisteminin 6nemli bileşenleridir. POMC, gıda alımını baskılayan ve enerji harcanmasını artıran CART peptitleri ile birlikte eksprese

edilen tokluk sinyalinin öncüsü olarak kabul edilir. POMC, hipotalamik ARC' deki POMC/CART nöronlarından salınır.

POMC/CART peptitlerin anoreksijenik rolü, farelerde ablasyonu ile yapılan obezite çalışmalarında keşfedilmiştir. POMC nöronlarının optogenetik ve kemo-genetik uyarımı ile ilgili çalışmalar, gıda alımının azaldığını göstermiştir (Aponte vd., 2011). Diğer çalışmalar, POMC nöronlarının doğum sonrası ablasyonunun anksiyete benzeri davranışları arttırdığını ve obezite gelişimi riskini arttırdığı bildirilmiştir (Greenman vd., 2013). Normal koşullarda olmasına rağmen POMC, pro-termojenik ve anoreksijenik sinyaller sağlamak için aşırı gıda alımı ile aktive edilir. Bu nedenle, bu nöropeptitler, enerji homeostazında yer alan melanokortin sınıflandırmasının kritik düzenleyicileri olarak kabul edilir. AgRP/NPY'de olduğu gibi, POMC/CART nöronlarının enerji homeostazında gerekli olduğu kabul edilir. Örneğin, her iki nöropeptidin merkezi uygulaması, enerji dengesizliğine, glikoz ve insüline karşı dirence neden olur. Bu durum AgRP/NPY gibi ARC nöronal peptitlerinin yanı sıra POMC/CART'ın enerji homeostazını düzenlemede çok önemli olduğu görüşünü desteklemektedir.

POMC nöropeptidinin proteolitik bölünmesi, adrenokortikotropik hormon (ACTH),ve melanosit uyarıcı hormon (MSH) başta olmak üzere çok çeşitli fizyolojik fonksiyonlara sahip çok sayıda hormonal peptidin ortaya çıkmasına neden olur (Toda vd., 2017). α -MSH'nin, beş reseptörü bulunmaktadır ve beslenmede anoreksijenik etki gösterir. Melanokortin sistemi iki endojen protein tarafından kontrol edilir. α -MSH, POMC salındığında, PVH'de ifade edilen ve tokluk sinyallerini aktive etmekten sorumlu olan melanokortin reseptörleri (MC3R, MC4R) ile etkileşime girer. α -MSH, MCR4 reseptörü aracılığıyla besin alımını güçlü bir şekilde baskılamaktadır.

α -MSH peptitleri, enerji homeostazının düzenlenmesi için iki önemli rol oynar. α -MSH, PVH'da MC4R reseptörünün bağlanması yoluyla beslenmede azalmaya aracılık etmek için aktif α -MSH peptitleri üreten deasetil α -MSH peptitlerini kodlamak için POMC ile birlikte çalışır (Friedman, 2016). Bu peptitler ayrıca AgRP ve NPY gibi diğer nöronların kombinasyonu ile POMC aktivitesi üzerinde inhibitör bir rol oynar. AgRP,

POMC ile innerve olan ve GABA'yı serbest bırakarak nöronal uyarıyı engelleyen güçlü bir α -MSH antagonistidir (Wauman vd., 2017). Örneğin, açlık koşulları altında AgRP nöropeptidi, α -MSH'nin anoreksijenik etkisini önlemek için seçici olarak MC4R'ye bağlanırken, oreksijenik etkileri olan NPY'nin beslemeyi başlatmasını indükler (Timper ve Brüning, 2017). MC4R ve MC3R'nin işlevi, besin alımının ve vücut ağırlığının düzenlenmesinde önemlidir.

1.4.2. Leptin

Yağ dokusu tarafından vücut yağ miktarıyla doğrudan ilişkili olarak üretilen ve salgılanan leptin, 167 aminoasitlik bir hormondur. Leptinin çok sayıda reseptörleri (Lep-Ra, Lep-Rb, Lep-Rc gibi), en başta hipotalamus olmak üzere, enerji metabolizması, üreme ve termoregülasyon gibi birçok sistemin düzenlenmesinde rol almaktadır (Meli vd., 2004). Leptin konsantrasyonundaki küçük bir artış iştahı azaltır ve vücut ağırlığında azalmasına yol açar. POMC nöronları, leptinin hormonal etkisi yoluyla enerji fazlalığı koşulları sırasında beslenme inhibisyonundan sorumludur. Leptin, yağ dokusundan kaynaklanan tokluk sinyallerine aracılık eden POMC sinyalini düzenler. İlginç bir şekilde, leptin, farklı reseptörleri hedefleyerek hem NPY/AgRP hem de POMC nöronlarını etkiler. Bu şekilde, NPY/AgRP ve POMC nöronal popülasyonları, gıda alımını ayarlamak ve enerji dengesini kontrol etmek için birbirleriyle etkileşime girer. Leptin uygulamasının POMC nöronlarının depolarizasyonunu indüklediği ve NPY/AgRP nöropeptidlerinin ekspresyonunu azaltarak, POMC inhibisyonunu azalttığı ve böylece besin alımının azalmasına sebep olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, leptinin POMC ekspresyonu yoluyla beslenmeyi azaltmak ve enerji harcanmasını artırmak için sinyaller verdiği öne sürülmüştür (Cowley vd., 2001).

Leptin, spesifik reseptörüne, en uzun fonksiyonel izoform reseptörüne bağlanarak; ARC zarının yakınında bulunan Lep-Rb hücre içi sinyalleşme için yeterli görülmektedir. Ayrıca Lep-Rb, gıda alımının azaltılması yoluyla enerji dengesi için gerekli olmasının yanında lokomotor aktivite, termojenez ve üreme dahil olmak üzere birçok işlevi vardır (Balthasar vd., 2004). Bu nedenle Lep-Rb, leptin etkisi için hayati bir reseptör olarak kabul edilir. Hipotalamik dokularda leptine yüksek affinite gösteren bölgelerin var olmasının yanında leptinin etkileri açısından hipotalamik NPY hayati role sahiptir. Obez ve zayıf

sıçanlarda leptin verilmesi besin alımını ve ağırlıklarını azaltırken leptin eksikliği olan farelerde ise obezite geliştiği görülmüştür (Baltacı ve Mogulkoc, 2012). Leptinin yağ dokudan beyne iletilen en önemli moleküler sinyal olduğu ve bu etkiyi NPY sayesinde yaptığı düşünülmektedir.

1.5. Melatonin

Melatonin hormonu, pineal bez tarafından triptofandan üretilen, gündüz ve gece döngüleriyle ilişkili çeşitli fizyolojik süreçleri kontrol eden bir hormondur. Melatonin sentezi ve kan dolaşımına salınımı, günün karanlık fazında gerçekleşmektedir. Işık bilgisinin iletilmesinde ve düzenlenmesinde melatonin hormonu önemli role sahiptir. Melatonin hormonunun salınımı suprakiazmatik nükleustaki (SCN) nöron grupları tarafından düzenlenmektedir. Melatonin hormonu, sirkadiyen ritimleri aydınlık ve karanlık döngüleriyle senkronize etmeye yardımcı olur. Melatonin, sağlığın korunması için çok önemli olan enerji metabolizması ve bunların senkronizasyonu dahil olmak üzere birçok fizyolojik süreci zamanlayarak, sirkadiyen ritmin sürdürülmesi için esastır (Reiter vd., 2012).

Melatoninin besin alımı ve vücut ağırlığındaki mevsimsel değişiklikler üzerindeki iyi tanımlanmış düzenleyici etkisinin yanında vücut ağırlığının günlük kontrolünde etkisi bulunmaktadır. Enerji dengesi ve metabolizması sirkadiyen sistemin kontrolü altındadır ve günlük ritim olan aydınlık/karanlık döngüyü düzenler. Melatonin hormonunun salınımının aydınlık ve karanlık fazlarda değişmektedir.

Sıçanlarda melatoninin, ARC deki NPY sentezini uyardığı bildirilmiştir (Diaz vd., 2000). Melatonin hormonunun, besin alımı ve metabolizma üzerine etkisinin leptin hormonu, çalışmalarında besin kısıtlaması ile etkin değişiklikler göstermesi ile araştırmalar yoğunlaşmıştır. Melatoninin leptin salınımını baskılayarak beslenmedeki önemi gösterilmiştir (Gündüz, 2002). Melatonin hormonu diurnal olan kümes hayvanlarında besin alımını azaltırken sıçan gibi nokturnal türlerde besin alımını artırmaktadır (Wolden-Hanson vd., 2000). Suriye hamsterlerine melatonin verilmesinin vücut ağırlığını artırdığı

gösterilmiştir (Bartness ve Wade, 1984). Vücut ağırlığının düzenlenmesinde leptin, ghrelin ve melatonin hormonlarının iletişim halindedirler.

1.6. Biyolojik Ritim ve Enerji Dengesi

Canlının yaşamı boyunca, biyolojik sistemler içinde tekrarlı ritimler halinde gerçekleşen olaylara biyolojik ritimler denir. Bu ritimler, günlük, aylık, mevsimlik ve yıllık ritimler şeklinde olabilmektedir. Vücut ağırlığının artması veya azalması, kürk renginde değişim, hibernasyondaki hayvanlarda vücut sıcaklığı değişimi ve lokomotor aktivite değişimi gibi birçok fizyolojik olay mevsimsel olarak gerçekleşmektedir (Refinetti ve Menaker, 1992). Sirkadiyen ritimler, organizma fizyolojisinin birçok yönünü kontrol eder; ışık, yiyecek ve sıcaklık gibi dış uyaranlar tarafından değişebilir. Sirkadiyen ritimlerin/saatlerin ana işlevi, dış ortamdaki günlük değişiklikleri göre homeostaziyi sürdürmek ve dalgalanan ortama uyarlabilir fizyolojik tepkiler sağlamaktır. Örneğin; gen ekspresyonu, transkripsiyon faktörleri, sinyal yolları, hormon salgılanması, enerji metabolizması, büyüme ve davranış sirkadiyen sistem tarafından ritmik olarak koordine edilmektedir. Sirkadiyen saatin genetik veya çevresel bozulması, hastalıkların yüksek prevalansı ile ilişkilendirilmiştir.

Vücut ağırlığı ve besin alımını kontrol eden beynin hipotalamus bölgesindeki suprakiazmatik nükleus (SCN) ve arkuat nükleustur (Varela vd., 2021). Sirkadiyen saat hipotalamusta yer alan SCN'de bulunur. SCN ışık ile uyarılır ve beynin diğer bölgelerini uyarı göndererek vücut ritimlerinin düzenlenmesini sağlar. SCN hipotalamusta DMH'ye ve subparaventriküler alana sinyaller gönderir (Saper vd., 2005). SCN'nin sinir ağları arkuat nükleus ve ventromediyal hipotalamusta sonlanmaktadır. Bu bölgeler beslenme alışkanlıklarının gerçekleştiği bölgelerdir. Besin kısıtlaması SCN'yi etkileyerek sirkadiyen saatleri düzenler. Beyinde SCN'de bulunan ve diğer çevresel sirkadiyen saatler besin kısıtlamasından etkilenmektedirler. DMH'de bulunan Per1/Per2'nin mRNA ekspresyonu besin kısıtlaması sonucunda değişmektedir.

1.7. Maternal Transfer

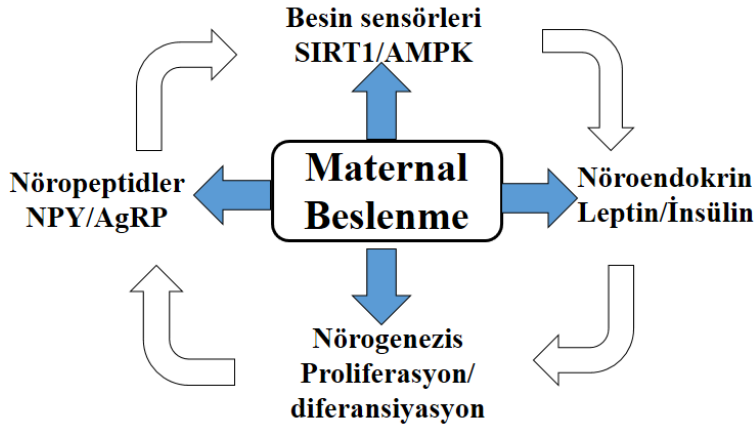
Anneden yavruya bilgi aktarımı olan maternal transfer, memelilerde; plasenta yoluyla, ağız sütüyle ya da laktasyon sürecinde verilen sütle anneden yavruya transfer edilmektedir (Lemke vd., 2004). Bazı hayvanlarda ise maternal faktörler kuşlarda, sürüngenlerde ve balıklarda olduğu gibi yavrulara yumurtlama yoluyla aktarılmaktadır (Grindstaff vd., 2003). Fotoperiyodik hayvanlarda, ışık bilgisi anneden yavruya maternal olarak aktarılan en önemli özelliklerden biridir. Fotoperiyot bilgisinin maternal olarak aktarıldığını göstermek için pineal bez ablasyonu yapılmış ve bunun sonucunda yavruya bilgi aktarımının engellendiği bildirilmiştir (Elliott ve Goldman, 1989).

Hamileliğin ilk gününden doğuma kadar leptin konsantrasyonu artmaktadır ve en yüksek seviyeye doğumun gerçekleştiği gün ulaşmaktadır. Doğumdan sonra leptin seviyesi emzirme dönemi boyunca azalmaktadır. Yapılan bir çalışmada en yüksek leptin seviyesi hamilelik döneminde beslenme diyeti uygulanmış olan ve emzirme döneminde normal beslenen annelerden doğan, erkek yavrularda belirlenmiştir (Zambrano vd., 2006). Laktasyon süresince besin kısıtlaması uygulanan yavruların vücut ağırlığının daha az olduğu belirlenmiştir (Zambrano vd., 2006). Çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre laktasyon sürecinin maternal bilginin aktarılmasında hamilelik sürecine göre daha çok etkili olduğudur.

Maternal beslenme veya yenidoğan beslenme çalışmaları, çeşitli hayvan modellerinde yapılmış, ancak iştahın nöroendokrin düzenleyicileri en iyi şekilde kemirgenlerde tanımlanmıştır (Ross ve Desai, 2014). Özellikle, gebelik döneminde protein kısıtlaması, yetersiz beslenme ve aşırı beslenme programı yavrularda iştah ve yağlanma ile sonuçlanmıştır. Sıçanlara gebelik sırasında hem maternal yetersiz beslenme hem de protein kısıtlaması yapılmış, yenidoğan yavruların düşük vücut ağırlığı olduğu görülmüştür. Normal olarak emzirildiğinde, yenidoğan yavruların hızlı bir büyüme yakalama ile hiperfaji ve yetişkin obezitesi sergilediği görülmüştür (Desai vd., 2005).

Maternal beslenmenin değişmesinden (yetersiz beslenme, düşük proteinli diyet, aşırı beslenme, yüksek yağlı diyet) kaynaklanan gebelik döneminde programlanmış iştah

mekanizmaları, yavru hiperfajisini etkileyen çok sayıda faktör içermektedir. Maternal beslenmedeki değişimler besin sensörlerini, nöroendokrin düzeylerini ve sinyalleşmeyi, nörojenez veya nöropeptid düzeylerini değiştirebilir. Bu yollar etkileşime girebilir ve bunun sonucunda iştahı etkileyebilir (Şekil 3).



Şekil 3. Hamilelik döneminde iştahın programlama mekanizmaları.

Değiştirilmiş maternal beslenme, iştah peptidi olan NPY'nin üretimini ve duyarlılığını artırarak veya tokluk peptidi POMC'nin üretimini ve duyarlılığını azaltarak yavrunun hipotalamik düzenleyici sistemi hiperfajiye doğru yönlendirir (Ross ve Desai., 2014). Hamilelik ve laktasyon sürecinde maternal diyet maruz kalma, yavruda NPY ve AgRP'yi arttırmanın yanı sıra POMC ve α -MSH'yi azaltmaktadır. Maternal olarak yetersiz beslenen yavrularda, beyin kesiti elektrofizyoloji teknikleri, hipotalamik ARC anoreksijenik nöronların NPY inhibisyonunun arttığını göstermektedir (Ross ve Desai, 2014).

1.8. Fotoperiyot ve Vücut Ağırlığı İlişkisi

Fotoperiyot, birçok türde özellikle; üreme, vücut ağırlığı ve enerji kullanımını düzenleyen en önemli faktördür. Fotoperiyodik türlerin vücut ağırlığına verilen yanıtlar o türün içinde bulunduğu mevsimsel şartları gösterir. Besin alımı ve vücut ağırlığı değişimleri türden türe farklılık göstermektedir. Bazı türlerde kış mevsiminde vücut

ağırlığı önemli derecede azalırken, kimi türlerde de vücut ağırlığı artmaktadır. Bazı hayvanlar ise kış mevsimi öncesinde enerji depolarını arttırarak mevsimsel bir adaptasyon gösterirler; praire sıçanı (*Microtus ochrogaster*), yer sincabı (*Spermophilus beldingi*) ve Suriye hamsteri (*Mesocricetus auratus*) gibi türler en iyi örnekleridir (Bartness ve Wade, 1984).

Bazı türlerde ise bu durum tam aksinedir ve kısa gün uzunluğunda vücut ağırlıklarını azaltırlar örneğin; çayır sıçanı (*Microtus pennsylvanicus*), geyik faresi (*Peromyscus maniculatus*) ve Sibiry hamsteri (*Phodopus sungorus*) gibi türlerde görülmektedir (Ruf vd., 1993). Enerji metabolizması gibi birçok önemli fizyolojik mekanizma fotoperiyotla uyarılma sonucu değişiklikler göstermektedir. Sibiry hamsterlerinde kısa fotoperiyot uzun fotoperiyoda göre vücut ağırlığında azalma olduğu görülmüştür (Mercer vd., 2000). Besin alımı ile ilişkili olan NPY, AgRP, POMC, CART, oreksin ve MCH'in genlerin uzun ve kısa fotoperiyot çalışmaları ile bu hipotalamik nöropeptitlerin mevsimsel cevaplarda az role sahip oldukları bildirilmiştir (Mercer vd., 2000).

Normal beslenen Sibiry hamsterlerinde AgRP'nin mRNA seviyesi kısa fotoperiyota göre uzun fotoperiyotta daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Ellis vd., 2008). NPY ve MCH mRNA seviyelerinin fotoperiyottan bağımsız olduğu görülmüştür (Mercer vd., 2000). Fareler üzerinde yapılan çalışmada, vücut ağırlığının düzenlenmesinde hipotalamik nöropeptidlerin rolleri mevsimsel olarak araştırılmıştır. Fotoperiyodun vücut ağırlığı, besin alımı, hipotalamik NPY ve AgRP gen ekspresyonunda rolü olduğu gösterilmiştir (Wanlong vd., 2017). Sibiry hamsterlerinde AgRP, NPY ve POMC gen ekspresyonları incelenmiş kısa fotoperiyotta POMC ve AgRP gen ekspresyonunu azalırken NPY üzerinde bir etkisi olmadığı görülmüştür (Mercer vd., 2000).

1.9. Suriye Hamsteri

Suriye hamsteri (*Mesocricetus auratus*) gün ışığına etkili bir şekilde cevap veren fotoperiyodik karakteri nedeniyle deneysel olarak tercih edilen model bir organizmadır.

Suriye hamsterlerinde, vücut ağırlığı ve yağ içeriği fotoperiyot tarafından kontrol edilir. Bu hayvanlarda vücut ağırlığındaki değişimler fotoperiyot tarafından kontrol edildiğinden, şişmanlık görülmemektedir. Ancak kısa fotoperiyot etkili obezite bu türlerde görülen önemli bir özelliktir (Bartness ve Wade, 1984).

Suriye hamsterleri, diyet ve metabolizma gibi insan fizyolojisine benzeyen birçok özelliğe sahiptir (Wang vd., 2016). Suriye hamsterleri, obeziteye yatkın türlerdir ve yüksek besin içerikli beslendiklerinde insülin direnci geliştirirler. Sıçan ve farelerin aksine bu hayvanlarda, yağ ve kolesterolden zengin beslendiklerinde hiperkolesterolemi ve hipertrigliseridemi geliştirebilirler (Kasim-Karakaş vd., 1996). Ayrıca, insanlara benzer kardiyovasküler ve hepatik sistemlere sahip olduğundan beslenmeye bağlı değişiklikleri incelemek için yararlı bir model olacağı düşünülmektedir (Bhathena vd., 2011).

İKİNCİ BÖLÜM

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Hipotalamus, gelişimi etkileyen enerji kullanımını ve homeostaziyi kontrol etmek için beslenme ile ilgili sinyalleri algılamada merkezi bir rol oynar (Blouet, and Schwartz 2010). Beslenme davranışı ve vücut ağırlığı, hipotalamik nöronlar olan Nöropeptid Y (NPY) ve agouti ile ilgili peptit (AgRP) tarafından düzenlenmektedir (Aponte vd., 2011). Memelilerdeki en güçlü oreksijenik peptit olan NPY, merkezi olarak uygulandığında gıda alımında ve vücut ağırlığında güçlü artışlara neden olur ve kronik uygulama sonunda obezite ile sonuçlanmaktadır (Vohra vd., 2022).

AgRP ve NPY, metabolik eksiklikleri sırasında iştah uyarıcı fonksiyonları oluşturan ilk oreksijenik peptit gruplarıdır. Besin yoksunluğu koşullarının, ARC'de NPY ve AgRP mRNA ifadesini arttırdığı ve yeniden besleme koşulları sağlandığında, mRNA ifadesini başlangıç değerlerine geri döndüğü bildirilmiştir (Takahashi ve Cone, 2005). NPY/AgRP nöronlarının ablasyonuna odaklanan ve yeme davranışındaki rollerini belirlemeyi amaçlayan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Deney hayvanlarında NPY/AgRP nöronlar ablasyonunun gıda alımında azalmaya yol açarken, AgRP/ NPY nöropeptitlerinin sürekli uyarımı gıda alımının artmasına neden olduğu bildirilmiştir (Aponte vd., 2011).

Farelerde, AgRP eksprese eden tüm nöronları yok etmek için difteri toksini (DT) kullanılmış ve açlıkla sonuçlanmıştır (Wu vd., 2008). Benzer şekilde, DT veya nörotoksik ataksin-3 ile ablasyona tabi tutulan NPY/AgRP nöronları, beslenme kontrolü için kritik olduğu çalışmalarla doğrulanmıştır (Tan vd., 2014). Bu nöronların diğer ablasyon çalışmaları da yetişkin farelerde açlığa yol açan gıda alımında bir azalma olduğunu göstermiştir (Krashes vd., 2011). AgRP ve NPY nöronlarının ablasyonu veya susturulması anoreksiya, hızlı kilo kaybı ve hatta açlıktan ölüme yol açabileceğinden, NPY ve AgRP nöronları hayatta kalmak için kritik öneme sahiptir (Krashes vd., 2011).

NPY/AgRP nöronlarının sürekli uyarılmasına odaklanan diğer çalışmalar, transgenik kaynaklı obez farelerde AgRP nöronal peptit ekspresyonunda önemli bir artış

göstermiştir (Ollmann ve Wilson, 1997). Benzer şekilde, merkezi olarak NPY ve AgRP uygulaması, besin arama besin istifleme ve besin alımını arttırdığı gösterilmiştir (Teubner vd., 2012). NPY/AgRP nöronlarının gelişimsel kaybı, aşırı besin alımına, enerji harcanmasının azalmasına veya bozulmuş glikoz dengesine neden olmaktadır. Bu nedenle, NPY/AgRP nöropeptitlerinin obezite gelişiminden sorumlu olduğunu ve obezite üzerinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Spesifik olarak, AgRP ve NPY üreten nöronlar, beslenme davranışları ile en yakın ve en güçlü ilişkiye sahip en temel nöronal popülasyonlardır (Cowley vd., 2001). AgRP ve NPY nöronları enerji dengesini düzenleyen önemli nöropeptidlerdir (Chen ve Knight, 2016). Erkek fareler üzerinde yapılan çalışmada, NPY eksikliği ve besin kısıtlaması yapılan gruplarda, besin kısıtlaması sırasında lipolizin arttığı, vücut ağırlıklarının ve yağ kütlelerinde hızlı bir azalma olduğu görülmüştür. NPY'nin yokluğu, NPY'nin varlığı olan farelere kıyasla beyaz yağ dokusunda belirgin şekilde termojenezi aktive ettiği ve negatif enerji dengesinin NPY ile kontrol edildiği ortaya konmuştur (Park vd., 2019).

Enerji metabolizmasında meydana gelen değişiklikler gün içerisindeki gen ekspresyon çalışmaları en çok kemirgenler (sıçanlar, fareler ve Sibirya hamsteri) üzerinde araştırılmıştır. Normal beslenme, gündüze kısıtlanmış ve geceye kısıtlanmış beslenme rejimlerinin gen anlatımları ile gün içerisindeki besin alımı ile ilişkili genlerin ekspresyonu farklılık gösterebilmektedir. Sıçanlarda yapılan çalışmada 4 saatlik gündüze kısıtlama yapılan grupta NPY'nin mRNA ekspresyonunun normal beslenen gruba göre bir değişim görülmemiştir. Geceye kısıtlama grubunda ise yüksek seviyede olduğu görülmüştür. Normal beslenen sıçanlarda, NPY'nin mRNA ekspresyonunun karanlık faz boyunca düşük seviyede kaldığı bildirilmiştir (Xu vd., 1999).

NPY, AgRP, POMC, CART, Oreksin, MCH, leptin ve leptin reseptörü genlerin, besin alımı ile ilişkisini ortaya koymak için normal beslenen farelerde gün içerisindeki mRNA ekspresyonları Real time PCR tekniği ile araştırılmıştır. Çalışmada AgRP mRNA ekspresyonu saat 06:00'da aydınlık faz başlangıcında pik yapmıştır, NPY'nin besin alımı ile ikincil derecede yani AgRP'den daha az mRNA ekspresyonunun olduğu görülmüştür. NPY'nin mRNA ekspresyonu karanlık fazın başlarında yüksek seviyede olduğu

görülmüştür. leptin ve leptin reseptör genlerin mRNA ekspresyonu karanlık periyotta besin alımı ile birlikte azaldığı görülmüştür (Stütz vd., 2007).

Erkek Suriye hamsterleri için 16L fotoperiyodunda farklı beslenme koşulları içeren gruplar oluşturulmuş ve hipotalamus dokularından, NPY ve AgRP genlerinin gün içerisinde anlatımları araştırılmıştır. Çalışmada karanlık fazda NPY ve AgRP mRNA ekspresyonu en yüksek seviyede iken karanlık fazın sonunda en düşük seviyede olduğu görülmüştür. Gündüze kısıtlama grubunda hamsterlerin besin tüketim miktarı değişmediği, vücut ağırlıklarının azaldığı bildirilmiştir. Serum leptin seviyesi karanlık fazda saat 02:00 yüksek olduğu görülmüştür. Geceye kısıtlama grubunda ise hamsterlerin besin tüketim miktarı *normal* gruba göre artmıştır ancak, vücut ağırlıklarında farklılık belirlenmemiştir. Serum leptin seviyesinde de farklılık görülmemiştir. Besinden 72 saat boyunca besin kısıtlaması uygulanan grupta ise vücut ağırlığının ve serum leptin seviyesinin azaldığı belirlenmiştir. NPY ve AgRP'nin mRNA ekspresyonun önemli derecede azaldığı görülmüştür. Çalışma sonucunda besinin Suriye hamsterlerinde kısıtlama koşullarındaki gen anlatımlarında önemli bir uyaran olduğu gösterilmiştir (Güneş, 2013).

Uzun ve kısa fotoperiyota yer alan Sibirya hamsterlerinde, besin alımı ile ilişkisi düşünülen; NPY/AgRP ve POMC/CART genlerin ekspresyonu günün sekiz farklı zamanında araştırılmıştır. Bu genlerden AgRP, POMC, CART genlerin ekspresyonu gün içerisinde önemli bir değişiklik görülmediği belirtilmiştir. Ancak AgRP, POMC, NPY genlerinin mRNA ekspresyonu uzun fotoperiyotta, kısa foto periyota göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. Serum leptin seviyelerinde ise gün içerisinde değişmediği ancak, uzun fotoperiyotta salınımın, kısa fotoperiyota göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. (Ellis vd., 2008).

Sıçanlarda yapılan çalışmada, POMC ve AgRP'nin, aydınlık ve karanlık fazlarda iki saatte bir mRNA ekspresyonu araştırılmıştır. Aydınlık fazda saat 10:00'da AgRP'nin mRNA ekspresyonu azalırken karanlık fazda saat 22:00'da en yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir. Ek olarak, saat 22:00'dan aydınlık faza kadar (iki saatte arayla) azaldığı ve karanlık fazda AgRP'nin mRNA ekspresyonunun aydınlık faza göre yüksek olduğu

gösterilmiştir. POMC'nin, mRNA ekspresyonu ise gündüz bir salınım göstermediği ancak, besin alımının gerçekleştiği karanlık fazda en yüksek düzeyde 18:00 ve 24:00 saatleri arasında olduğu bildirilmiştir (Lu vd., 2002).

Eothenomys Miletus'un vücut kütle regülasyonunda hipotalamik nöropeptit ekspresyonunun rolleri mevsimsel olarak araştırılmıştır. Vücut kütlesi, vücut yağ oranı, besin alımı ve serum leptin seviyesi mevsimsel değişkenlik göstermiştir. Hipotalamik NPY ve AgRP seviyelerinin ekspresyonu mevsimsel farklılıklar gösterirken, POMC ve CART ekspresyonu mevsimler arasındaki farklar anlamlı değildir. Fotoperiyodun NPY ve AgRP üzerinde etkisi görülürken, POMC ve CART üzerinde önemli bir etkisi olmamıştır. Leptin, *E. miletus*'da hipotalamik nöropeptid ekspresyonu üzerine etki ederek vücut kütle ve enerji metabolizmasını düzenlemede önemli bir rol oynayabileceği sonucuna varılmıştır (Wanlong vd., 2017).

Yapılan başka bir çalışmada uzun süreli yüksek yağlı besin (HFD) tüketimi, hipotalamusun ARC'deki AgRP nöronlarında sürekli aktivasyona ve leptin direncine yol açtığı HFD'nin AgRP nöronal uyarılabilirliği üzerindeki akut etkileri gösterilmiş ve diyet kompozisyonu için kritik rolü vurgulanmıştır. Uzun süreli HFD farelerdeki önceki bulgularına paralel olarak, kısa süreli HFD beslemesinin bile ARC/AgRP nöronlarının sürekli aktivasyonuna yol açtığını tespit edilmiştir. Diyet bileşimi, kalori alımı (CD) ve vücut ağırlığı arasındaki farkı ayırt etmek için, fareler HFD ve CD'nin akut ve uzun süreli etkilerini AgRP nöronal anlatımı karşılaştırılmıştır. Farelerdeki HFD tüketiminin, kilo alımı ve kalori alımı kontrollerine göre AgRP nöronunun artmıştır. AgRP nöronları için diyet bileşiminin kalori alımından veya vücut ağırlığından daha önemli olabileceğini düşündürmektedir (Wei vd., 2015).

Sibirya hamsterlerinde kısa fotoperiyotun uzun fotoperiyoda göre % 30 vücut ağırlığını azalttığı ve besin yokluğunda %10 oranında bir düşüşe neden olduğu gösterilmiştir. Hipotalamik ARC'de yer alan AgRP, NPY ve POMC gen ekspresyonları incelendiğinde kısa fotoperiyot POMC ve AgRP gen ekspresyonunu azaltmıştır. Besin yokluğunun ise AgRP gen ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Fotoperiyodun NPY

üzerinde bir etkisi olduğu görülmezken besin yoksunluğunda gen ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Mercer vd., 2000).

Sıçanlara, %50 besin kısıtlaması uygulanmış ve 30 gün boyunca kısıtlama devam ettirilmiştir. Kısıtlama sonucunda hipotalamus dokusunda leptin ve NPY mRNA ekspresyonu araştırılmıştır. NPY'nin mRNA ekspresyonu, normal beslenme grubuna oranla yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir. Ancak NPY'nin mRNA ekspresyonu tekrar iki gün süre ile geri besleme ile azaldığı görülmüştür. Leptinin mRNA ekspresyonu normal beslenme grubuna göre azalmıştır ve iki gün süre ile tekrar normal beslenme ile leptinin mRNA ekspresyonu değişmediği ancak yağ dokuda tekrar arttığı belirlenmiştir (Sucajty-Szulc vd., 2009).

Gelişimin çok erken dönemlerinde beslenmedeki değişiklikler yavruların, gelişimi üzerinde uzun vadeli olumsuz etkilere neden olmaktadır (Blouet ve Schwartz 2010). Hamilelik boyunca annenin beslenme ortamında meydana gelen değişiklikler, fetüs için daha sonraki yaşamda obezite ile ilişkisi olduğu bildirilmiştir (Clarke vd., 2021). Doğum öncesi, hamilelik dönemi ve laktasyon sürecindeki maternal faktörler (beslenme, fotoperiyot, sıcaklık vb.) bebeğin yaşam kalitesini etkilemektedir. Hamilelik öncesi ve hamilelik döneminde annenin kötü beslenmesi hem embriyo gelişimi ve büyümesini hem de geç gebelik döneminde hipotalamo-pituiter-adrenal aksın hiperaktivasyonuna yol açtığı ve bunun sonucunda da erişkin yaşta obezite, hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıklar ve böbrek hastalıkları gelişimine neden olduğu belirlenmiştir (Bouret, 2009).

Önceki çalışmalar, deneysel diyetlerin kilo alımıyla ilgili mekanizmalar üzerindeki etkilerini göstermiştir (Choi, 2018). Özellikle, rahim içi beslenme ortamının metabolizmayı değiştirebildiği, yavruların fizyolojik ve davranışsal süreçlerini etkileyebildiğini göstermiştir (Koletzko vd., 2019). Diyetin bileşiminin yanı sıra tür, cinsiyet, beslenme manipülasyonunun periyodu ve zamanı gibi çeşitli faktörler fetal programlamayı etkileyebilir. Bununla birlikte, yaşamın erken döneminde aşırı yağ ve şeker tüketimi, obezite riskini arttırmaktadır (da Silva vd., 2022). Maternal diyetlere yanıt olarak, yavrular artan bir açlık/tokluk gen ekspresyonu sergilemektedir.

Maternal olarak yetersiz beslenen yavrularda, NPY'nin anoreksijenik nöronların inhibisyonunu arttırdığını göstermektedir. (Chen ve Knight, 2016). Sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, anne beslenmesinin değiştirilmesi sonucunda fetüslerde ve yetişkin yavrularda hipotalamik NPY'nin mRNA ekspresyonu arttığı gösterilmiştir (Ross ve Desai, 2014). Maternal beslenme durumu yavrunun besin alımını düzenleyen hipotalamik nöropeptitleri etkileyerek NYP ve AgRP artışına bağlı olarak hiperfajiye yol açtığı düşünülmektedir.

Kemirgenlerde, hamilelik ve emzirme sırasında maternal yüksek yağlı beslenmenin, daha fazla vücut ağırlığına ve gıda tüketimi ile sonuçlanmıştır (da Silva vd., 2022). Maternal yüksek yağlı beslenmenin yavruda, aynı zamanda NPY, AgRP ve POMC ekspresyonundaki değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (Choi, 2018). Hamilelik ve laktasyon sürecinde maternal diyete maruz kalma ise yavruda NPY ve AgRP'yi arttırmanın yanı sıra POMC ve α -MSH'yi azaltmaktadır. Maternal olarak yetersiz beslenen yavrularda, beyin kesiti elektrofizyoloji teknikleri, hipotalamik ARC anoreksijenik nöronların NPY inhibisyonunun arttığını göstermektedir (Ross ve Desai, 2014).

Maternal obezite çalışmalarında, fetal ARC gelişiminin, doğumda programlanmış hiperfaji ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Stuart ve Panico, 2016). Araştırmalar, maternal obezitenin yavruların oreksijenik dürtüsünü arttırdığını, yavruda artan gıda alımı ve kilo alımı, oreksijenik ile anoreksijenik nöronal sayı oranının arttığını göstermektedir. Obez annelerin yenidoğanlarında, NPY ve AgRP'nin hipotalamik ekspresyonu (mRNA ve protein) artarken POMC'ninki azalır (Morris ve Chen, 2009). Önemli olarak, maternal obezite, embriyonik hipotalamusta nöroprogenitör hücre proliferasyonunun uyarılması ve oreksijenik nöronlarda bir artış ile yavruların nörojenezini de etkiler (Desai ve Ross, 2020).

Fetal ARC gelişimi üzerindeki doğum öncesi beslenme etkisine benzer şekilde, ARC'nin doğum sonrası aşırı beslenme ile yeniden değiştirilebileceğini gösterilmiştir (McNay vd., 2012). İnsan çalışmaları, doğum sonrası beslenme ve erken büyüme oranlarının yetişkin obezitesi üzerinde belirgin bir etkisi olduğunu göstermiştir (Desai ve Ross, 2020). Doğum sonrası ARC gelişimi veya düzenlemesi benzer şekilde hayvan

çalışmalarında da gösterilmiş, emzirme döneminde maternal obeziteye maruz kalmaya devam eden obez annelerin yenidoğanlarının, yetişkinler olarak ekspresyon seviyelerinde ve ARC nöronal fenotipinde kalıcı değişiklik gösterdiğini göstermektedir. Özellikle, bu yavrular, yalnızca hamilelik veya emzirme dönemlerinde maruz kalan yavrularla karşılaştırıldığında, daha fazla yağlanma ile gıda alımını önemli ölçüde artırmıştır (Rajia vd., 2013).

Hem maternal aşırı beslenmenin hem de maternal yetersiz beslenmenin yavrularda metabolik bozukluk risklerini artırdığı literatürde gösterilmektedir. Maternal faktörler nöronal gelişimi etkileyebilir ve yavrunun yaşamı boyunca, beslenme ile ilişkili nöropeptit genlerin anlatımını farklı bir şekilde programlayabilir. Bu çalışmanın amacı, maternal beslenmenin yanı sıra fotoperiyot bilgisinde yavrular üzerindeki rolü ve beslenme ile ilişkili hipotalamik nöropeptitler olan NPY/AgRP'nin gen anlatımı üzerine etkisini belirlemektir. Besin diyetlerinin içeriği kadar besin alımının zamanında canlılar için önemlidir. Sadece gündüze kısıtlanmış ya da sadece geceye kısıtlanmış besinin, yavruların gelişiminin erken dönemlerinden itibaren 30. güne kadar nöropeptit genlerin anlatımında nasıl değişim gösterdiği bu tez çalışması ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Hayvan Materyali

Tez çalışmasında yetişkin dişi Suriye hamsterleri (*Mesocricetus auratus*) kullanılmıştır. Suriye hamsterleri, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi (ÇOMÜDAM)'nden temin edilmiştir. Deneyde ağırlıkları birbirlerine en yakın (100-110 gr) en az 3 aylık Suriye hamsterleri kullanılmıştır. Hamsterler plastik kafesler (16×31×42cm) içinde talaş kullanılarak ve kafeslere tek tek ya da en fazla 3 tane olacak şekilde barındırılmıştır. Besin, su ihtiyacı ve sıcaklık (oda sıcaklığı 22 ± 2 °C) hamsterlere uygun olacak şekilde standardize edilmiştir. Hamsterler, fotoperiyot odalarının aydınlık periyodunda 200 lüks beyaz florasan ışık altında bakılmıştır Bu tez çalışması Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulundan alınan 2019/ 07-03 karar numarası izni ile gerçekleştirilmiştir.

3.2. Cihazlar ve Diğer Gereçler

- Real Time PCR cihazı (Applied Biosystems™ 7500 Fast Dx-Thermo Fisher Scientific, USA)
- Mikrolaka okuyucu (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific™, Finlandiya)
- Stereodiseksiyon mikroskobu (Stemi DV 4 SPOT-ZEISS, USA)
- Homojenizatör (Retsch MM400; Almanya)
- Vorteks (IKA, Germany)
- Santrifüj (DAIHAN Scientific, Model CF-10; Seul, Kore)
- Soğutmalı santrifüj (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Mikropipet seti (Gilson, USA)
- Etüv (Binder, USA)

- Hassas terazi (Sartorius Entris®, Germany)
- -20°C buzdolabı (Siemens, Germany)

3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmada (16L) uzun fotoperiyotta bulunan yetişkin dişi Suriye hamsterleri (*Mesocricetus auratus*) kullanılmıştır. Çalışma uzun (14L) ve kısa (10L) fotoperiyot olmak üzere iki farklı fotoperiyotta gerçekleştirilmiştir. Toplamda 144 adet yavru hayvan (cinsiyetlerine bakılmaksızın) kullanılmıştır.

3.3.1. Uzun Fotoperiyota Ait Gruplar

Uzun fotoperiyot 14L (14 saat ışık; ışıklar saat 07:00'de açılıp, saat 21:00'da kapanmıştır) altındaki yetişkin dişi hamsterler kendi içinde 3 farklı beslenme koşulu uygulanmak üzere 3 alt gruba ayrılmıştır (Tablo 2). Bu beslenme koşulları; normal beslenme (hamsterler günün her saatinde besine ulaşmıştır), sadece gündüze sınırlandırılmış beslenme (gündüze kısıtlama grubunda hayvanlar sadece aydınlık fazda beslendi) ve sadece geceye sınırlandırılmış beslenme (geceye kısıtlama grubunda hayvanlar sadece karanlık fazda beslendi) olacak şekilde oluşturulmuştur. Bu fotoperiyotta 15 adet yetişkin dişi hayvan yavru eldesi için kullanılmıştır. Dişiler deneye başlamadan önce erkek yetişkin hamsterler ile çiftleştirildi ve hamile kalan (vajinal smear yöntemi ile hamile kaldığı anlaşılan) dişi hayvanlar tek olarak kafeslerde tutulmuştur. Hamilelikleri süresince hayvanlara yukarıda ki 3 beslenme programı uygulanmıştır. Doğum sonrası annelerde bu beslenme programı devam edecek olup yavru hayvanlar cinsiyetlerine bakılmaksızın doğum sonrası 10. (24 hamster), 20. (24 hamster) ve 30. (24 hamster) günde günün öğle saatinde (12:00 – 13:00) dekapite edilmiştir. Beyin dokusundan hipotalamik bölge NPY ve AgRP nöropeptidlerinin protein ve ekspresyonunu belirlemek için alınıp hızlı bir şekilde sıvı azotta dondurulmuştur. ELISA ve RT-PCR analizlerine kadar -84 °C'de saklandı. Dişi yetişkin hamsterler laktasyon süresi bitiminde normal beslenme düzenine geçirilerek, koloniye geri kazandırılmıştır.

Tablo 2.

Uzun fotoperiyota ait gruplar

Deney Grupları	Alt Gruplar	Kullanılan hayvan sayısı
Normal Beslenme	10. gün	n=8
	20. gün	n=8
	30. gün	n=8
Geceye Kısıtlama	10. gün	n=8
	20. gün	n=8
	30. gün	n=8
Gündüze Kısıtlama	10. gün	n=8
	20. gün	n=8
	30. gün	n=8

3.3.2. Kısa Fotoperiyota Ait Gruplar

Kısa fotoperiyot 10L (10 saat ışık; ışıklar saat 11:00'de açılıp, saat 21:00'da kapanmıştır) altındaki yetişkin dişi hamsterler (n=15) yavru eldesi için kullanılmıştır. Dişiler deneye başlamadan önce yetişkin erkek hamsterlar ile çiftleştirilmiş ve hamile kalan (vajinal smear yöntemi ile hamile kaldığı anlaşılan) dişi hayvanlar tek olarak kafeslere yerleştirilmiştir. Dişi hamsterlere hamilelikleri ve laktasyon süresince üç farklı beslenme programı uygulanmıştır (Tablo 3). Bu beslenme koşulları; normal beslenme, geceye kısıtlama ve gündüze kısıtlama olacak şekilde randomize olarak gerçekleştirilmiştir.

Deney düzeneği uzun fotoperiyottaki gruplara benzer şekilde yürütülecek olup bu grupta da toplamda 72 yavru hayvan kullanılmıştır. 15 adet dişi yetişkin hamsterlar çiftleştirme öncesi kısa fotoperiyoda uyum sağlamaları için bir hafta öncesinden kısa (10L) fotoperiyot odalarına yerleştirilmiştir. Her iki grupta da yetişkin dişi hamsterlar deneyde sadece yavru hayvan eldesi için kullanılmış ve deney sonunda normal beslenme düzenine geçirilerek koloniye geri kazandırılmıştır.

Tablo 3

Kısa fotoperiyota ait gruplar

Deney Grupları	Alt Gruplar	Kullanılan hayvan sayısı
Normal Beslenme	10. gün	n=8
	20. gün	n=8
	30. gün	n=8
Geceye Kısıtlama	10. gün	n=8
	20. gün	n=8
	30. gün	n=8
Gündüze Kısıtlama	10. gün	n=8
	20. gün	n=8
	30. gün	n=8

3.4. Besin Tüketimi

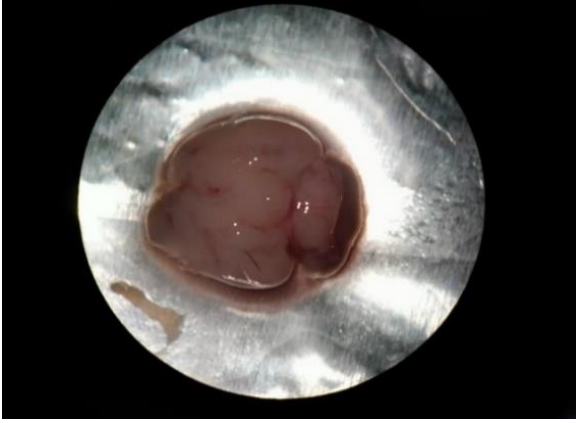
Tüm gruplardaki yavrular laktasyon süresinden sonra günlük olarak bilinen miktarda (~50 g) besine erişimleri sağlanmıştır. Uzun ve kısa fotoperiyotta ait gruplarda geceye kısıtlama grubunda ışıklar kapanmadan önce yiyecekler kafeslere yerleştirilmiştir ve ışıklar açıldıktan hemen sonra kalan besinler tartılmıştır. Gündüze kısıtlama grubunda ışıklar açıldıktan hemen sonra yiyecekler kafeslere yerleştirilmiştir ve ışıklar kapanmadan önce kalan besinler tartılmıştır. Normal beslenme grubunda ise hergün aynı saatte yiyecekler kafeslere yerleştirilmiştir ve ertesi gün aynı saatte kalan besinler tartılmıştır. Besinler tartılırken kafes içerisine düşen besin parçaları ve yavruların ağızlarında sakladıkları yiyecek parçaları da toplanarak tartılmıştır.

3.5. Vücut Ağırlığı Ölçümü

Yavruların vücut ağırlıkları, hipotalmus dokuları alınmadan hemen öncesinde (10. 20. ve 30. gün) ölçülmüştür. Hamster yavruları tek tek dijital tartıya yerleştirilmeden önce ağızlarındaki yiyecek parçaları (laktasyon sürecindekiler hariç) kontrol edilmiştir. Tüm ölçümler saat 12.00-13.00 arasında gerçekleştirilmiştir.

3.5. Doku Örneklerinin Alınması

Dekapitasyon sonrası alınan beyin bölgesi, dokunun canlılığının devam ettirilmesi amacıyla % 0,9'luk NaCl çözeltisi içerisinde alınarak stereodiseksiyon mikroskobu altında mikrodiseksiyon makası ile hipotalamus bölgesi çıkarılmıştır (Şekil 4). Alınan her bir doku örneği mikrosantrifüj içine konularak hemen sıvı azot içerisinde dondurulmuştur. Doku örnekleri, RNA ve protein izolasyonuna kadar -80°C'de saklanmıştır. Doku örneklerinin alınması sırasında kullanılan cerrahi materyaller, % 70'lik alkol ile yüzey sterilizasyonu yapıldı ve solüsyonlar (NaCl, saf su) için otoklav ile 180°C'de 20 dakika süreyle steril edilmiştir.



Şekil 4. Stereodiseksiyon mikroskobu altında *Mesocricetus auratus* beyin görüntüsü

3.6. Toplam RNA İzolasyonu

Alınan hipotalamus örnekleri -80 °C'den çıkarılarak yüksek kalitede Toplam RNA ekstraksiyonu sağlamak için Trizol metodu uygulanmıştır (Rio ve ark, 2010). Trizol, içerisindeki fenol ve guanidintiyosiyanat bileşenleri sayesinde yüksek kalitede toplam RNA elde edilmesini sağlamaktadır. Trizolün reaksiyondaki görevi, homojenizasyon sırasındaki fiziksel ve kimyasal parçalanmayı sağlamak ve RNA bütünlüğünün korunması için işlem sırasında numunedeki nükleazları denatüre etmektir.

- Protokole göre her örnekten 50 mg doku alınarak içerisine 1 mL TRIzol™ Reaktif (Sigma-Aldrich, USA) eklenerek sonrasında soğuk şartlar altında homojenizatör cihazında 4.0 hızda 20 sn de homojenize edilmiştir. Süspansiyon oda sıcaklığında 5 dk bekletilerek liziz ve faz ayırımının gerçekleşmesi sağlanmıştır.
- Hazırlanmış olan lizat 12000 G hızda 10 dk ve ardından +4 ° C'de 5 dakika santrifüj uygulanmıştır, elde edilen süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine 200 µL kloroform eklenerek karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 2 dk bekletildikten sonra 12000 G hızda 10 dk +4 °C sıcaklıkta santrifüj işlemi uygulanmıştır.
- Elde edilen süpernatant mikrosantrifüj tüpe alınarak içerisine 0,5 mL isopropanol eklenmiştir. Süspansiyon karıştırılarak 10 dk oda sıcaklığında bekletildi ve sonrasında 12,000 G hızda +4°C' de 10 dk santrifüj işlemi uygulanmıştır.
- Süpernatant kısmı atıldı ve elde edilen nükleik asit pelleti 1 mL %75 etanol ile 7500 G hızda 5 dk +4°C sıcaklıkta tekrar santrifüj yapılarak yıkanmıştır. Üst faz mikrosantrifüj tüpünden uzaklaştırıldı ve RNA pelleti kuruyana denk (15-20 dk) oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Kuruyan pellet üzerine 300 µL nükleaz-free elution bufer eklenerek pellet süspansiyon edilmiştir. Dokulara ait toplam RNA'lar -80 °C'de saklanmıştır.

3.7. cDNA sentezi

Hipotalamus doku örneklerinden elde edilen Toplam RNA'ların her birinin konsantrasyonu eşitlendikten sonra High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo-Fisher) ile protokole uygun olarak cDNA sentez işlemi yapılmıştır. RNA örnekleri, önce buz üzerinde çözündürüldükten sonra örnekler, Tablo 4'de belirtildiği gibi reaksiyon karışımları hazırlanmıştır. Toplam hacim 20 µL olacak şekilde cDNA sentezi için, reaksiyon hazırlandıktan sonra Tablo 5'te belirtilen miktarlarda PCR termal cykler cihazında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA ürünleri -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 4.

cDNA sentezinin hazırlanışı

Komponentler	Miktar (μl)
2X RT Tampon	8
20X RT Enzim Miks	1
Oligo(dT) (10 μ M)	1
Random Hexamer(10 μ M)	1
Toplam RNA	5
Nükleaz içermeyen su (H ₂ O)	4
Toplam	20

Tablo 5.

cDNA sentezi reaksiyon koşulları

	1. Adım	2. Adım	3. Adım	4. Adım
Sıcaklık(°C)	25	37	95	4
Zaman (dk)	10	60	5	25

3.8. RT-qPCR (Reverse Transkriptase-Quantitative Polymerase Chain Reaction) Reaksiyonu

Gen ekspresyonu çalışmalarında RT-qPCR teknolojisi en çok tercih edilen teknolojidir. Gerçek zamanlı kantitatif PCR olarak da adlandırılan bu teknoloji ile istenilen hedef dokudaki nükleik asitlerin miktarları belirlenebilmektedir. RT-qPCR'da elde edilen nükleik asit miktarı, reaksiyon sırasında meydana gelen ürün miktarıyla orantılı olarak artmaktadır. Elde edilen ürünün tespiti için kullanılan propların veya floresan boyaların verdiği sinyalin izlenmesiyle ürün miktarı gerçek zamanlı olarak belirlenebilmektedir. En çok tercih edilen yöntemlerden biri olan SYBR-Green ile yapılan yöntemdir. SYBR-Green floresan boya içeren kitlerin çift zincirli DNA'ya bağlanması ile hücredeki hedef RNA miktarı belirlenebilmektedir.

Çalışmada kullanılan NPY, AgRP ve ACTB genler için primer tasarımları, Primer 3Plus programı (Biomers, Almanya) ile yapılmıştır ve Tablo 6'da verilmiştir. Deney uygulamalarında ACTB gen bölgesi (housekeeping gen) normalizatör olarak kullanılmıştır.

Tablo 6

Hedef ve kontrol genlerin primer dizileri

Genler	Primer	Dizi(5'→3')	Uzunluk	Tm°C	Accession no
NPY	Forward	AGAACAAGGCTTGAAGA	17 bp	59°C	XM_005087180
	Reverse	CAGGATGAGACGAGATG	17 bp		
AGRP	Forward	AATTCCCAGGTCTAAGTC	18 bp	59°C	XM_005076290
	Reverse	GATTCTGTGGATCTAGCA	18 bp		
ACTB	Forward	TGAAGATCAAGATCATTG	18 bp	57°C	NM_001281595
	Reverse	CTCATCGTACTCCTGCTT	18 bp		

Accession no: NCBI Genbank Erişim Numarası

3.9. RT-qPCR Analizi

Çalışma kapsamında gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için BrightGreen qPCR Master Mix (ABM, Canada) kullanılarak her bir örnek için Tablo 7'de belirtilen reaksiyon karışımları hazırlanmıştır. Thermocycler prosedürü Tablo 8'e göre ayarlanarak Real Time PCR cihazı üzerinde kantatif analizi yapılarak NPY, AgRP ve ACTB genlerinin ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. cDNA örnekleri 2'şer tekrarlı olarak çalışılmıştır.

Tablo 7

Sybergreen reaksiyonu hazırlanışı

Komponentler	Miktar (μL)
BrightGreen qPCR MasterMix (2X)	10
Primer F (10 mM)	0,8
Primer R (10 mM)	0,8
cDNA	2
Nükleaz içermeyen H ₂ O	6,4
Toplam	20

Tablo 8

Sybergreen reaksiyonu RT-PCR koşulları

PCR Aşaması	İşlem	Sıcaklık/Derece	Tekrar
İlk Denatürasyon	Denatürasyon	95°C- 10 dk	1
PCR Aplikasyon	Denatürasyon	95°C-5 sn	40
	Bağlanma	57 °C - 30 sn	
	Uzama	72 °C - 60 sn	
Erime Eğrisi	Denatürasyon	95°C- 5 sn	1
	Bağlanma	65°C- 1 dk	
Final	Soğutma	40 °C 30 sn	1

3.10. Toplam Protein İzolasyonu

- Toplam RNA ekstraksiyonu sonrasında mikrosantrifüj tüplerinin alt kısmında organik fazın üzerine 300 μL %100'lük etanol eklenerek süspansiyon 3 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra +4 °C'de 2000 G X 5 dk santrifuj edilmiştir.
- Elde edilen süpernatanttan 500 μL mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak üzerine 1,5 mL isoproponol eklenmiştir. Süspansiyon 10 dk oda sıcaklığına bekletildikten sonra +4 °C'de 12000 G X 10 dk santrifuj edilmiştir.

- Süpernatant mikrosantrifuj tüpünden atılarak üzerine 2 mL Wash Buffer (0,3 M 0.3 M Guanidine hydrochloride 95% ethanol) eklenerek 20 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında süspansiyon +4 °C’de 7500 G X 5 dk santrifuj yapılarak süpernatant atılmıştır.
- Pellet üzerine 2 mL wash buffer eklenerek 20 dk inkübasyon sonrası +4 °C’de 7500 G X 5 dk santrifuj yapılarak sonrasında süpernatant atılmıştır.
- Yıkama işlemi sonrasında pellet üzerine %100 Etanol eklenerek vorteks yapılarak 20 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Süspansiyon +4 °C’de 7500 G X 5 dk santrifuj edilerek süpernatat atıldı ve pellet 10 dk oda sıcaklığında kurutulmuştur.
- Protein numuneleri uygun çözücüde çözdürüldü ve analize kadar -20 °C’de saklanmıştır.

3.11. Toplam Protein Miktarı Ölçümü

Toplam protein miktarı tayini Bradford yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Bradford, 1976). Proteinlerin Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasına bağlanması sonucunda meydana gelen renkli çözeltilerin 595 nm’de absorbansının ölçülmesi ile toplam protein analizi gerçekleştirilmiştir (Tablo 9).

Tablo 9

Protein tayini için standart stok çözeltilerin hazırlanması

	Kör	St1	St2	St3	St4	St5	Örnek
Albumin (%10)	–	4µL	8 µL	12 µL	16 µL	20 µL	–
Distile su	160 µL	156 µL	152 µL	148 µL	144 µL	140 µL	155 µL
Doku Homojenatı	–	–	–	–	–	–	5µL
Bradford Reaktifi	40 µL	40 µL	40 µL	40 µL	40 µL	40 µL	40 µL

3.12. ELISA Testi

Elisa yöntemi kullanılmadan önce protein miktarları eşitlenmiştir. Kitler önce %100, %50, %20 ve %10 dilüsyon oranlarında test edilmiştir. Standartlara göre en uygun absorbans veren dilüsyon katsayısı olan %20 kullanılmıştır. NPY ve AgRP gen spesifik elisa kitleri (Bioassay Technology Laboratory Kit) kullanılarak, aşağıdaki gibi protokole uygun şekilde hazırlanmıştır. Protein standartları kit içeriğinde hazır olarak verilmiştir.

- Örnekler ve solüsyonlar kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilmiştir. Her bir gene ait 50 µL standart 480, 240, 120, 60 ve 30 ng olacak şekilde kuyucuklara konulmuştur.
- Örnekler 40 µL olacak şekilde kuyucuklara dağıtıldı ve sonrasında 10 µL ikincil antikor eklenmiştir.
- Tüm kuyucuklara 50 µL streptavidin-HRP eklenerek ardından bir seal yardımıyla kapatılan well-plate 37 °C de 60 dk inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonunda wash buffer ile 5 kez yıkama yapılmıştır.
- Yıkama sonrası 50 µL solüsyon A ve ardından Solüsyon B eklenerek 37 °C de karanlık ortamda inkübe edilmiştir.
- Son olarak 50 µL stop solüsyonu eklenerek 10 dk inkübe edilmiştir.
- Tüm ölçümler 450 nm de spektrofotometre (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific™, Finlandiya) cihazı ile yapılmıştır.
- Elde edilen veriler GraphPad Prism programı yardımıyla hesaplanmış olup protein değerleri tesbit edilmiştir.

3.13. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler IBM SPSS Statistic 21 paket programıyla gerçekleştirilmiştir. Vücut ağırlığı, besin tüketimi ve NPY/AGRP genlerin mRNA ekspresyonu ve protein miktarının hesaplanmasıyla elde edilen verilerin sonuçları grup ortalamalarına karşı two-way ANOVA kullanılmıştır. Gruplar arası farklılıkların belirlenmesi için Post-Hoc çoklu karşılaştırma testi Duncan kullanılmıştır. Gruplar arası anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ ve

$p < 0.001$ olarak belirlenmiştir. Grafikler SigmaPlot 14.0 programı ile hazırlanmıştır. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak sunuldu.



DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1.Gen Ekspresyonu

4.1.1.Toplam RNA izolasyonu

Hipotalamus örneklerinden ilk olarak Trizol yöntemi ile RNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilmiş RNA örnekleri, toplam RNA konsantrasyonunu belirlemek için, örnekler Beer-Lambert formülizasyonundan ($Abs_{260} \times 40 \times (10/0,51)$) yararlanılarak yapılmıştır. Elde edilen RNA'ların konsantrasyonları ve saflıkları spektrofotometre (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific™, Finlandiya) ile belirlendi ve ölçülen konsantrasyon değerleri Tablo 10'da verilmiştir. Toplam RNA konsantrasyonu az miktarlarda olan grupların kalan dokularından tekrar RNA izolasyonu işlemi gerçekleştirilmiştir.

Tablo 10

Deney gruplarının toplam RNA miktarları

Deney Grupları	Alt Gruplar	Uzun fotoperiyot gruplarının toplam RNA($ng/\mu L$) miktarları	Kısa fotoperiyot gruplarının toplam RNA($ng/\mu L$) miktarları
Normal Beslenme	10. gün	596,75± 26,9	1078,03±15,2
	20. gün	704,01 ±16,7	902,50 ±16,3
	30. gün	820,25 ± 20,4	920,01 ±19,8
Geceye Kısıtlama	10. gün	801,75 ±23,5	987,75 ±24,2
	20. gün	757,50 ±22,8	971,25 ±25,6
	30. gün	582,25 ±18,9	591,75 ±20,2
Gündüze Kısıtlama	10. gün	652,75 ±13,4	970,75 ±16,2
	20. gün	715,75 ±12,7	1.161,0±28,9
	30. gün	733,50±14,1	951,50 ±18,5

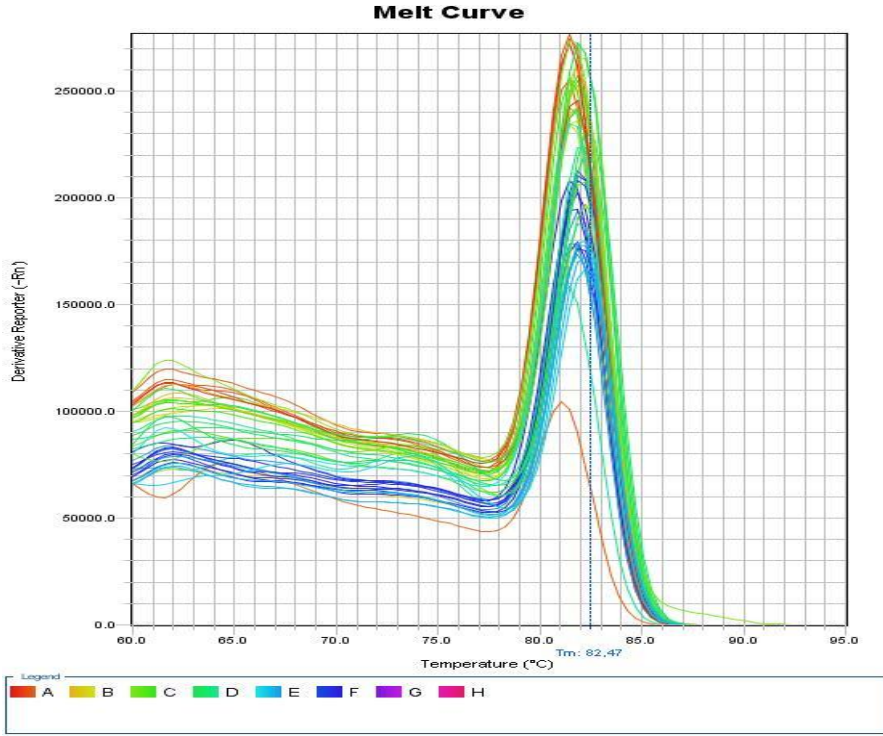
4.1.2. cDNA Sentezi ve Real Time PCR

Toplam RNA konsantrasyonu cDNA elde etmede referans olarak kullanılmıştır. cDNA sentezi yapılmadan önce her bir örnekten alınan RNA miktarları eşitlenmiştir. Elde edilen tüm toplam RNA' lardan 1 mL'de 100 ng olacak şekilde dilüsyonlar yapılarak cDNA sentezi yapılmıştır. cDNA sentezinin ardından Real time PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

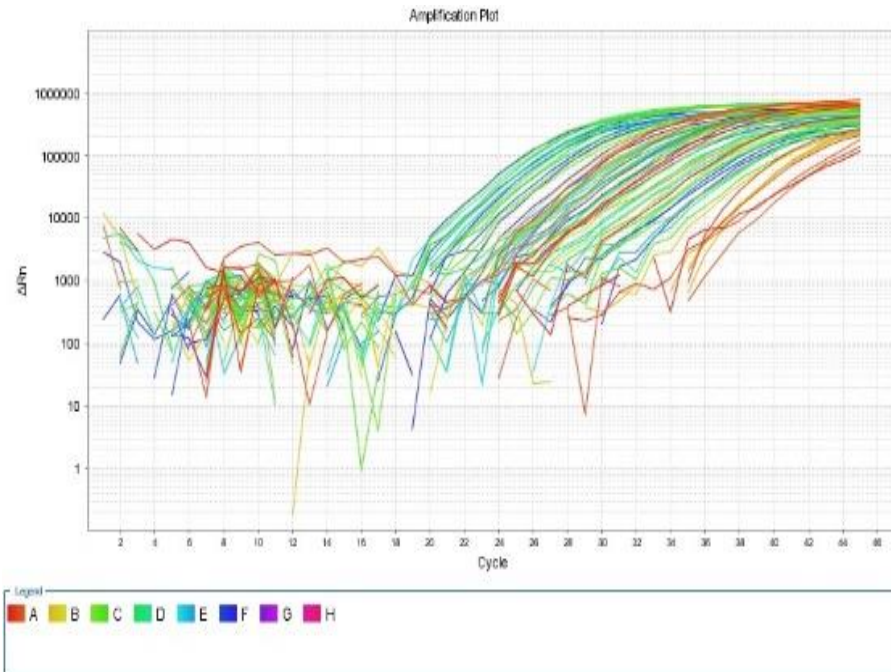
Real time PCR reaksiyonları 2'şer tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Deney uygulamalarında ACTB gen bölgesi (housekeeping gen) normalizatör olarak kullanıldı. Deney ve kontrol gruplarına ait NPY ve AgRP'nin mRNA ifadeleri ayrı ayrı hesaplanmıştır. NPY ve AgRP ortalama Ct değerinden, ACTB ortalama Ct değeri çıkarılarak ayrı ayrı deney ve kontrol gruplarının ΔCt (Delta Ct) değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen kontrol grubu ΔCt değerinden deney grubu ΔCt değeri çıkarılarak $\Delta\Delta Ct$ değeri hesaplanmıştır. Bu değer $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne göre deney gruplarının NPY ve AgRP ekspresyonun kontrol grubuna kıyasla kaç kez artmış ya da azalmış olduğu relatif olarak hesaplanmıştır.

4.1.3. Çalışmada Kullanılan Genlerin Erime Eğrisi ve Çoğaltma Görüntüleri

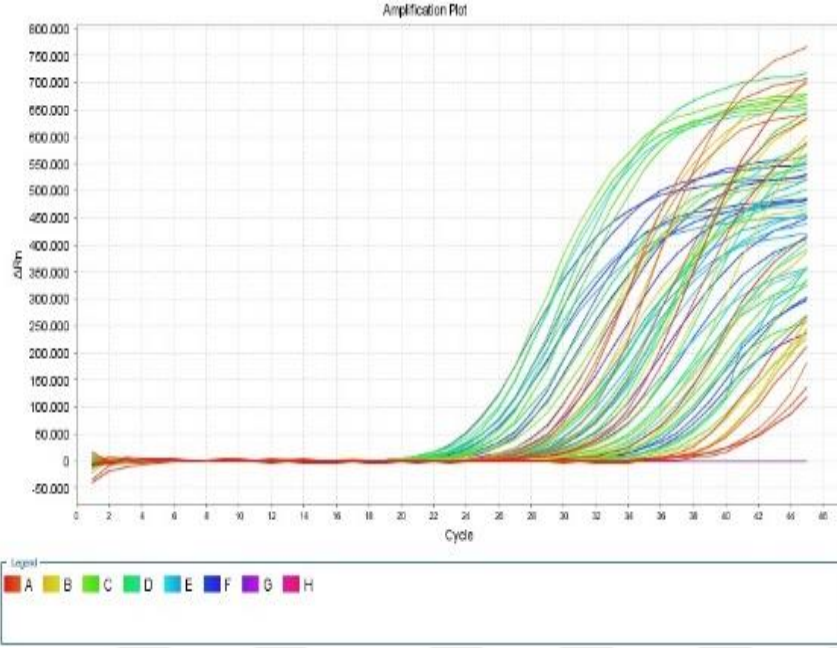
Deney gruplarına ait NPY, AgRP ve ACTB'nin mRNA düzeyinde ifadenmesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait erime eğrisi ve çoğaltma görüntüleri aşağıda gösterilmiştir.



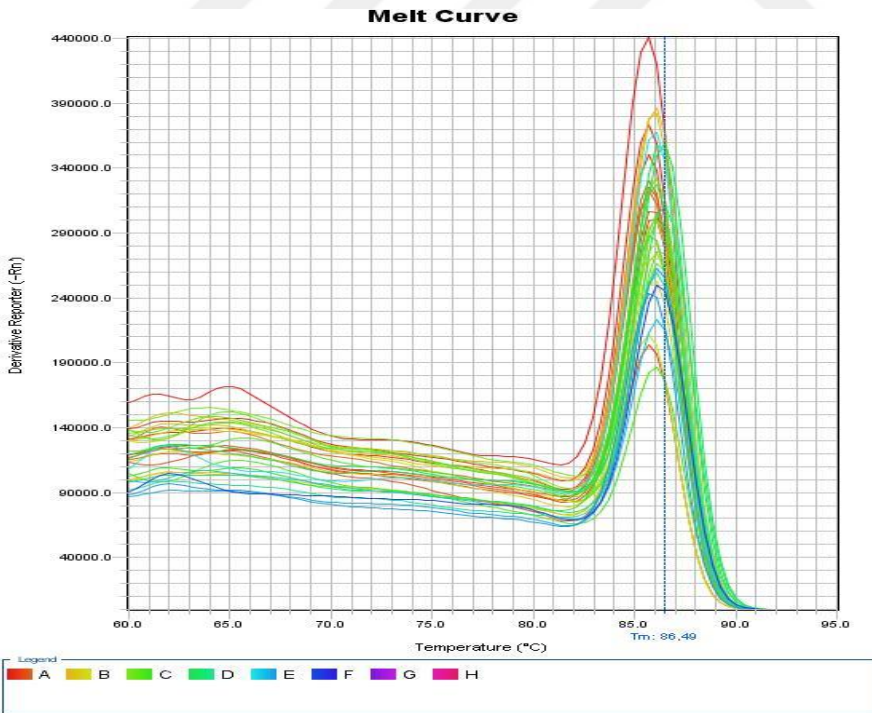
Şekil 5. Deney gruplarına ait NPY geninin Real-Time PCR tepkimesine ait erime eğrisi görüntüsü.



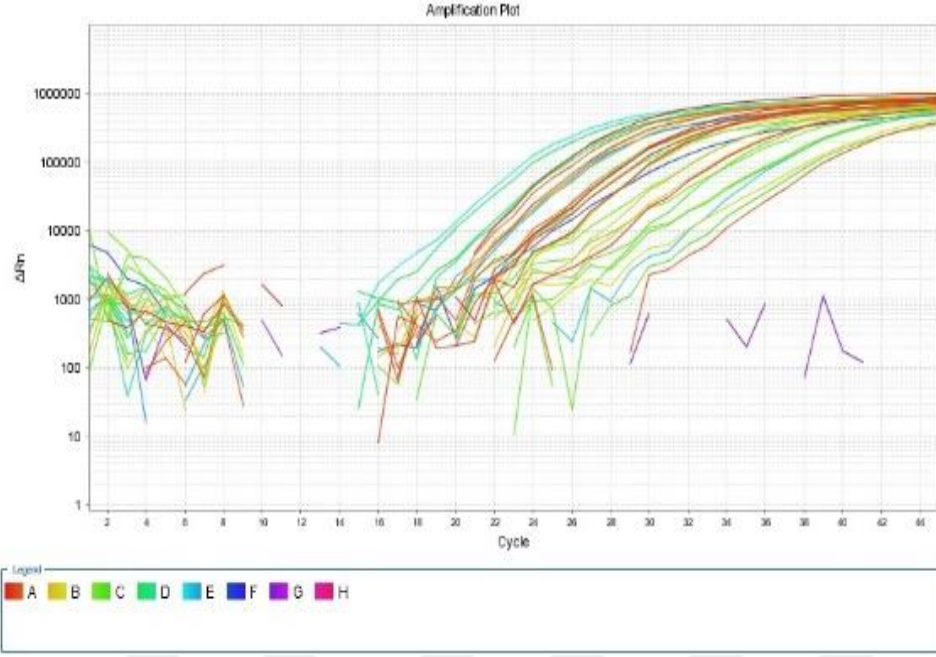
Şekil 6. Deney gruplarına ait NPY geninin Negatif kontrolünün Real-Time PCR tepkimesine ait çoğaltma görüntüsü.



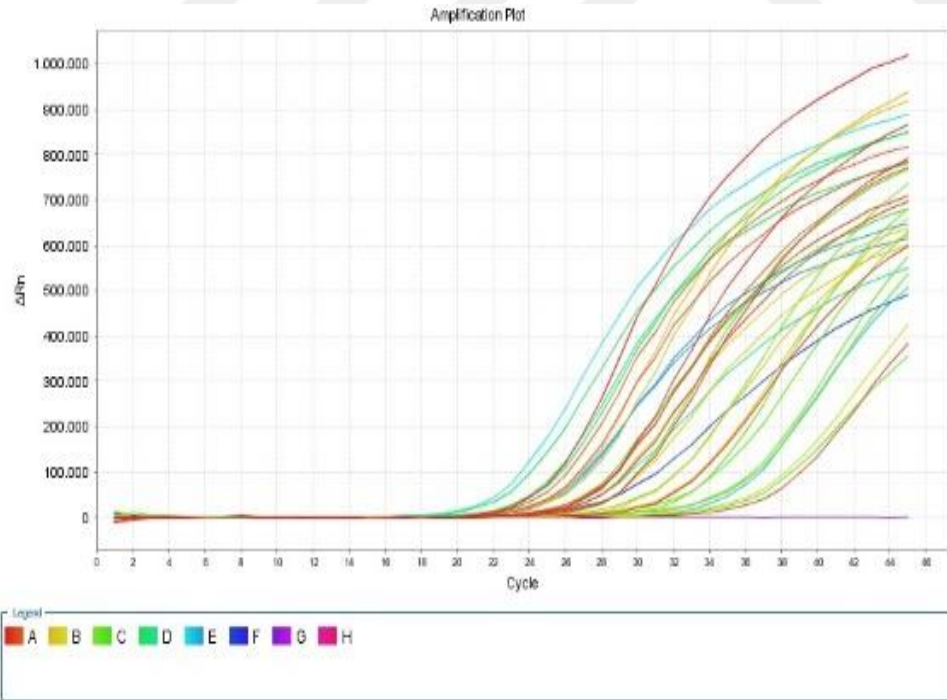
Şekil 7. Deney gruplarına ait NPY geninin Real-Time PCR tepkimesine ait çoğaltma görüntüsü.



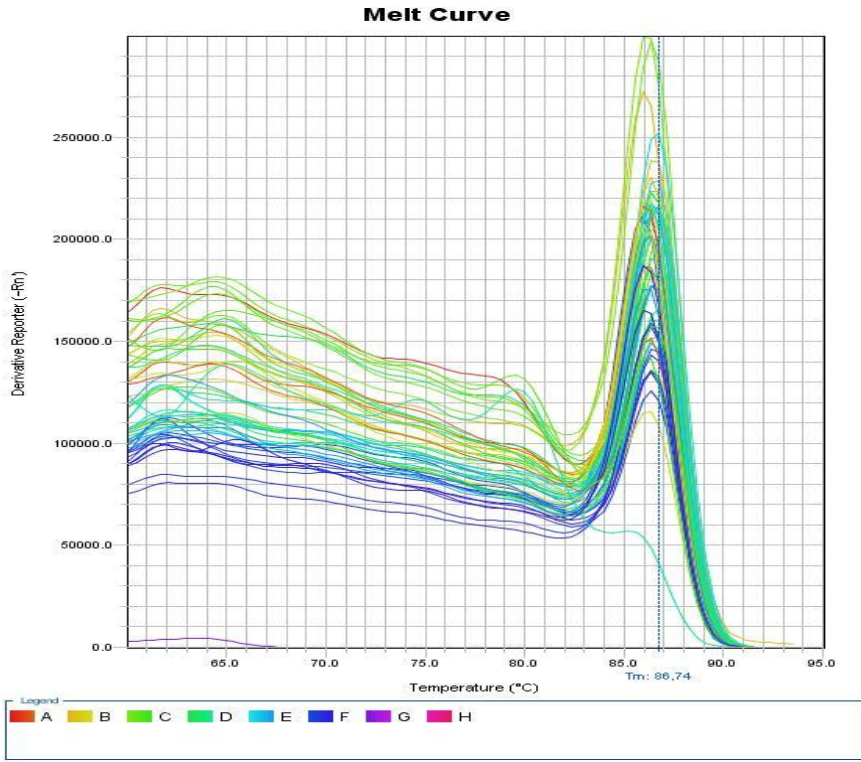
Şekil 8. Deney gruplarına ait AgRP geninin Real-Time PCR tepkimesine ait erime eğrisi görüntüsü.



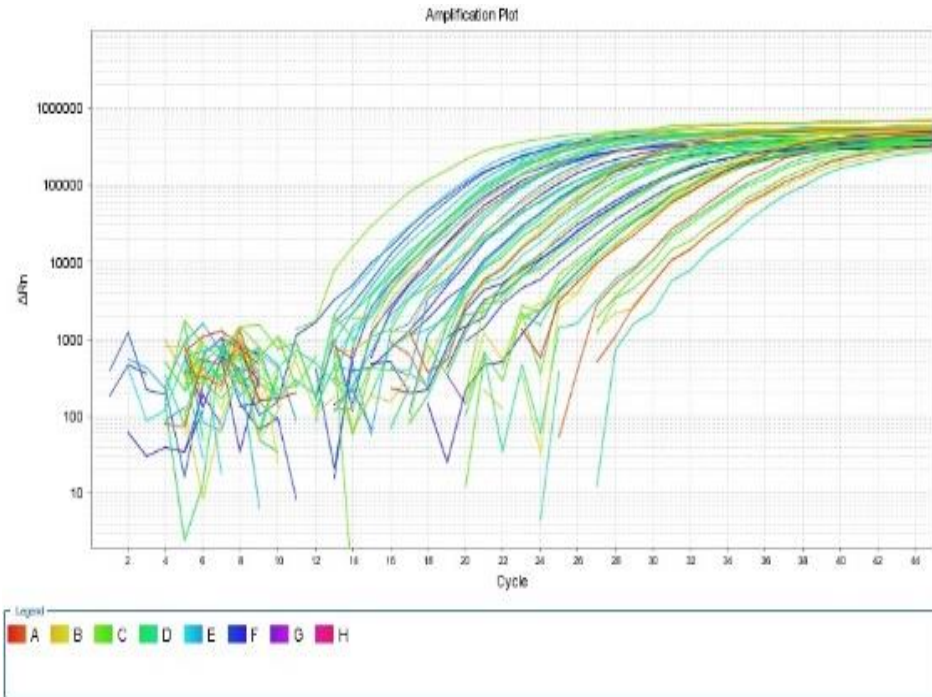
Şekil 9. Deney gruplarına ait AgRP'nin Negatif kontrolünün Real-Time PCR tepkimesine ait çoğaltma görüntüsü.



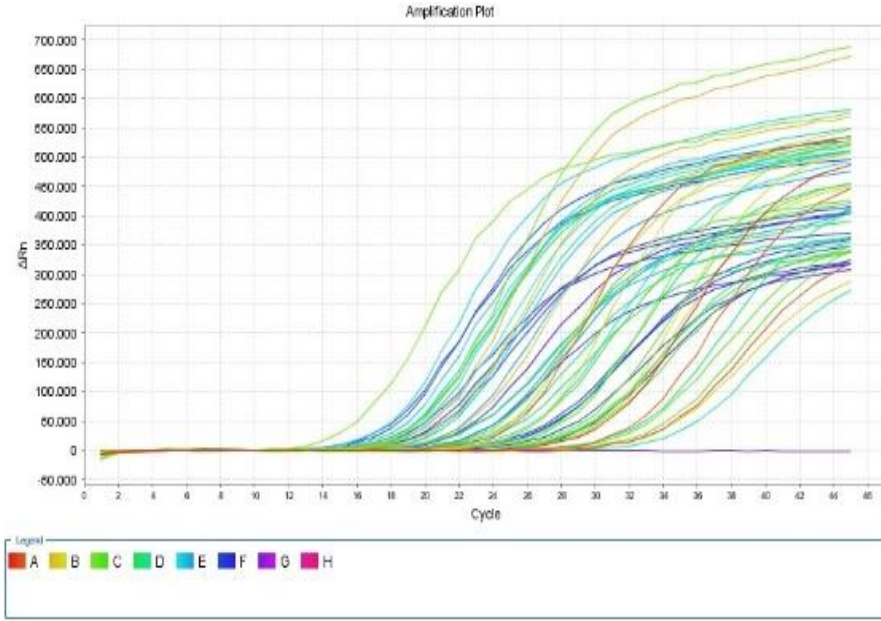
Şekil 10. Deney gruplarına ait AgRP geninin Real-Time PCR tepkimesine ait çoğaltma görüntüsü.



Şekil 11. Deney gruplarına ait ACTB geninin Real-Time PCR tepkimesine ait erime eğrisi görüntüsü.



Şekil 12. Deney gruplarına ait ACTB'nin Negatif kontrolünün Real-Time PCR tepkimesine ait çoğaltma görüntüsü.



Şekil 13. Deney gruplarına ait ACTB geninin Real-Time PCR tepkimesine ait çoğaltma görüntüsü.

4.2. Toplam Protein Miktarı

Toplam protein izolasyonu tek bir dokudan hem RNA hemde protein izolasyonu mümkün olan trizol yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. İzole edilen proteinler ELISA analizine kadar -20 °C muhafaza edildi. Protein tayininde en yaygın kullanılan yöntemlerden birisi olan Bradford yöntemi ile proteinlerin 595 nm’de absorbandsının ölçülmesi ile toplam proteinler belirlenmiştir. Deney gruplarının toplam protein miktarları Tablo 11’de verilmiştir.

Toplam protein miktarları gen spesifik ELISA analizinden önce konsantrasyonları eşitlenmiştir. ELISA kiti kullanılmadan önce %100, %50, %20 ve %10 dilüsyon oranlarında test edilmiştir. Standartlara göre en uygun absorbands veren dilüsyon katsayısı olan %20 kullanılmıştır. NPY ve AgRP gen spesifik elisa kitleri (Bioassay Technology Laboratory Kit) kullanılarak, 450 nm de spektrofotomete (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific™, Finlandiya) cihazı ile ölçülmüştür. Elde edilen veriler GraphPad Prism programı yardımıyla hesaplanmış olup protein değerleri tesbit edildi.

Tablo 11

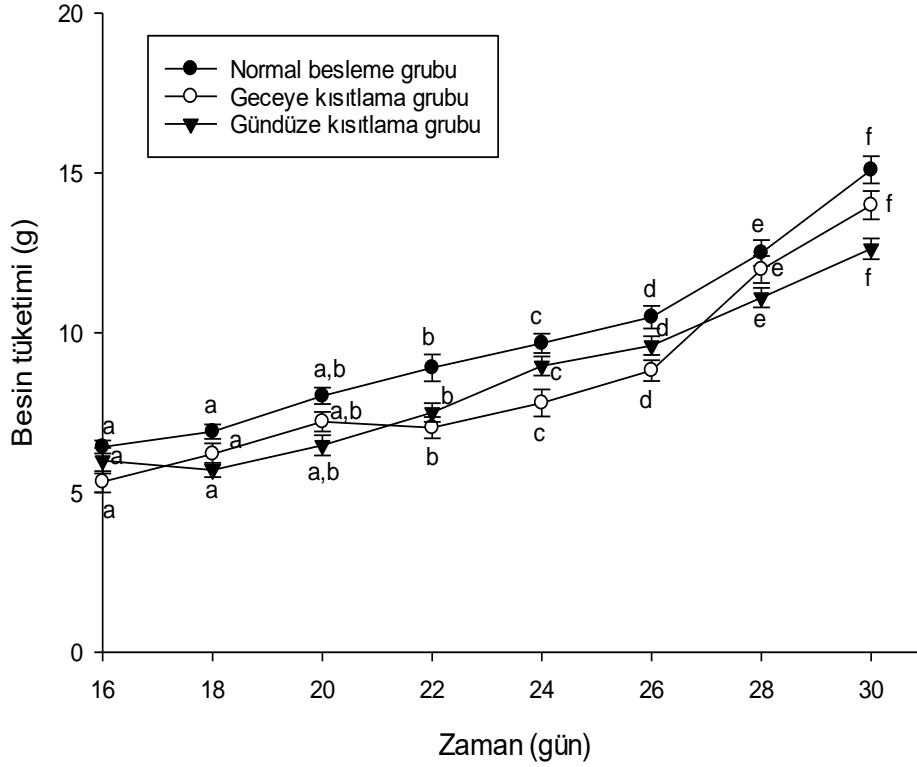
Deney gruplarının toplam protein miktarları (n=8)

Deney Grupları	Alt Gruplar	Uzun fotoperiyota ait örneklerin protein miktarları (ng)	Kısa fotoperiyota ait örneklerin protein miktarları (ng)
Normal Beslenme	10. gün	17,09 ± 0,5	16,81 ± 0,5
	20. gün	16,57 ± 0,5	16,05 ± 0,2
	30. gün	17,42 ± 0,6	16,37 ± 0,2
Geceye Kısıtlama	10. gün	16,69 ± 0,2	17,01 ± 0,5
	20. gün	16,73 ± 0,4	17,05 ± 1,3
	30. gün	17,71 ± 0,2	16,07 ± 0,1
Gündüze Kısıtlama	10. gün	16,64 ± 0,0	16,65 ± 0,3
	20. gün	16,89 ± 0,2	17,19 ± 0,7
	30. gün	16,73 ± 0,2	16,97 ± 0,5

4.3. Uzun Fotoperiyot Gruplarına Ait Bulgular

4.3.1. Besin Tüketimi

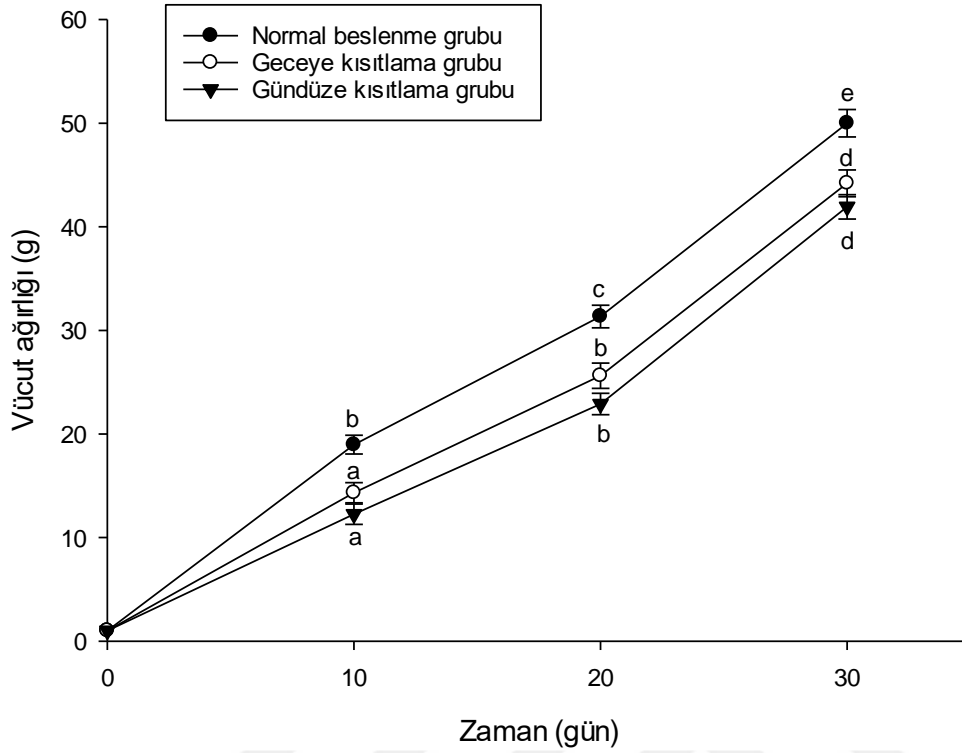
14 L fotoperiyodunda besin alımının gerçekleştiği yavru hamsterlerin laktasyon sürecinden sonraki besin tüketimleri Şekil 14'de gösterilmiştir. Üç farklı beslenme grubunda yer alan yavruların aynı gün tükettikleri besin miktarında önemli farklılık belirlenmemiştir ($p>0.05$).



Şekil 14. Beslenme rejimlerinin *M. auratus* yavrularında laktasyon sürecinden sonra besin tüketimi üzerine etkileri. Değerler ortalama \pm SE olarak ifade edilmektedir. a-f arasında harfler önemli ölçüde farklılığı göstermektedir (Dunn's post hoc testi, $p < 0.05$).

4.3.2. Vücut Ağırlıkları

Yavruların vücut ağırlıkları doğumdan 30. güne kadar on günde bir ölçülmüştür (Şekil 15). Yavruların vücut ağırlıkları, normal beslenme grubuna kıyasla geceye ve gündüze kısıtlama gruplarında azaldığı belirlenmiştir. Normal beslenme grubuna kıyasla yavruların geceye ve gündüze kısıtlandığı 10. 20. ve 30. gün gruplarında vücut ağırlıklarının önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Besin alımının sadece geceye veya sadece gündüze kısıtlandığı gruplar karşılaştırıldığında vücut ağırlıklarında önemli farklılık bulunmamıştır ($p > 0.05$).

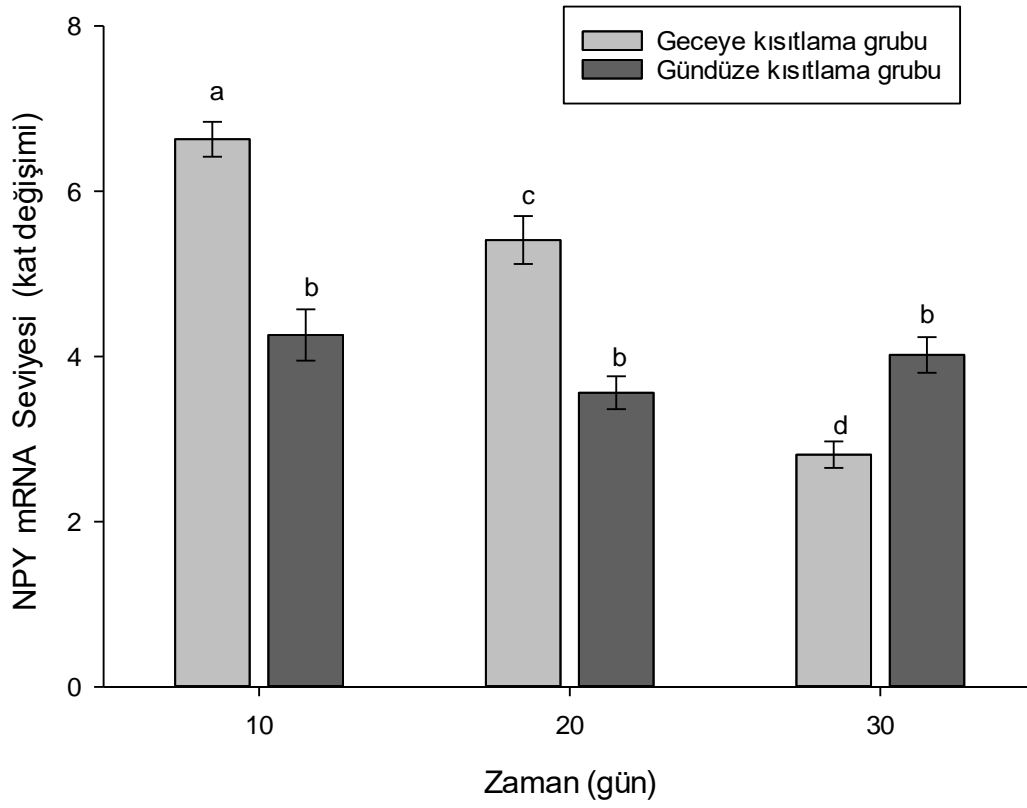


Şekil 15. Beslenme rejimlerinin yavru Suriye hamsterlerinin vücut ağırlığı üzerine etkileri. (*Mesocricetus auratus*) vücut ağırlığı üzerine etkileri. Değerler ortalama \pm SE olarak ifade edilmektedir. a-e arasında harfler önemli ölçüde farklılığı göstermektedir (Dunn's post hoc testi, $p < 0.05$).

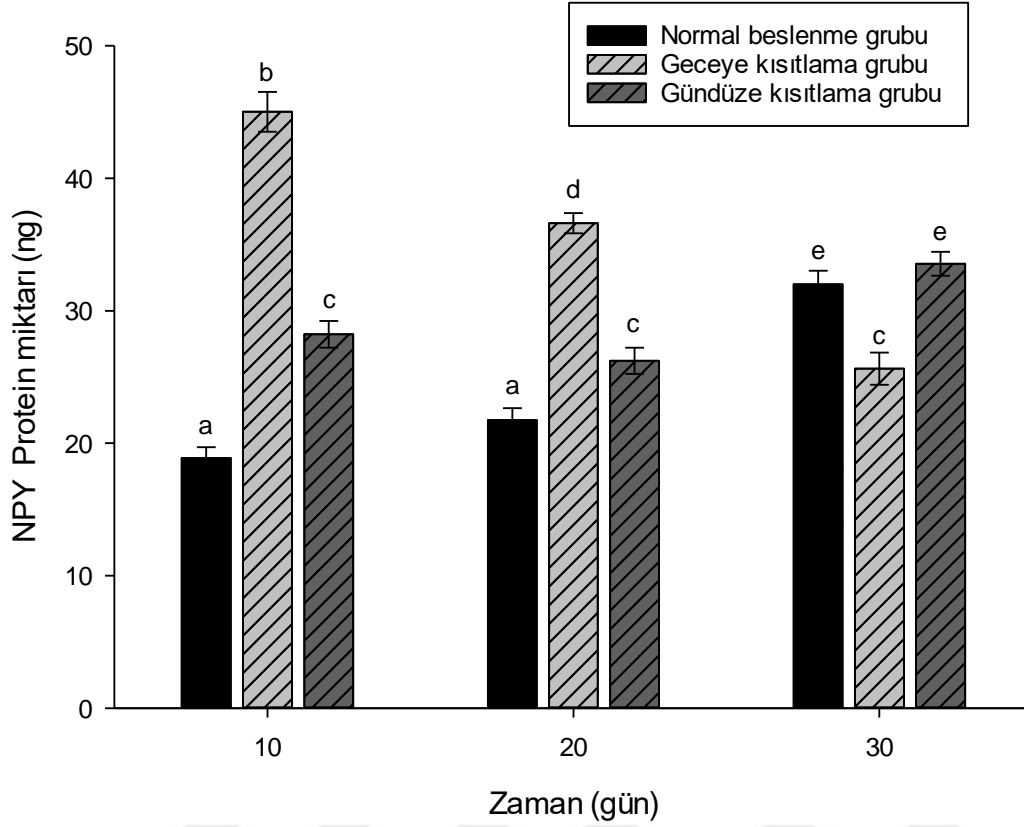
4.3.3. NPY'nin mRNA Ekspresyonu ve Protein Miktarı

Farklı beslenme rejimleri uygulanan yavruların NPY mRNA ekspresyonu ve protein miktarı Şekil 16 ve 17'de gösterilmiştir. NPY'nin mRNA ekspresyonu, en fazla geceye kısıtlama 10. ve 20. gün grubunda artmıştır ($p < 0.001$). Geceye kısıtlama gruplarında 10. 20. ve 30.günde alınan örneklerde NPY mRNA ekspresyonun normal beslenmeye oranla kat artışı sırasıyla; $6,63 \pm 0,21$; $5,41 \pm 0,23$; $2,81 \pm 0,15$ 'dir. Gündüze kısıtlamada gruplarında ise sırasıyla $4,26 \pm 0,31$; $3,56 \pm 0,19$; $4,01 \pm 0,2$ olarak hesaplanmıştır. NPY'nin mRNA ekspresyonu geceye kısıtlama 30. gün grubunda laktasyon sürecine göre azalmış olsa da normal beslenme grubuna oranla artmıştır ($p < 0.05$). NPY'nin mRNA ekspresyonu gündüze kısıtlama gruplarında normal beslenme grubuna oranla artmıştır ($p < 0.05$).

Besin alımının sadece geceye kısıtlandığı gruplarda NPY'nin protein miktarı normal beslenmeye göre 10. ve 20. günde önemli derecede artmıştır ($p<0.001$). Geceye kısıtlama gruplarında NPY'nin protein miktarı 10. günde; $45,01\pm 1,73$ ve 20. günde; $35,31\pm 1,55$ olduğu saptanmıştır. NPY'nin gündüze kısıtlandığı gruplarda protein miktarı sadece 30. günde önemli farklılık görülmezken 10. ve 20. gün normal beslenme grubuna göre artmıştır ($p<0.05$).



Şekil 16. Yavru Suriye hamsterlerinin (*Mesocricetus auratus*) normal beslenmeye oranla NPY mRNA ekspresyonu. Üç farklı beslenme rejiminin, doğumdan itibaren 10. 20. ve 30 günde NPY gen anlatım profilleri şekilde gösterilmektedir. Değerler ortalama \pm SE olarak gösterildi. a-d arasında harfler önemli ölçüde farklılığı göstermektedir (Dunn's post hoc testi, $p<0.05$). Her bir beslenme grubu için yavru sayısı $n=24$ 'tür.

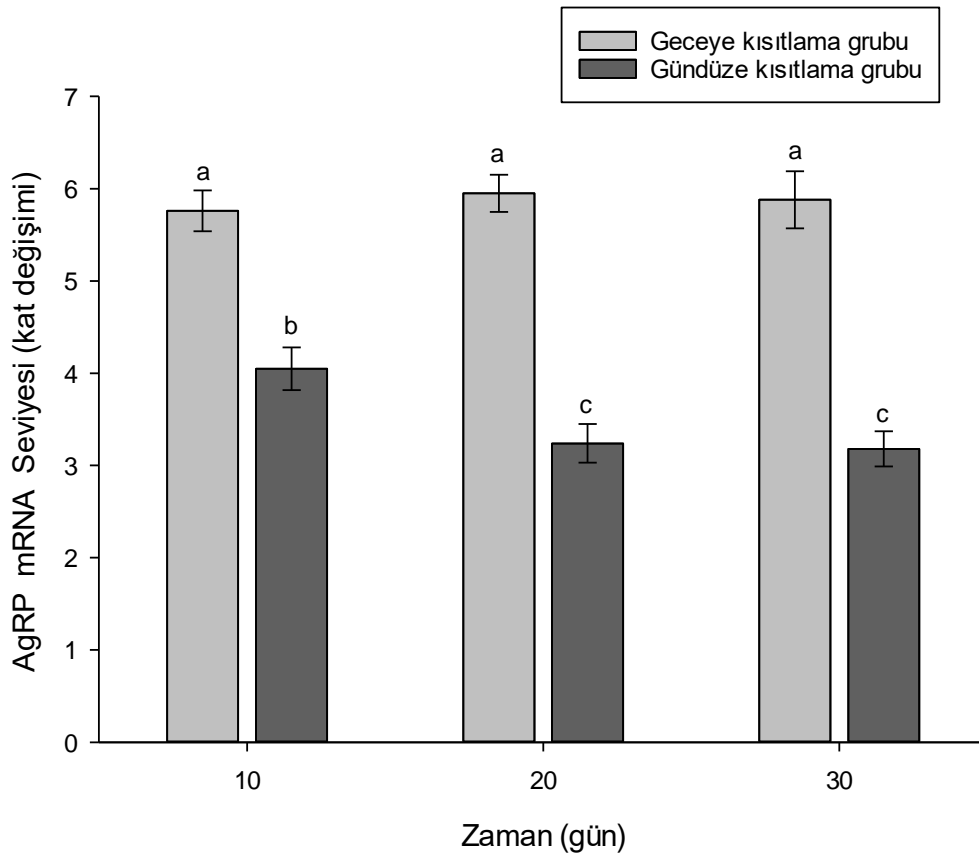


Şekil 17. Farklı beslenme rejimlerine maruz kalan yavru Suriye hamsterlerinin (*Mesocricetus auratus*) NPY protein miktarları. (*Mesocricetus auratus*) vücut ağırlığı üzerine etkileri. Yavruların, doğumdan itibaren 10. 20. ve 30 günde ELISA ile analiz edilen NPY protein miktarları şekilde gösterilmektedir. Değerler ortalama \pm SE olarak ifade edilmektedir. a-e arasında harfler önemli ölçüde farklılığı göstermektedir. (Dunn's post hoc testi, $p < 0.05$). Her bir beslenme grubu için yavru sayısı $n=24$ 'tür.

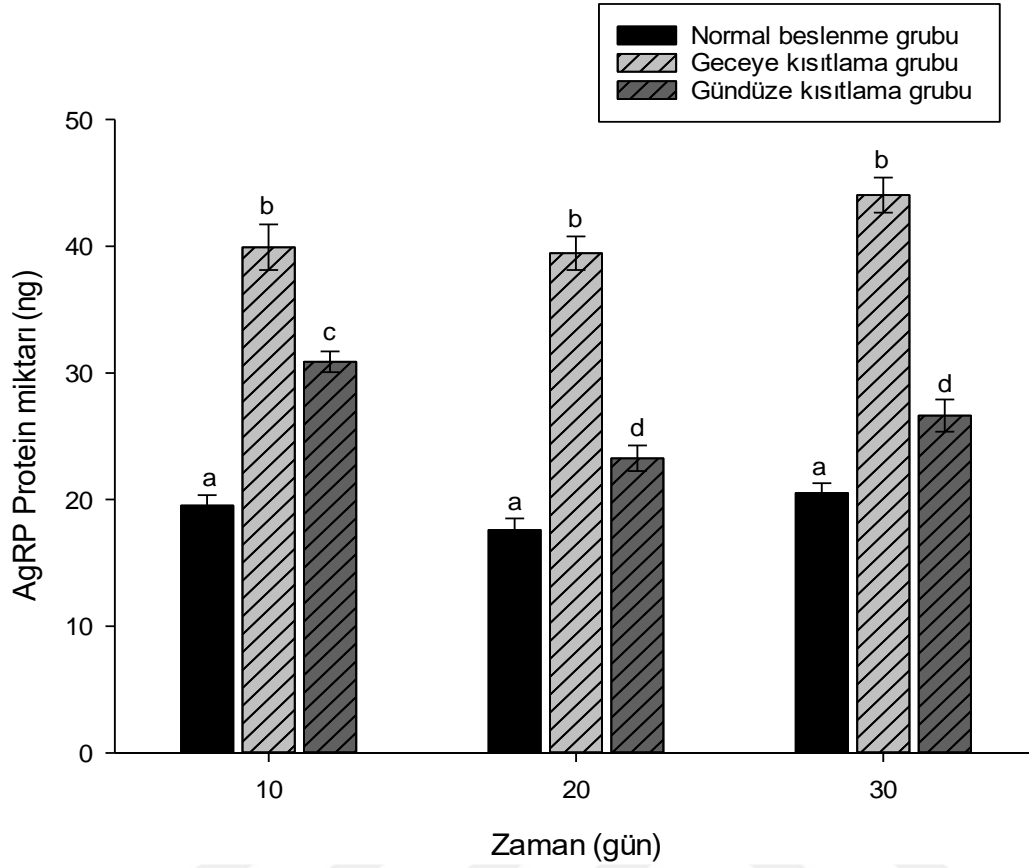
4.3.4. AgRP'nin mRNA Ekspresyonu ve Protein Miktarı

Farklı beslenme rejimleri uygulanan yavruların AgRP genlerin ekspresyonu Şekil 18 ve 19'da gösterilmiştir. AgRP'nin mRNA ekspresyonu geceye kısıtlama gruplarında hem laktasyon süresince hemde sonrasında normal beslenme grubuna oranla yaklaşık 6 kat arttığı görülmüştür ($p < 0.001$). Gündüze kısıtlama grubunda ise en fazla AgRP'nin mRNA ekspresyonu laktasyon sürecinde olan 10. gün grubunda görülmüştür ($p < 0.01$). Normal beslenme grubuna oranla AgRP'nin mRNA ekspresyonu gündüze kısıtlama gruplarında yaklaşık olarak 10. günde 4 kat ($4,03 \pm 0,25$), 20. ve 30. günde 3 kat arttığı belirlenmiştir.

AgRP'nin protein miktarı, mRNA ekspresyonunda görüldüğü gibi en fazla artış geceye kısıtlama gruplarında belirlenmiştir ($p<0.001$). Gündüze kısıtlama grubunda ise en fazla AgRP'nin protein miktarı laktasyon sürecinde olan 10. gün grubunda görülmüştür ($p<0.001$). Üç farklı beslenme rejimleri karşılaştırıldığında AgRP protein miktarı hem geceye kısıtlama hemde gündüze kısıtlama gruplarında normal beslenme grubuna göre arttığı görülmüştür ($p<0.05$).



Şekil 18. Yavru Suriye hamsterlerinin (*Mesocricetus auratus*) normal beslenmeye oranla AgRP mRNA ekspresyonu. Üç farklı beslenme rejiminin, doğumdan itibaren 10. 20. ve 30 günde AgRP gen anlatım profilleri şekilde gösterilmektedir. Değerler ortalama \pm SE olarak gösterildi. a-c arasında harfler önemli ölçüde farklılığı göstermektedir.. (Dunn's post hoc testi, $p<0.05$). Her bir beslenme grubu için yavru sayısı $n=24$ 'tür.

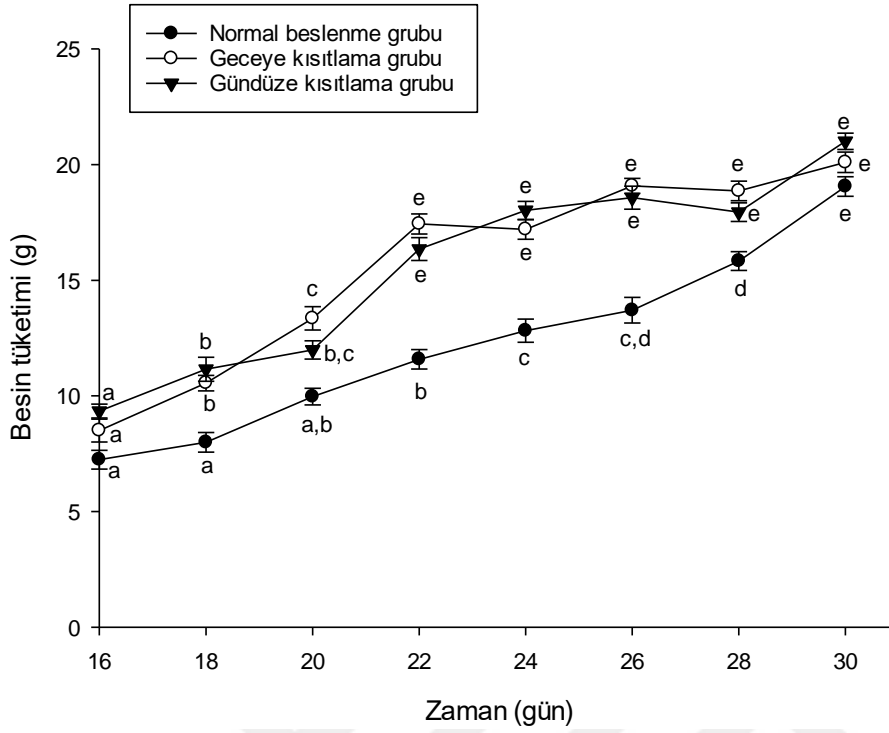


Şekil 19. Farklı beslenme rejimlerine maruz kalan yavru Suriye hamsterlerinin (*Mesocricetus auratus*) AgRP protein miktarları. Yavruların, doğumdan itibaren 10. 20. ve 30 günde ELISA ile analiz edilen AgRP protein miktarları şekilde gösterilmektedir. Değerler ortalama \pm SE olarak gösterildi. a-d arasında harfler önemli ölçüde farklılığı göstermektedir (Dunn's post hoc testi, $p < 0.05$). Her bir beslenme grubu için yavru sayısı $n=24$ 'tür.

4.4. Kısa Fotoperiyot Gruplarına Ait Bulgular

4.4.1. Besin Tüketimi

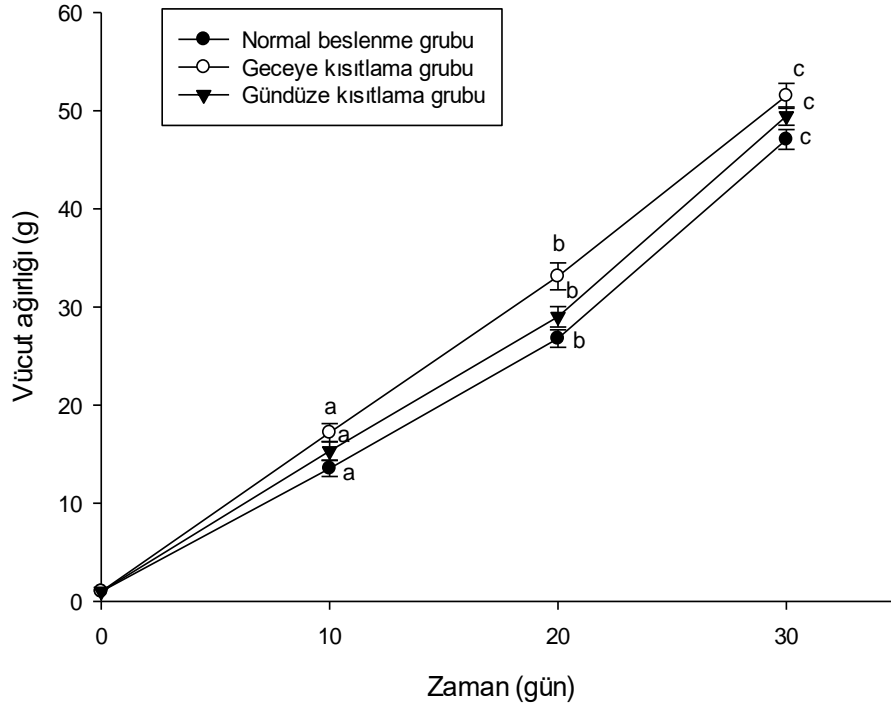
10 L fotoperiyodunda besin alımının gerçekleştiği yavru hamsterlerin laktasyon sürecinden sonraki besin tüketimleri Şekil 20'de gösterilmiştir. Üç farklı beslenme grubunda yer alan yavruların aynı gün tükettikleri besin miktarı normal beslenme grubuna kıyasla geceye ve gündüze kısıtlama gruplarında artmıştır ($p < 0.05$).



Şekil 20. Kısa fotoperiyota ait beslenme rejimlerinin *M. auratus* yavrularında laktasyon sürecinden sonra besin tüketimi üzerine etkileri. Değerler ortalama \pm SE olarak ifade edilmektedir. a-e arasında harfler önemli ölçüde farklılığı göstermektedir (Dunn's post hoc testi, $p < 0.05$).

4.4.2. Vücut Ağırlıkları

10 L fotoperiyodunda yer alan yavruların vücut ağırlıkları doğumdan 30. güne kadar on günde bir ölçülmüştür ve şekil 21'de gösterilmiştir. Üç farklı beslenme grubunda yer alan yavruların vücut ağırlıklarında önemli farklılık belirlenememiştir ($p < 0.05$).

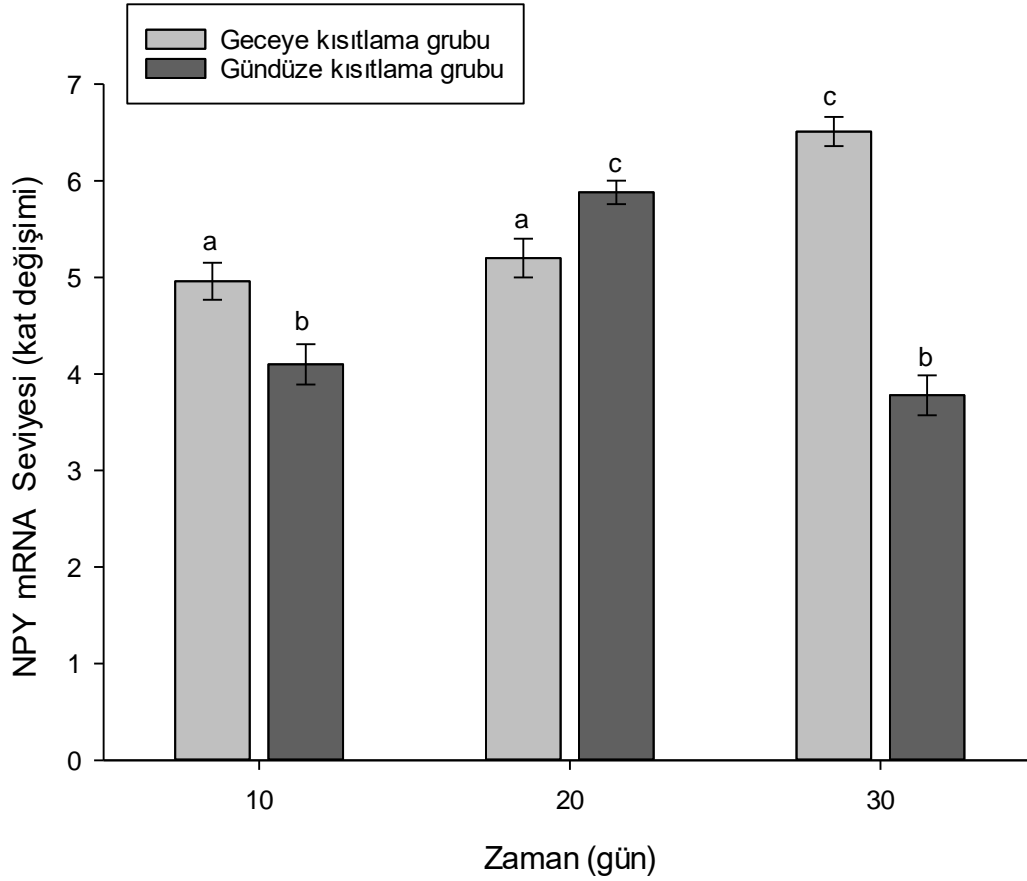


Şekil 21. Kısa fotoperiyota ait beslenme rejimlerinin yavru Suriye hamsterlerinin (*Mesocricetus auratus*) vücut ağırlığı üzerine etkileri. Değerler ortalama \pm SE olarak ifade edilmektedir. a-c arasında harfler önemli ölçüde farklılığı göstermektedir (Dunn's post hoc testi, $p < 0.05$).

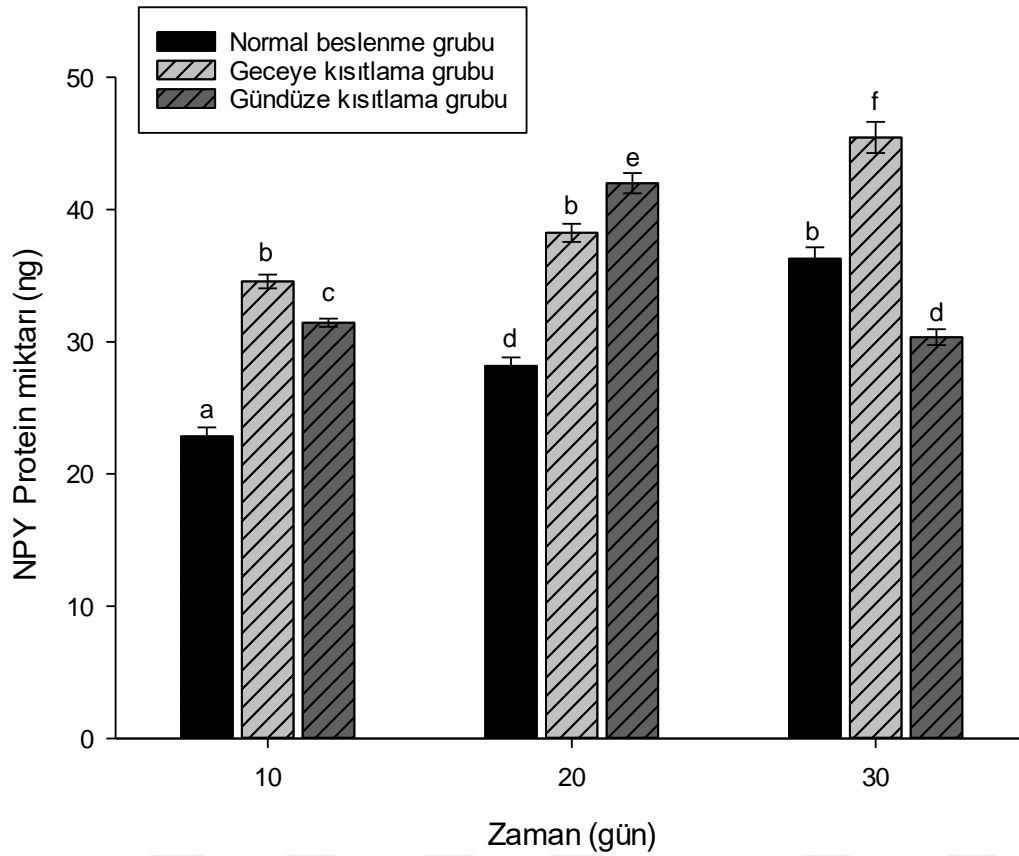
4.4.3. NPY'nin mRNA Ekspresyonu ve Protein Miktarı

10L fotoperiyotunda gerçekleşen farklı beslenme rejimlerinin, doğumdan itibaren 10. 20. ve 30 günde NPY'nin mRNA ekspresyonu ve protein miktarı Şekil 22 ve 23'de gösterilmiştir. NPY'nin mRNA ekspresyonu normal beslenme grubuna kıyasla geceye ve gündüze kısıtlama gruplarında önemli derecede artmıştır. ($p < 0.05$). NPY'nin mRNA ekspresyonu geceye kısıtlama grubunda en fazla 30. günde ($6,51 \pm 0,29$) görülmüştür ($p < 0.001$). NPY'nin mRNA ekspresyonu gündüze kısıtlama grubunda en fazla 20. günde ($5,88 \pm 0,12$) belirlenmiştir ($p < 0.001$).

Besin alımının sadece geceye kısıtlandığı 10. 20. ve 30 gün gruplarında NYP'nin protein miktarında önemli derecede arttığı belirlenmiştir (sırasıyla; $34,56 \pm 0,81$; $38,24 \pm 0,95$; $45,44 \pm 1,18$). NPY'nin gündüze kısıtlandığı gruplarda protein miktarı sadece 10. ve 20. günde önemli farklılık görülmüştür ($p < 0.05$).



Şekil 22. Kısa fotoperiyotta yavru Suriye hamsterlerinin (*Mesocricetus auratus*) NPY mRNA ekspresyonu. Üç farklı beslenme rejiminin, doğumdan itibaren 10. 20. ve 30. günde AgRP gen anlatım profilleri şekilde gösterilmektedir. Değerler ortalama \pm SE olarak gösterildi. a-c arasında harfler önemli ölçüde farklılığı göstermektedir (Dunn's post hoc testi, $p < 0.05$). Her bir beslenme grubu için yavru sayısı $n=24$ 'tür.



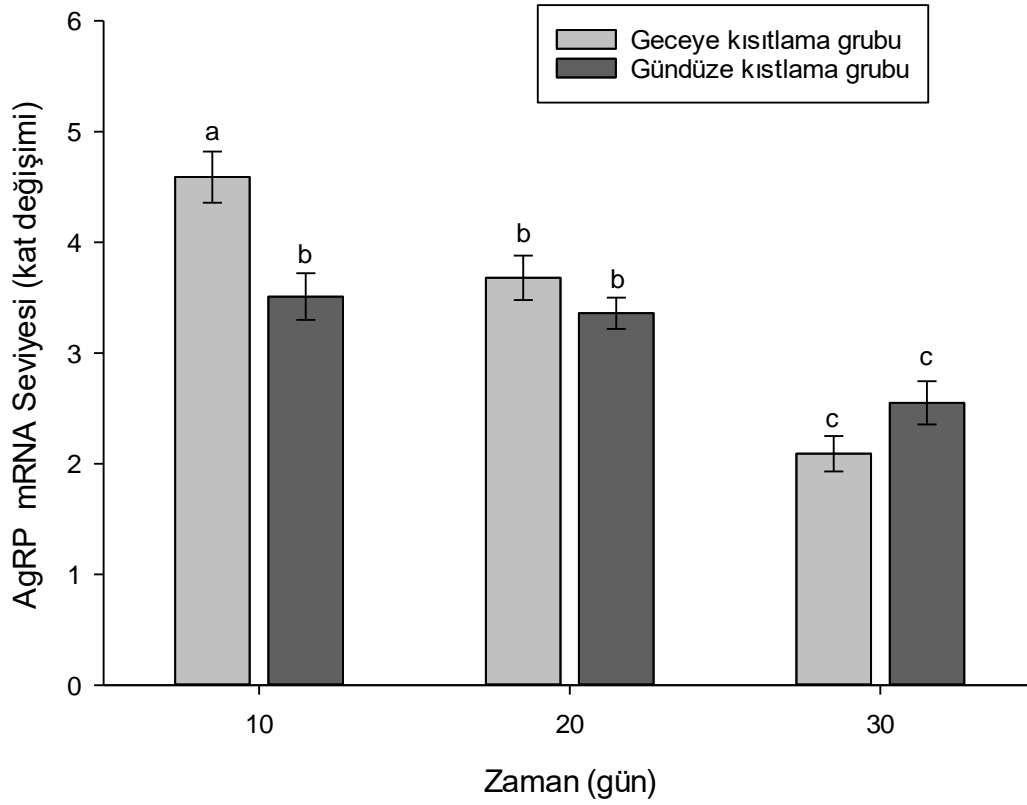
Şekil 23. Kısa fotoperiyotta farklı beslenme rejimlerine maruz kalan yavru Suriye hamsterlerinin (*Mesocricetus auratus*) NPY protein miktarları. Yavruların, doğumdan itibaren 10. 20. ve 30 günde ELISA ile analiz edilen AgRP protein miktarları şekilde gösterilmektedir. Değerler ortalama \pm SE olarak gösterildi. a-f arasında harfler önemli ölçüde farklılığı göstermektedir (Dunn's post hoc testi, $p < 0.05$). Her bir beslenme grubu için yavru sayısı $n=24$ 'tür.

4.4.4. AgRP'nin mRNA Ekspresyonu ve Protein Miktarı

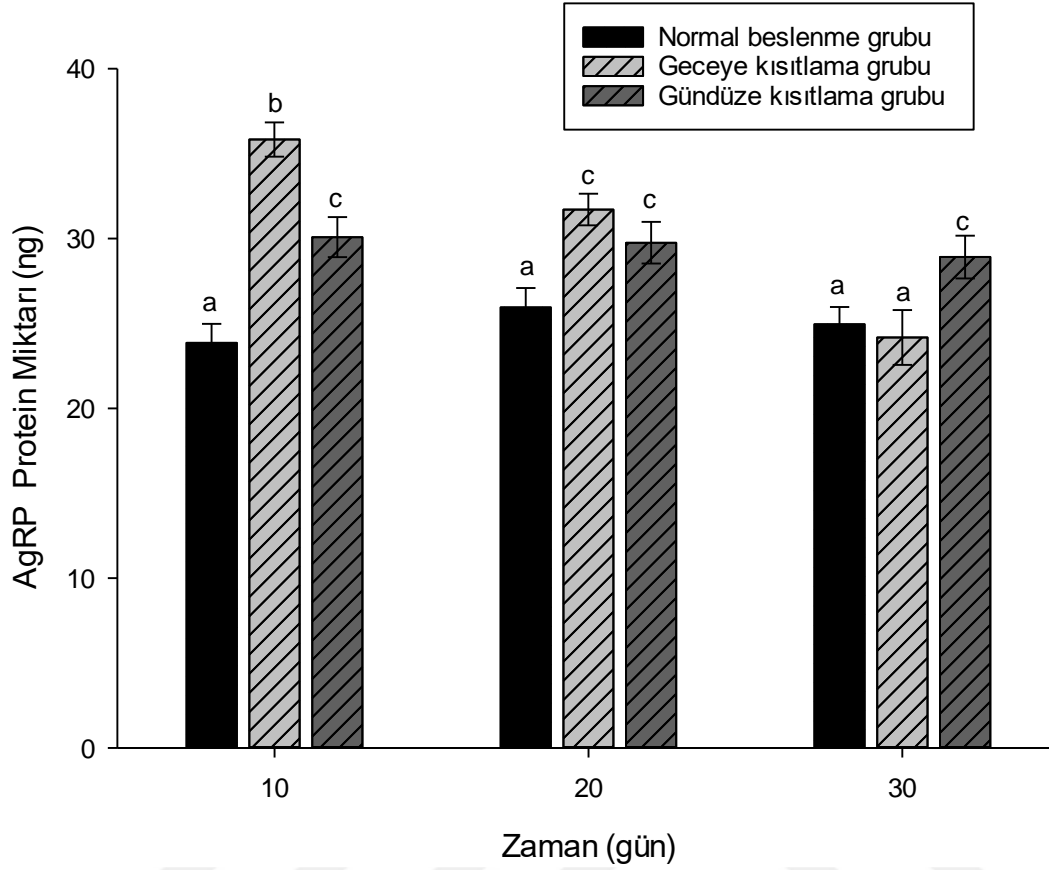
AgRP'nin mRNA ekspresyonu ve protein miktarı Şekil 24 ve 25'te gösterilmiştir. AgRP'nin mRNA ekspresyonu en fazla geceye kısıtlama grubu 10. günde arttığı belirlenmiştir ($p < 0,001$). AgRP'nin hem geceye hemde gündüze kısıtlama gruplarında her on günde bir mRNA ekspresyonu azaldığı görülmektedir ($p < 0,05$). Geceye kısıtlama gruplarında AgRP'nin mRNA ekspresyonu sırasıyla 10. günde; $4,59 \pm 0,29$; 20. günde; $3,68$

$\pm 0,20$ ve 30.günde; $2,09 \pm 0,15$ 'tir. Gündüze kısıtlama grubunda ise 10. günde; $3,51 \pm 0,30$; 20. günde; $3,36 \pm 0,21$ ve 30.günde; $2,55 \pm 0,19$ 'dir.

Geceye kısıtlama 10. gün grubunda AgRP'nin, protein miktarı en fazladır, diğer geceye kısıtlama gruplarında ise her on günde bir protein miktarı azaldığı görülmektedir ($p < 0,05$). Geceye kısıtlama protein miktarları 10. günde; $35,83 \pm 1,01$; 20. günde; $31,71 \pm 0,93$ ve 30.günde; $24,17 \pm 2,11$ 'tir. Gündüze kısıtlama grubunda protein miktarı; 10. günde; $30,08 \pm 1,18$; 20. günde; $29,75 \pm 1,22$ ve 30.günde; $28,91 \pm 1,65$ 'tir. ($p < 0,05$).



Şekil 24. Kısa fotoperiyotta yavru Suriye hamsterlerinin (*Mesocricetus auratus*) AgRP mRNA ekspresyonu. Üç farklı beslenme rejiminin, doğumdan itibaren 10. 20. ve 30 günde AgRP gen anlatım profilleri şekilde gösterilmektedir. Değerler ortalama \pm SE olarak gösterildi. a-c arasında harfler önemli ölçüde farklılığı göstermektedir (Dunn's post hoc testi, $p < 0,05$). Her bir beslenme grubu için yavru sayısı $n=24$ 'tür.



Şekil 25. Kısa fotoperiyotta farklı beslenme rejimlerine maruz kalan yavru Suriye hamsterlerinin (*Mesocricetus auratus*) AgRP protein miktarları. Yavruların, doğumdan itibaren 10. 20. ve 30 günde ELISA ile analiz edilen AgRP protein miktarları şekilde gösterilmektedir. Değerler ortalama \pm SE olarak gösterildi. a-c arasında harfler önemli ölçüde farklılığı göstermektedir (Dunn's post hoc testi, $p < 0.05$). Her bir beslenme grubu için yavru sayısı $n=24$ 'tür.

4.5. Tartışma

Hem insanlar hem de hayvanlar üzerinde yapılan epidemiyolojik araştırmalara göre beslenme, gelişimin çok erken dönemlerinde enerji dengesinin metabolik düzenlenmesinde kritik rol oynamaktadır (Varela vd., 2021). Hamilelik ve emzirme döneminde besin kısıtlaması, yavruların metabolik mekanizmaları üzerinde kalıcı etkilere neden olabilir ve yetişkin yaşamdaki obezite eğilimini değiştirebilir. (Martin-Gronert ve Ozanne, 2006). Bu çalışmada, maternal faktörlerin, yavruların hipotalamik nöropeptidler olan NPY/AgRP'nin

gen ekspresyonunu, nasıl etkilediği ve gelişimin erken dönemlerinden 30. güne kadar nasıl değişim gösterdiği belirlenmiştir.

Maternal transfer aracılığıyla besinsel iletme bağı olarak uzun fotoperiyotta yer alan yavrularda besin tüketimi açısından gruplar arasında farklılık belirlenmemiştir. Uzun fotoperiyot gruplarının, normal beslenme grubu ile karşılaştırıldığında, yavruların vücut ağırlıklarının azaldığı belirlenmiştir. Hamilelik ve emzirme gibi kritik dönemlerde maternal besin kısıtlaması uygulanan yavruların düşük vücut ağırlıklarının olduğu önceki çalışmalarda da gösterilmiştir (Coupe vd., 2009; Lim vd., 2006). Bu durum gebelik ve emzirme gibi enerji gerektiren durumlarda açlık koşullarında ihtiyaç duyulan enerjiyi azaltmak için NPY'nin vücut ağırlığını ve kemik oluşumunu azaltması ile açıklanabilir (Baldock vd., 2009).

Kısa fotoperiyotta yer alan gruplarda ise normal beslenme grubuna göre besin tüketiminin daha fazla olduğu belirlenmiştir. Ancak bu farklılık deney sonunda ortadan kalkmıştır. Kısa fotoperiyot gruplarındaki yavruların vücut ağırlıkları açısından gruplar arasında farklılık belirlenmemiştir. Uzun ve kısa fotoperiyotta yer alan grupların besin tüketimi ve vücut ağırlığındaki bu farklılık kısa gün uzunluğunda daha fazla salınan melatonin hormonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Melatonin hormonu sıçan gibi türlerde besin tüketimini artırdığı bildirilmiştir (Wolden-Hanson vd., 2000). Fotoperiyodik canlılar mevsimsel adaptasyon için vücut ağırlıklarını gün ışığına bağlı olarak düzenlerler. Suriye hamsteri, kısa fotoperiyotta vücut ağırlığını artırmaktadır (Bartness ve Wade, 1984; Reiter, 1993). Çalışmamızda kısa fotoperiyot gruplarının besin kısıtlaması uygulamasına rağmen vücut ağırlıklarında azalma olmamasının nedeni Suriye hamsterinin, kısa fotoperiyotta vücut ağırlığını artırmasıdır. Kısa fotoperiyotta yapılan bu çalışmada besin kısıtlaması ve vücut ağırlığı verileri literatür ile desteklenmektedir.

Vücut ağırlığı ve besin alımını kontrol eden beynin hipotalamus bölgesindeki suprakiazmatik nükleus ve arkuat nükleustur (Varela vd., 2021). Arkuat nükleus, antagonistik fonksiyonlara sahip iki ana nöron popülasyonu ile enerji homeostazının birçok yönünü düzenler. Açlığı işaret eden NPY/AgRP nöronları ve tokluk sinyali veren pro-

opiomelanokortin (POMC) nöronları, besin alımını kontrol eden nöronal bağlantıların anahtar bileşenleridir. Arkuat nükleus nöropeptid gen ekspresyonunun dönemsel profilleri, bu genlerin ürünlerinin günlük besin alımı kalıplarına dahil olduğuna dair hiçbir kanıt sağlamaz. Leptin ve reseptörünün farelerde *ad libitum* beslenmeyi düzenleyen genler hiyerarşisinde öne çıktığı doğrusa (Stütz vd., 2007), o zaman mevcut veriler Suriye hamsterlerinin Sibirya hamsterlerine kıyasla yiyecek alımlarında daha gececi (nokturnal) olduğunu gösterebilir (Ellis vd., 2008). Suriye hamsterleri, yiyecekleri yanak keselerinde istifleme (saklama) yeteneğine sahiptir. Bu, hayvanların aydınlık-karanlık döngüsü boyunca daha istikrarlı bir enerji akışı düzenlemelerini sağlayabilir. Her fotoperiyotta yaptığımız besin alımı ölçümlerimiz, kolonimizdeki hamsterlerin yiyecek tüketiminde ağırlıklı olarak gececi (nokturnal) olduğunu göstermektedir. Sibirya hamsterlerinin yiyecek istiflemesi, Wood ve Bartness (1996) tarafından kısa gün hamsterlerinin uzun gün hamsterlerinden daha fazla yiyecek biriktirdiği gözlemi de dahil olmak üzere kapsamlı bir çalışmanın konusu olmuştur. Suriye Hamsterinde da benzer bulgular söz konusudur. Bu nedenle, Sibirya hamsterinde gastrointestinal sisteme fiilen giren besinin zamansal modeli, hayvanlar muhtemelen ışık fazının sonuna doğru negatif enerji dengesinde olacak olsa da, sıçanlarda ve farelerde olduğu kadar keskin bir şekilde günlük olmayabilir. Bu enerji eksikliği, uzun gün hamsterlerinde daha belirgin olabilir, ancak bu durum serum leptin konsantrasyonunda herhangi bir model oluşturmayabilir.

Çalışmamızda maternal faktörlerin, yavru üzerinde NPY/AgRP mRNA ekspresyonu ve protein miktarında önemli farklılıklara neden olduğu belirlenmiştir. Uzun ve kısa fotoperiyotta ki gruplarda yer alan yavruların, normal beslenmeye oranla laktasyon döneminde (doğumdan itibaren ilk 15 gün) NPY/AgRP mRNA ekspresyonu ve protein miktarı en fazladır. Önceki çalışmalar, laktasyon sürecinde maternal diyetle maruz kalmanın, yavruda NPY/AgRP'nin protein ve mRNA ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Fukami vd., 2012; Qiu vd., 2016). Yavrunun NPY/AgRP mRNA ekspresyonu ve protein miktarı, gelişimin çok erken aşamalarında beslenmedeki değişikliklerden önemli ölçüde etkileniyor görünmektedir. Emzirme sırasında ve sonrasında nöropeptid genlerinin ekspresyonundaki fark özellikle çarpıcıdır.

Uzun fotoperiyotta beslenme rejimlerine devam edilen yavruların geceye ve gündüze kısıtlama gruplarında NPY mRNA ekspresyonu laktasyondan sonra azalırken, AgRP mRNA ekspresyonu artmaktadır. NPY ve AgRP mRNA seviyelerinde ki bu durum literatürde, hem kısa hem de uzun vadeli açlıkla ilişkilendirilmiştir. Çalışmada uzun süreli açlıkta sadece AgRP düzeyinin anlamlı olduğu, kısa süreli açlıkta ise hem NPY düzeylerinin hem de AgRP düzeylerinin anlamlı olduğu bulunmuştur (Palou vd., 2009). Farklı bir çalışmada doğumdan itibaren 90 gün süreyle besin kısıtlaması uygulanmış ve AgRP anlamlı olarak artarken NPY'nin anlamlı şekilde artmadığı saptanmıştır (Mariano vd., 2020). Hızlı besin alımı başlangıcı NPY gerektirirken, kronik gıda alımı başlangıcı AgRP gerektirir. AgRP nöropeptidi, spesifik olarak melanokortin reseptörüne (MCR-4) bağlandığı için, açlık sırasında α -MSH'nin anoreksijenik etkisini inhibe eder. MCR-4'de bir antagonist olarak hareket ederek AgRP'nin aşırı ekspresyonunu teşvik eder (Ollmann ve Wilson, 1997; Timper ve Brüning, 2017). AgRP nöronları, besin alımını yönlendirmede kritik bir role sahiptir. Besin alımındaki uzun vadeli artışların, MCR-4 aracılığıyla AgRP sinyali ile aracılık ettiği düşünülmektedir (Krashes vd., 2011).

Kısa fotoperiyottaki NPY'nin mRNA ekspresyonu ve protein miktarındaki artış laktasyon döneminden sonrada devam ederken AgRP' de azalmıştır. NPY'nin bu durumu melatonin hormonu ile ilişkilendirilir. Sıçanlarda yapılan çalışmada, melatoninin hipotalamustaki arkuat nükleustaki NPY sentezini uyardığı gösterilmiştir (Diaz vd., 2000). Fareler üzerinde yapılan çalışmada fotoperiyodun, NPY ve AgRP'nin gen ekspresyonunda etkisinin olduğu gösterilmiştir (Wanlong vd., 2017). Sibiry hamsterlerinde AgRP, NPY ve POMC gen ekspresyonları incelenmiş kısa fotoperiyotta POMC ve AgRP gen ekspresyonunu azalırken NPY üzerinde bir etkisi olmadığı görülmüştür (Mercer vd., 2000). Sibiry hamsterlerinde yapılan başka bir çalışmada ise NPY ve AgRP'nin uzun fotoperiyotta mRNA ekspresyonlarının daha fazla olduğu belirlenmiştir (Ellis vd., 2008). Önceki çalışmalarda görüldüğü üzere vücut ağırlığının düzenlenmesinde hipotalamik nöropeptidlerin rolleri türe, gelişime ve fotoperiyota bağlı olarak değişmekte ve farklı gen ekspresyonları sergilemektedir.

Uzun ve kısa fotoperiyotta beslenme rejimleri karşılaştırıldığında, NPY ve AgRP'nin mRNA ekspresyonu, özellikle geceye kısıtlama gruplarında daha fazla eksprese

olduğu görülmektedir. Bu durum nokturnal zelliikte olan Suriye hamsterlerde besin tüketiminin yoğun bir Şekilde karanlık fazda gerŐekleŐmesiyle aÇıklanabilir. Besinin varlığı ya da yokluğu sirkadiyen ritmi etkileyebilir (Haupt vd., 2021; Patton ve Hastings 2018). Enerji homeostazının düzenlenmesi ve sirkadiyen ritim doğal olarak birbirine bağlıdır. NPY ve AgRP nöronlarının aktivitesini düzenleyen beslenmeyle ilgili hormonların (rn. leptin, ghrelin ve insülin) dolaşımdaki seviyeleri stabil değildir (Deem vd., 2022). Bu hormonlar, aydınlık-karanlık döngüsüyle ya da beslenme ile ilgili döngüleri takip ederler (Oster vd., 2006). Buna göre besin alımını gündüze veya geceye sınırlamak sirkadiyen ritimleri etkileyebilir.

Bu ŐalıŐmada, beslenme ve fotoperiyot gibi maternal faktörlerin, yavrunun hipotalamik nöropeptidler olan NPY/AgRP'nin gen ekspresyonunun, gelişimin 30. gününe kadar nasıl değişim gösterdiği ortaya konmuştur. Uzun ve kısa fotoperiyot gruplarındaki yavrularda, NPY/AgRP'nin gen ekspresyonu ve protein miktarındaki farklılığın melatonin hormonunun etkisinin olduğu düşünülmektedir. Melatoninin, besin alımı ile ilişkili nöropeptid genlerin üzerinde etkili olduğu ve yavruların geliŐim sürecini önemli lŐde etkiliyor görünmektedir. SonuÇlar, gelişimin Çok erken dönemlerinde beslenmedeki deđiŐikliklerin ve fotoperiyodun yavruların, NPY/AgRP gen ekspresyonu ve protein miktarı üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

BEŞİNCİ BÖLÜM BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmamızda, beslenme ve fotoperiyot gibi maternal faktörlerin yavrunun, hipotalamik nöropeptitleri olan NPY/AgRP'nin gen ekspresyonuna, etkilerini belirlemek için gelişimin 30. gününe kadar araştırılmıştır. Maternal transfer aracılığıyla besinsel iletme bağlı olarak uzun ve kısa fotoperiyotta yer alan yavrularda besin tüketimi ve vücut ağırlığı açısından gruplar arasında önemli farklılık belirlenmiştir. Önemli çevresel faktörlerden biri olan fotoperiyot, bazı türlerde vücut ağırlığı düzenlemelerini mükemmel bir şekilde kontrol etmektedir.

Çalışmamızda, özellikle uzun ve kısa fotoperiyottaki NPY/AgRP'nin mRNA ekspresyonu ve protein miktarındaki farklılık kısa gün uzunluğunda daha fazla salınan melatonin hormonunun etkisinin olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle besin kısıtlaması uygulanan yavruların, gelişimin erken dönemlerinden itibaren melatonin hormon seviyelerinde belirlenmesi uygun olacaktır. Besin alımı ile ilişkili olan leptin, insülin ve ghrelin hormonlarının seviyelerinin fetal gelişimi sırasında belirlenmesi, hipotalamik nöropeptidler olan NPY/AgRP davranışlarını anlatmada çok önemli katkı sağlayacaktır. Bununla birlikte, farklı fotoperiyotlardaki diğer genlerin (POMC veya CART) ekspresyon profillerinin ayrıntılı değerlendirmesi, zamansal dinamiklerden etkilenebilecek karşılaştırmaların yapılmasını olanaklı hale getirebilecektir. Bu tür örneklemeler, literatürdeki bazı tutarsızlıkları açıklayabilir; burada aydınlık veya karanlık fazda örnekleme zamanlarındaki küçük bir fark, uzun/kısa fotoperiyot karşılaştırmalarının sonucu üzerinde önemli bir etkiye sahip olabilir.

Araştırmalarımıza göre beslenmenin, günün çeşitli saatlerinde ve emzirme döneminde yavrular üzerinde etkisinin daha fazla olduğu belirlenmiştir. Yavrularda metabolik bozukluk riskinin, annenin yanlış beslenme programı veya yetersiz beslenmesiyle arttığı bilinmektedir. Bulgularımız, enerji metabolizmasına yeni bir bakış açısı sunabilir, metabolik hastalık sürecini yeniden şekillendirebilir ve yaşamın erken evrelerinde beslenme yaklaşımlarını kullanarak erken hastalık önleme ve tedavi için yeni hedefler belirleyebilir. Hamilelik boyunca etkili olan anneye ait faktörler, yavrunun

nöronal gelişimini etkiler ve yaşam boyunca beslenme nöropeptit genlerinin ekspresyonunun programlanmasını düzenleyebilir. Bu nedenle beslenme zamanlaması dışında gebelikle ilgili faktörleri de dikkate alacak ek araştırmaların yapılması gerekecektir.



KAYNAKÇA

- Aponte, Y., Atasoy, D., Sternson, S. M. (2011). “AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training”. *Nature Neuroscience*, 14: 351–355.
- Baldock, P. A., Lee, N. J., Driessler, F., Lin, S., Allison, S., Stehrer, B. ve Herzog, H. (2009). “Neuropeptide Y knockout mice reveal a central role of NPY in the coordination of bone mass to body weight”. *Plos One*, 4(12), e8415.
- Baltacı, A. K. ve Mogulkoc, R. (2012). “Leptin and zinc relation: in regulation of food intake and immunity”. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 16 (Suppl 3), S611-S616.
- Balthasar, N., Coppari, R., McMinn, J., Liu, S.M., Lee, C.E., Tang, V., Kenny, C.D., McGovern, R. A., Chua, S. C., Elmquist, J. K. (2004). “Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis”. *Neuron*, 42, 983–991.
- Baraban, S. C. (1998) “Neuropeptide Y and limbic seizures”. *Reviews in the Neurosciences*, 9, 117–128.
- Bartness, T. J. ve Wade G. N. (1984). “Photoperiodic control of body weight and energy metabolism in Syrian Hamsters (*Mesocricetus auratus*): role of pineal gland, melatonin, gonads, and diet”. *Endocrinology*, 114: 492–498.
- Bi, S., Robinson, B. M. ve Moran T. H., (2003). “Acute food deprivation and chronic food restriction differentially affect hypothalamic *NPY* mRNA expression”. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 285: 1030–1036.
- Bhathena, J., Kulamarva, A., Martoni, C., Urbanska, A. M., Malhotra, M., Paul, A., Prakash, S. (2011). “Diet-induced metabolic hamster model of nonalcoholic fatty liver disease”. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 195-203.
- Blouet, C. ve Schwartz, G. J. (2010). “Hypothalamic nutrient sensing in the control of Energy Homeostasis”. *Behavioural Brain Research*, 209(1), 1-12.

- Bouret, S. G. (2009). "Early life origins of obesity: role of hypothalamic programming". *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 48, 31-38.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Brown, A. M., Mayfield, D. K., Volaufova, J., Argyropoulos, G. (2001). "The gene structure and minimal promoter of the human agouti related protein". *Gene*, 277 (1–2): 231–8.
- Černelič-Bizjak, M., Kenig, S., Petelin, A., Jenko-Pražnikar, Z. ve Mohorko, N. (2023). "Link between emotional and external eating behaviors, peripheral neuropeptide Y, and β -hydroxybutyrate in participants with obesity on 12-week ketogenic diet". *Nutrition and Health*, 02601060231154464
- Chen, Y. ve Knight, Z. A. (2016). "Making sense of the sensory regulation of hunger neurons". *Bio Essays*, 38, 316–324.
- Choi, J. S. (2018). "Effects of maternal and post-weaning high-fat diet on leptin resistance and hypothalamic appetite genes in sprague dawley rat offspring". *Clinical Nutrition Research*, 7(4), 276-290.
- Clarke, G. S., Gatford, K. L., Young, R. L., Grattan, D. R., Ladyman, S. R. ve Page, A. J. (2021). "Maternal adaptations to food intake across pregnancy: central and peripheral mechanisms". *Obesity*, 29(11), 1813-1824.
- Cone, R. D. (2005). "Anatomy and regulation of the central melanocortin system". *Nature Neuroscience*, 8, 571–578.
- Coupé, B., Grit, I., Darmaun, D. ve Parnet, P. (2009). "The timing of "Catch-Up Growth" affects metabolism and appetite regulation in male rats born with intrauterine growth restriction". *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 297(3), R813-R824.
- Cowley, M.A., Smart, J. L., Rubinstein, M., Cerdan, M. G., Diano, S., Horvath, T. L., Cone R. D. ve Low M. J. (2001). "Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus". *Nature*, 411: 480–484.

- da Silva, R. K. B., de Vasconcelos, D. A. A., da Silva, A. V. E., da Silva, R. P. B., de Oliveira Neto, O. B. ve Galindo, L. C. M. (2022). “Effects of maternal high-fat diet on the hypothalamic components related to food intake and energy expenditure in mice offspring”. *Life Sciences*, 120880.
- Deem, J. D., Faber, C. L. ve Morton, G. J. (2022). “AgRP neurons: regulators of feeding, energy expenditure, and behavior”. *The FEBS Journal*, 289(8), 2362-2381
- Desai, M., Gayle, D., Babu, J. ve Ross, M. G. (2005). “Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by newborn nutrition”. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 288(1), R91-R96.
- Desai, M. ve Ross, M. G. (2020). “Maternal-infant nutrition and development programming of offspring appetite and obesity”. *Nutrition Reviews*, 78(Supplement 2), 25-31.
- Díaz, E., Debeljuk, L., Arce, A., Esquifino, A. ve Díaz, B. (2000). “Prenatal melatonin exposure affects luteinizing hormone and hypothalamic and striatal Neuropeptide Y in the male rat offspring”. *Neuroscience Letters*, 292(3), 143-146.
- Elliott, J. A. ve Goldman, B. D. (1989). “Reception of photoperiodic information by fetal siberian hamsters: role of the mother's pineal gland”. *Journal of Experimental Zoology*, 252: 237–244.
- Ellis, C., Moar, K. M, Logie T. J., Ross, A. W., Morgan, P. J. ve Mercer, J. G. (2008). “Diurnal profiles of hypothalamic energy balance gene expression with photoperiod manipulation in the Siberian Hamster, *Phodopus Sungorus*”. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 29: 1148-1153.
- Elmqvist, J. K., Elias C. F. ve Saper C. B. (1999). “From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight”. *Neuron*, 22 (2): 221–232.
- Friedman, J. (2016). “The long road to leptin”. *Journal of Clinical Investigation*, 126, 4727–4734.
- Fukami, T, Sun, X, Li T, Desai, M. ve Ross, M. G. (2012). “Mechanism of programmed obesity in intrauterine fetal growth restricted offspring: paradoxically enhanced

- appetite stimulation in fed and fasting states”. *Reproductive Sciences*, 2012 Apr;19(4):423-30.
- Fukasaka, Y., Nambu, H., Tanioka, H., Obata, A., Tonomura, M., Okuno, T. ve Yukioka, H. (2018). “An insurmountable NPY Y5 receptor antagonist exhibits superior anti-obesity effects in high-fat diet-induced obese mice”. *Neuropeptides*, 70, 55–63.
- Gao, W., Liu, J. L., Lu, X. ve Yang, Q. (2021). “Epigenetic regulation of energy metabolism in obesity”. *Journal of Molecular Cell Biology*, 13(7), 480-499.
- Ghilardi, N., Ziegler, S., Wiestner, A., Stoffel, R., Heim, M. H. ve Skoda, R. C. (1996). “Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93: 6231–6235.
- Greenman, Y., Kuperman, Y., Drori, Y., Asa, S. L., Navon, I., Forkosh, O., Gil, S., Stern, N. ve Chen, A. (2013). “Postnatal ablation of POMC neurons induces an obese phenotype characterized by decreased food intake and enhanced anxiety-like behavior”. *Molecular Endocrinology*, 27, 1091–1102.
- Grindstaff, J. L., Brodie, E. D. ve Ketterson, E. D. (2003). “Immune function across generations: Integrating mechanism and evolutionary process in maternal antibody transfer”. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270, 2309–2319.
- Guyton, A. C. “*Tıbbi Fizyoloji*”. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi, 2006.
- Gündüz, B. (2002). “Daily rhythm in serum melatonin and leptin levels in the syrian hamster (*Mesocricetus auratus*)”. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 132,393-401.
- Gündüz, B., Stetson, M. H., (2003). “Maternal transfer of photoperiodic information in Siberian hamsters. vi. effects of time-dependent 1-hr melatonin infusions in the mother on photoperiod-induced testicular development of her offspring”. *Journal of Pineal Research*, 34,727-225.
- Güneş, Z., (2013). “Identification of obesity related genes AgRP (Agouti Related Peptide) and NPY (Neuropeptide Y) expressions in food deprived/restricted Syrian

- Hamsters (*Mesocricetus auratus*)". PhD Dissertation (Yüksek Lisans Tezi). Çanakkale Onsekiz Mart University, Çanakkale, Turkey.
- Hales, C. N. ve Barker D. J. (1992). "Type 2 (Non-Insulindependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis". *Diabetologia*, 35, 595-601.
- Haupt, S., Eckstein, M. L., Wolf, A., Zimmer, R. T., Wachsmuth, N. B. ve Moser, O. (2021). "Eat, train, sleep-retreat hormonal interactions of intermittent fasting, exercise and circadian rhythm". *Biomolecules*, 11(4), 516.
- Kasim-Karakas, S. E., Vriend, H., Almario, R., Chow, L. C. ve Goodman, M. N. (1996). "Effects of dietary carbohydrates on glucose and lipid metabolism in golden syrian hamsters". *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 128(2), 208-213.
- Kauwell, G. P. A. (2005). "Emerging concepts in nutrigenomics: a preview of what is to come". *Nutritional Clinical Practice Journal*, 20, 75–87.
- Koletzko, B., Godfrey, K. M., Poston, L., Szajewska, H., Van Goudoever, J. B., De Waard, M. ve Zalewski, B. M. (2019). "Nutrition during pregnancy, lactation and early childhood and its implications for maternal and long-term child health: the early nutrition project recommendations". *Annals of Nutrition and Metabolism*, 74(2), 93-106.
- Krashes, M. J., Koda, S., Ye, C., Rogan, S. C., Adams, A. C., Cusher, D. S., Maratos-Flier, E., Roth, B.L. ve Lowell B. B. (2011). "Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice". *The Journal of Clinical Investigation*, 121, 1424.
- Lemke, H., Coutinho, A., ve Lange, H., (2004). "Lamarckian inheritance by somatically acquired maternal IgG phenotypes". *Trends in Immunology*, 25, 180–186.
- Lim, K., Zimanyi, M. A., Black, M. J. (2006). "Effect of maternal protein restriction on cardiac fibrosis and capillarization in adulthood in rats". *Pediatric Research*, 60, 83-87.
- Lu X. Y., Sheih, K. R., Kabbaj, M., Barsh, G. S., Akil, H. ve Watson, S. J., 2002. "Diurnal rhythm of agouti-related protein and its relation to corticosterone and food intake". *Endocrinology*, 143: 3905–3915.

- Mani, B. K., Zigman, J. M., (2017). “Ghrelin as a survival hormone”. *Trends Endocrinology Metabolizm*, 28, 843–854.
- Mariano, I. R., Yamada, L. A., Soares Rabassi, R., Rissi Sabino, V. L., Bataglini, C., Azevedo, S. C. S. F., Pedrosa, M. M. D. (2020). “Differential responses of liver and hypothalamus to the nutritional condition during lactation and adult life”. *Frontiers in Physiology*, 11, 553.
- Martin-Gronert, M. S., and Ozanne, S. E. (2006). “Maternal nutrition during pregnancy and health of the offspring”. *Biochemical Society Transactions*. 34, 779–782.
- McNay, D. E., Briançon, N., Kokoeva, M. V., Maratos-Flier, E., & Flier, J. S. (2012). “Remodeling of the arcuate nucleus energy-balance circuit is inhibited in obese mice”. *The Journal of clinical investigation*, 122(1), 142-152.
- Meli R., Pacilio, M., Mattace G. ve ark., 2004. “Estrogen and raloxifene modulates leptin and its receptor in hypothalamus and adipose tissue from ovariectomized rats”. *Endocrinology*, 145: 3115-3121.
- Mercer, J. G., Moar, K. M., Ross, A. W., Hoggard, N. ve Morgan, P. J., (2000). “Photoperiod regulates arcuate nucleus POMC, AGRP, and leptin receptor mRNA in siberian hamster hypothalamus”. *American Journal of Physiology*. 278: 271–281.
- Morley, J. E., (1987). “Neuropeptide regulation of appetite and weight”. *Endocrine Reviews*, 8(3):256-87.
- Morris, M. J., & Chen, H. (2009). “Established maternal obesity in the rat reprograms hypothalamic appetite regulators and leptin signaling at birth”. *International Journal of Obesity*, 33(1), 115-122.
- Nguyen, A. D., Mitchell, N. F., Lin, S., Macia, L., Yulyaningsih, E., Baldock, P. A., Enriquez, R.F., Zhang, L., Shi, Y.-C., Zolotukhin, S., (2012). “Y1 and Y5 receptors are both required for the regulation of food intake and energy homeostasis in mice”. *PLoS One* 7, e40191.
- Oster, H., Damerow, S., Kiessling, S., Jakubcakova, V., Abraham, D., Tian, J., Hoffmann, MW., Eichele, G., (2006). “The circadian rhythm of glucocorticoids is regulated

- by a gating mechanism residing in the adrenal cortical clock”. *Cell Metabolism*, 4, 163–173.
- Ollmann, M. M. ve Wilson, B. D. (1997). “Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein”. *Science*, 278: 135–138.
- Palou, M., Sánchez, J., Rodríguez, A. M., Priego, T., Picó, C., & Palou, A. (2009). “Induction of NPY/AgRP orexigenic peptide expression in rat hypothalamus is an early event in fasting: relationship with circulating leptin, insulin and glucose”. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 23(1-3), 115-124.
- Park, H. J., Kim, J. H., Shim, I., (2019). “Anti-obesity effects of ginsenosides in high-fat diet-fed rats”. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 25, 895–901.
- Patton, A. P. ve Hastings, M. H. (2018). “The suprachiasmatic nucleus”. *Current Biology*, 28(15), R816-R822.
- Poher, A. L., Tschöp, M. H., Müller, T. D. (2018). “Ghrelin regulation of glucose metabolism. *Peptides*, 100, 236-242.
- Qu, D., Ludwig, D. S., Gammeltoft, S., Piper, M., Pelleymounter, M. A., Cullen, M. J., Maratos-Flier, E. (1996). “A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour”. *Nature*, 380(6571), 243-247.
- Qiu, B., Bell R. L., Cao, Y., Zhang, L., Stewart, R. B., Graves T., Lumeng L., Yong W., Liang T. (2016). “Npy deletion in an alcohol non-preferring rat model elicits differential effects on alcohol co consumption and body weight”. *Journal of Genetic and Genomics*, Jul 20;43(7):421-30.
- Rajia, S., Chen, H., Morris, M. J. (2013). “Voluntary post weaning exercise restores metabolic homeostasis in offspring of obese rats”. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 23(6), 574-581.
- Refinetti, R. ve Menaker, M. (1992). “The circadian rhythm of body temperature”. *Physiology and Behaviour*, 51: 613-637.
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Korkmaz, A., & Ma, S. (2012). “Obesity and metabolic syndrome: association with chronodisruption, sleep deprivation, and melatonin suppression”. *Annals of medicine*, 44(6), 564-577.

- Reiter, R. J. (1993). “The melatonin rhythm: both a clock and a calendar”. *Experientia*, 49(8), 654-664.
- Rio, D. C, Ares M, Hannon G. J, Nilsen T. W. (2010). “Purification of RNA using TRIzol (TRI Reagent)”. *Cold Spring Harb Protoc.* 5(6):1–4.
- Ross, M. G. ve Desai, M. (2014). “Developmental programming of appetite/satiety”. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 64(Suppl. 1), 36-44.
- Routh, V. H. (2010). “Glucose sensing neurons in the ventromedial hypothalamus”. *Sensors*, 10(10), 9002-9025.
- Ruf, T., Stieglitz, A., Steinlechner, S., Blank, J.L. ve Heldmaier, G. (1993). “Cold-exposure and food restriction facilitate physiological-response to short photoperiod in Djungarian Hamsters (*Phodopus sungorus*)”. *Journal of Experimental Zoology*, 267: 104-112.
- Sainsbury, A., Schwarzer, C., Couzens, M., Jenkins, A., Oakes, S.R., Ormandy, C.J., Herzog, H. (2002). “Y4 receptor knockout rescues fertility in ob/ob mice”. *Genes Development*, 16, 1077–1088
- Saper, C.B., Lu J., Chou, T.C. ve Gooley, J., (2005). “The hypothalamic integrator for circadian rhythms”. *Trends in Neurosciences*, 28 (3): 152–157.
- Schütz, B., Schäfer, M. H., Eiden, L. E., Weihe, E. (1998). “VIP and NPY expression during differentiation of cholinergic and noradrenergic sympathetic neurons”. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 865(1), 537-541.
- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D. J., Seeley, R. J. ve Baskin, D. G. (2000). “Central nervous system control of food intake”. *Nature*, 404: 661–671.
- Stuart, B. ve Panico, L. (2016). “Early-childhood BMI trajectories: evidence from a prospective, nationally representative British cohort study”. *Nutrition & Diabetes*, 6(3), e198-e198.
- Stütz A. M., Staszkiwicz J., Ptitsyn A. ve Argyropoulos G., (2007). “Circadian expression of genes regulating food intake”. *Obesity (Silver Spring)*, 15: 607–615.
- Sucajtyś-Szulc, E., Goyke, E., Korczyńska, J., Stelmanska, E., Rutkowski, B., Swierczyński, J. (2009). “Refeeding after prolonged food restriction differentially

affects hypothalamic and adipose tissue leptin gene expression". *Neuropeptides*, 43(4), 321-325.

- Takahashi, K. A., Cone, R. D., (2005). "Fasting induces a large, leptin-dependent increase in the intrinsic action potential frequency of orexigenic arcuate nucleus neuropeptide Y/Agouti-related protein neurons". *Endocrinology*. 146, 1043–1047.
- Tan, K., Knight, Z. A., Friedman, J. M., (2014). "Ablation of AgRP neurons impairs adaption to restricted feeding". *Molecular Metabolism*, 3, 694–704.
- Teubner, B. J., Keen-Rhinehart, E., Bartness, T. J. (2012). "Third ventricular coinjection of subthreshold doses of NPY and AgRP stimulate food hoarding and intake and neural activation". *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 302(1), R37-R48.
- Timper, K., Brüning, J. C., (2017). "Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity". *Disease Models & Mechanisms*, 10, 679–689.
- Toda, C., Santoro, A., Kim, J. D., Diano, S., (2017). "POMC neurons: from birth to death". *Annual Review of Physiology*, 79, 209–236.
- Tschop, M., Smiley, D. L. ve Heiman, M. L., (2000). "Ghrelin induces adiposity in rodents". *Nature*, 407: 908–913.
- Varela, L., Stutz, B., Song, J. E., Kim, J. G., Liu, Z. W., Gao, X. B., Horvath, T. L. (2021). "Hunger-promoting AgRP neurons trigger an astrocyte-mediated feed-forward autoactivation loop in mice". *The Journal of Clinical Investigation*, 131(10).
- Vohra, M. S., Benchoula, K., Serpell, C. J., ve Hwa, W. E. (2022). "AgRP/NPY and POMC neurons in the arcuate nucleus and their potential role in treatment of obesity". *European journal of pharmacology*, 915, 174611.
- Wang, Y., Kayoumu, A., Lu, G., Xu, P., Qiu, X., Chen, L. Ve Liu, G. (2016). "Experimental models in syrian golden hamster replicate human acute pancreatitis". *Scientific Reports*, 6(1), 1-10.
- Wanlong, Z., Di, Z., Dongmin, H., Guang, Y. (2017). "Roles of hypothalamic neuropeptide gene expression in body mass regulation in *Eothenomys miletus*

- (Mammalia: Rodentia: Cricetidae)". *The European Zoological Journal*, 84:1, 322-333, DOI: 10.1080/24750263.2017.1334840.
- Wauman, J., Zabeau, L., Tavernier, J. (2017). "The leptin receptor complex: heavier than expected?" *Frontiers in Endocrinology*. 8, 30.
- Wei, W., Pham, K., Gammons, J. W., Sutherland, D., Liu, Y., Smith, A., ve Connell, K. (2015). "Diet composition, not calorie intake, rapidly alters intrinsic excitability of hypothalamic AgRP/NPY neurons in mice". *Scientific Reports*, 5(1), 1-10.
- White, J. D. ve Kershaw M. (1990). "Increased hypothalamic Neuropeptide Y expression following food deprivation". *Molecular and Cellular Neuroscience*, 1: 41-48.
- Wolden-Hanson, T., Mitton, D. R., Mc Cants, R. L., Yellon, S. M., Wilkinson, C. W., Matsumoto, A. M., ve Rasmussen, D. D. (2000). "Daily melatonin administration to middle-aged male rats suppresses body weight, intraabdominal adiposity, and plasma leptin and insulin independent of food intake and total body fat". *Endocrinology*, 141(2), 487-497.
- Wood, A. D. ve Bartness, T. J. (1996). "Food deprivation-induced increases in hoarding by Siberian hamsters are not photoperiod-dependent". *Physiology & Behavior*, 60(4), 1137-1145.
- Wu, Q., Howell, M. P., Palmiter, R. D. (2008). "Ablation of neurons expressing agouti-related protein activates fos and gliosis in postsynaptic target regions". *Journal of Neurosciences*. 28, 9218-9226.
- Xu, B., Kalra, P. S., Farmerie, W. G. ve Kalra, S. P. (1999). "Daily changes in hypothalamic gene expression of neuropeptide y, galanin, pomc, and adipocyte leptin gene expression and secretion: effects of food restriction". *Endocrinology*, 140: 2868-2875.
- Yannielli, P. C., Harrington, M. E. (2001). "Neuropeptide Y in the mammalian circadian system: effects on light-induced circadian responses". *Peptides*, 22(3), 547-556.
- Zambrano, E., Bautista, C. J., Deas, M., Martinez-Samayoa, P. M., Gonzalez-Zamorano, M., Ledesma, H., and Nathanielsz, P. W. (2006). "A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex-and window of exposure-specific effects on

offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat". *The Journal of Physiology*, 571(1), 221-230.



