

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

**AÇLIK VE OBEZİTE MODELİ OLUŞTURULAN SIÇANLARDA
TANISİT PLASTİSİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Proje No:TDA-2015-5617

Proje Türü
Dış Kaynaklı ACİP

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Asuman Gölgeli
Tıp Fakültesi/Fizyoloji

Doç. Dr. Nihal Hatipoğlu
Tıp Fakültesi/Pediyatrik Endokrinoloji
Yard. Doç. Dr. Arzu Hanım Yay
Tıp Fakültesi/Histoloji Emriyoloji
Arş. Gör. Dr. Ertuğrul Keklik
Tıp Fakültesi/Fizyoloji
Arş. Gör. Erdem Başaran
Tıp Fakültesi/Fizyoloji

Ağustos 2015
KAYSERİ

İÇİNDEKİLER

Tablo ve Şekil Listesi.....	iv
Teşekkür.....	vi
Özet.....	vii
Abstract.....	viii
Giriş.....	1
Literatür Özeti.....	2
Gereç ve Yöntem.....	6
3.1 Deney Hayvanları.....	6
3.2 Yüksek Yağlı (Kalorili) Diyet Model Oluşturulması.....	7
3.3 Açlık Modeli Oluşturulması.....	7
3.4 Açık Alan Deneyleri.....	7
3.5 Sıcak Plaka Testi (Hot Plate).....	7
3.6 Kuyruk Çekme Testi (Tail Flick).....	8
3.7 von Frey Flament Testi (von Frey).....	8
3.8 Üç Panelli Pist Testi (Three Panel Runway Task).....	9
3.9 Biyokimyasal ve Hormon Analizleri.....	10
3.10 Histolojik Doku Takip Yöntemi.....	10
3.11 İmmunohistokimya Boyama Protokolü.....	10
3.12 Immunoflouresan Boyama Protokolü.....	11
3.13 İstatistiksel Analiz.....	12
3.13.1 Açık Alan Parametrelerinin Değerlendirilmesi.....	12
3.13.2 Hot Plate,Tail Flick ve von Frey Testleri Parametrelerinin Değerlendirilmesi.....	12

3.13.3 Üç Panel Testi Değerlendirilmesi.....	12
3.13.4 Kanda Biyokimya ve Hormon (Eliza Yöntemi ile) Değerlendirilmesi.....	12
3.13.5 Histoloji Dokuları İmmunofluoresan Boyama Değerlendirilmesi.....	12
Bulgular.....	12
4.1 Davranış Deneyleri	13
4.2 Ağrı Eşiği Değerlendirme.....	14
4.3 Duyusal Performans Değerlendirme.....	15
4.4 Referans Bellek Değerlendirme.....	16
4.5 Çalışan Bellek Değerlendirme.....	17
4.6 Kanda Biyokimya ELİZA kitDeğerlendirilmesi.....	19
4.7 Histoloji doku takibi.....	23
4.7.1 Hemotoksilen Eozin boyama.....	23
4.7.2 MAP-2 ve Vimentin immunreaktif yoğunluğu.....	24
4.7.3 Nestin immünofloresan boyama.....	26
Tartışma/Sonuç.....	29
Kaynaklar.....	31
Ekler	

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Tablo 1. Deney gruplarında açık alan test düzeneğinde çizgi geçme sayısı, şahlanma sayısı, kaşınma sayısı ve defekasyon sayısını.....	14
Tablo 2. Deney gruplarında Hot Plate (sn) ve Tail Flick (sn) süreleri.....	15
Tablo 3. Deney gruplarında von Frey kalınlık (mm) ve von Frey ağırlık (gr) analizi.....	16
Tablo 4. Deney gruplarının üç panel testinde referans bellek yeme ulaşma süresi (sn)....	17
Tablo 5. Deney gruplarının üç panel testinde çalışan bellek yeme ulaşma İçin harcanan süre.....	18
Tablo 6. Deney gruplarında çalışma sonunda intrakardiyak alınan kanda glikoz, trigliserit ve kolesterol değerleri.....	19
Tablo 7. Kan serumunda Leptin, İnsülin ve Ghrelin miktarının deney gruplarında değerlendirilmesi.....	21
Tablo 8. Deney grupları histoloji dokuları immunofluoresan boyama.....	25
Şekil 1. Şekil 1. Kognitif fonksiyonların değerlendirildiği üç panel test düzeneği.....	9
Şekil 2. Deney gruplarındaki sıçanların 14 hafta ortalama ağırlıkları (gram).....	13
Şekil 3. Deney gruplarında açık alan test düzeneğinde çizgi geçme, şahlanma, kaşınma ve defekasyon sayısı.....	14
Şekil 4. Deney gruplarında Hot Plate (sn) ve Tail Flick (sn) süreleri.....	15
Şekil 5. Deney gruplarında von Frey kalınlık (mm) ve von Frey ağırlık (gr) analizi.....	16
Şekil 6. Deney gruplarında üç panel testinde referans bellek yeme ulaşma süresi (sn)....	17
Şekil 7. Deney gruplarının üç panel testinde çalışan bellek yeme ulaşmada süresi.....	18
Şekil 8. Deney gruplarında çalışma sonunda intrakardiyak alınan kanda glikoz değerleri...	20
Şekil 9. Deney gruplarında çalışma sonunda intrakardiyak alınan kanda trigliserit değerleri..	20

Şekil 10. Deney gruplarında çalışma sonunda intrakardiyak alınan kanda kolesterol değerleri.....	21
Şekil 11. Kan serumunda Leptin miktarının deney gruplarında değerlendirilmesi.....	22
Şekil 12. Kan serumunda İnsülin miktarının deney gruplarında değerlendirilmesi.....	22
Şekil 13. Kan serumunda Grelin miktarının deney gruplarında değerlendirilmesi.....	23
Şekil 14. Deney gruplarında Hematoksilen-eozin boyama metodları uygulama sonrası 3.ventrikül çevresi hücreler	24
Şekil 15. Deney gruplarında MAP-2 primer antikoru uygulanan 3. Ventrikül çevresi hücreler.....	25
Şekil 16. Deney gruplarında Vimentin primer antikoru uygulanan 3. Ventrikül çevresi hücreler.....	26
Şekil 17. Nestin Boyama Kontrol Grubu Sıçanda	27
Şekil 18. Nestin Boyama Açlık Grubu Sıçanda.....	27
Şekil 19. Nestin Boyama Yüksek Kalori Grubu Sıçanda.....	27
Şekil 20. Deney gruplarında histoloji MAP-2 immunoreaktivite yoğunluğu.....	28
Şekil 21. Deney gruplarında histoloji Vimentin immunoreaktivite yoğunluğu.....	28
Şekil 22. Deney gruplarında histoloji Nestin immunoreaktivite yoğunluğu.....	29

TEŞEKKÜR

Bu proje 114S009 nolu aynı isimli TÜBİTAK tarafından kabul edilen Hızlı destek projesine ek destek sağlamak amacı ile Dış Kaynaklı Projelere acil ihtiyaç projesi olarak BAP tarafından kabul edilmiştir. BAP birimine teşekkür ederiz.

ÖZET

Üçüncü ventrikül duvarını ve tabanını döşeyen epandimal hücre grubu içinde yer alan tanisitlerin diğer hücrelerden morfolojik farklılıklarının tesadüf olmadığı bu hücrelere farklı fonksiyonlar yüklenebileceği görüşleri ağırlık kazanmaktadır. Tanisitlerin büyüleyici özelliklerinden biride iştah ve enerji homeostazını kontrol eden hipotalamik nükleuslara doğru uzantılarını yönlendirmeleri ve buradaki nöronlar ile yakın temasta olmalarıdır. Tanisitlerin enerji homeostazının kontrolüne bir şekilde katıldığı fikri bundan dolayı çok çekicidir. Bu fikir uzun zamandır tamamen kuramsal (spekülatif) olmasına rağmen yakın zamanda yapılan çalışmaların kanıtları; tanisitlerin kemosensör hücreler olarak görev yapabilmesi, diyet-duyarlı yetişkin kök hücreleri olarak fonksiyon göstermesi, vücut ağırlığının kontrolü ile ilişkili gen ekspresyonundaki bulgular gün geçtikçe destek bulmaktadır. Üçüncü ventrikül duvarındaki tanisitlerin beslenmenin kontrolü ve enerji dengesinin düzenlenmesinden sorumlu nöronlarla ilişkisi, beslenme koşullarının değiştiği durumlarda bu hücre grubuna özel plastisitenin (morfoloji,içerik ve dağılımın değişmesi) gelişmesine neden olabilir. Beslenmenin düzenlenmesinde tanisitlerin muhtemel rollerine açıklık getirebilmek için açlık ve obezite modelleri oluşturulan sıçanlarda, tanisit plastisitesini araştırmayı amaçladık. Aç bıraktığımız ve/veya obezite oluşturduğumuz sıçanlarda tanisit popülasyonunda, morfolojisinde, içerik ve dağılımında gösterilebilir bir değişiklik (plastisite) bu hücre grubuna yüklenen spekülatif fonksiyonlara netlik kazandırması açısından oldukça önemlidir. Bu projede;

1. 72 saat sıçanların sadece su alımına izin verip, yiyecek alımını engelleyerek total açlık modeli oluşturduk.
2. Bir başka grup sıçanda yüksek yağlı diyetle 10 hafta besleyerek obezite modeli oluşturduk.
3. Açlık ve obezite modeli oluşturulan sıçanlara ve ağırlık değişmesi oluşturulmayan kontrol sıçanlara; tanisit uzantılarının sonlandığı hipotalamus nükleuslarının diğer beyin bölgeleri (beyin sapı, ön beyin, ödül/ceza merkezleri) ile olan bağlantılarından dolayı nöronal plastisitenin göstergesi olarak; davranış deneyleri, duysal, öğrenme ve hafıza testleri uyguladık, böylece kognitif fonksiyonları değerlendirdik.
4. Merkezi sinir sistemi fonksiyonlarını değerlendirdiğimiz yukarıdaki testler sonrasında sıçanların beyinleri çıkarılıp histolojik boyama ve immünofloresans yöntemle hipotalamus kesitlerinde nöron ve tanisitler inceleyerek, kontrol sıçan görüntüleri ile karşılaştırılarak açlık ve obezitede tanisit plastisitesini araştırdık.

Anahtar Kelimeler: tanisitler, açlık, obezite modeli, uzamsal öğrenme-hafıza,plastisite, davranış

ABSTRACT

The conceptions that the morphologic differences between tanycytes and the other types of cells which belong to the ependymal cell group lining the floor and wall of third ventricle of the brain are not just a coincidence and that the tanycytes may also differ in their functions gain attention. Sending the projections to the hypothalamus nuclei which control appetite and energy homeostasis and having close contact with the neurons of these nuclei is one of the fascinating features of the tanycytes. Accordingly, the idea of the tanycytes being involved in the control of energy homeostasis in a kind of way is quite interesting. Although this idea is totally theoretical (speculative), it is gradually supported by the recent finding that the tanycytes may serve as chemosensor cells, functions as diet- sensitive adult stem cells and have the gene expression associated with the control of body weight. In the cases of the change in nutritional conditions, the relationship between the tanycytes on the wall of the third ventricle and the neurons responsible for the control of feeding and energy balance may induce the plasticity of this specific cell group (tanycytes). In order to clarify the possible role of the tanycytes in the regulation of feeding, we aim to investigate the plasticity of the tanycytes in rat models which are made starved and obese. In order to clarify speculative functions that are attributed to this cell group, demonstrable change on tanycyte population or morphology (plasticity) on the rats that we left hungry and/or create obesity is critical. In this project,

1. Make the starved(fasting) model by allowing the rats to take only water and preventing food intake for 72 hours.
 2. Make the model of obesity by feeding another group of rats with high-carbohydrate diet for 10 weeks.
 3. Evaluate the neuronal plasticity by behaviour, sensory-motor performance experiments, learning and memory tests on the rat models of starvation and obesity, and on the control of rats in which there are no changes in weight.
 4. After the tests stated above that evaluate the functions of the nervous system, the brains of the rats will be removed, and the neurons and tanycytes in the cross section of the hypothalamus will be examined by histological dyeing, immunofluorescence and immunohistochemical method and will be decided whether the plasticity develops in the tanycytes at starvation and obesity by comparing with those of the control rat group.
- Keywords:** tanycytes, fasting animal model, obesity animal model, spatial learning-memory, behaviour, plasticity, rat

1.GİRİŞ

Üçüncü ventrikül duvarında yer alan tanisit hücrelerinin açlık ve obezite modeli geliştirilen sıçanlarda plastisite gösterip göstermediğinin araştırılması bu çalışmanın amacını oluşturmaktadır. Tanisit morfolojisi, ve dağılımında mikroskopik yöntemlerle gözlenebilir farklılıkların açlık ve obezite durumuna göre ortaya çıkması, bu hücre grubunun beslenmenin regülasyonunda fonksiyon yüklenebileceğini gösterir.

Bu amaçla 72 saat sadece su almasına izin verip, yiyecek alması engellenerek orta şiddette açlık modeli geliştirilen sıçanların, 10 hafta süreyle yüksek kalorili diyetle beslenerek ağırlık artışına sebep olunan, obezite modeli oluşturulan sıçanların ve beslenme protokolleri değiştirilmeyip, enerji metabolizmasında değişiklik oluşturulmayan sağlıklı sıçanların hepsinde önce merkezi sinir sistemi fonksiyonları değerlendirilecektir. Tanisit uzantılarının sonlandığı hipotalamus nukleuslarının diğer beyin bölgeleri (beyin sapı, ön beyin, ödül/ceza merkezleri) ile olan bağlantıları dolayısıyla metabolizmadaki değişikliklere bağlı olarak nöronal plastisitenin de değişmesi beklenmektedir. Nöronal plastisitedeki değişikliklerin göstergesi olarak; davranış, duysal ve motor performans değerlendirmeleri, referans ve çalışan bellek ve uzamsal öğrenme ile kognitif fonksiyonlardaki değişimler gösterildi. Davranış (açık alan parametreleri, lokomotor aktivite, otonom fonksiyonlar, keşif davranışı), uzamsal öğrenme ve bellek (referans ve çalışan bellek), duysal uyaranlara verilen cevaplar (ağrı eşiği, somatik duyu değerlendirmesi, allodini varlığı) açlık, obezite ve kontrol grubu sıçanlarda karşılaştırıldı.

Çıkarılan beyin dokusunun üçüncü ventriküler bölge, hipotalamus nükleusları, subventriküler yapılar, median eminens ve infundibulum hipotalamusu içeren kesitlerine Periodic Acid Schiff (PAS) Boyama, ve İmmünofloresans Boyama Protokolleri uygulanarak mikroskopik analizleri yapıldı. PAS boyamada hücrelerin apikal yüzeylerinde mikrovillusların varlığı, dağılımı gösterildi. İmmünofloresans yöntemler ile araflament proteinlerinden olan mikrotübül ilişkili protein (MAP-2), vimentin proteininin varlığı ve dağılımı, embrinonal hayatta özellikle artan, yetişkin nörogenezinde göstergesi olan nestin proteininin ekspresyonu açlık, obezite ve kontrol sıçan hipotalamus kesitlerinde karşılaştırılarak tanisit plastisitesinin gelişip gelişmediğine karar veriledi.

Planlanan çalışmanın bir başka hedefi de; her grubun kan glukoz, kortizon, yağasitleri, insulin, grelin ve leptin hormonları seviyesinin ölçülüp nöronal plastisite (merkezi sinir sistemi fonksiyonları) ve glial plastisite (tanisit morfolojisi) ile ilişkilendirildi.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Beyin bir yandan besin alınmasını kontrol ederek enerji dengesini düzenlerken diğer yandan otonom sinir sisteminin de dahil olduğu nörohumoral mekanizmaları kullanarak enerjinin harcanması ve depolanmasını sağlar Rui (2013). Yağ dokusu-bağırsak-beyin ekseninde yiyecek alımının kısa ve uzun süreli düzenlemeleri mevcuttur Konturek vd. (2004). Pankreatik hormonlardan insulin ve glukagonun enerji düzenlenmesi ve glukoz homeostazi için beyindeki farklı nöron grupları üzerinden farklı sinyalleme yolları ile birbirinin etkisini tamamlayarak beslenme davranışını düzenlediği öngörülmektedir Filippi vd. (2013).

Yeme davranışının nasıl başlayıp sonlandığını anlamak bu davranışın adaptasyonunun bozulduğu anoreksia ve obezite gibi beslenme bozukluklarını anlamada önemli ipuçları sunar Smeets vd. (2012). İştah artışı ile başlayan obezite vücudun gereksiniminden fazla enerji içeren gıda alımı nedeniyle yağ dokusu oranında artış olması ve bunun sonucunda da vücut ağırlığının artması olarak tanımlanmaktadır Dina (2008). Özellikle günümüzde hızla artan obezitenin neden olduğu komplikasyonlar tip 2 diyabet ve kardiyovasküler problemlerden kansere kadar uzanan geniş bir dağılım gösterir Romao ve Roth (2008).

İştah ve enerji metabolizmasının kontrolünde hipotalamusta arkuat nükleus önemli rol oynarlar ve periferden gelen uyarıları, beyin sapında, nükleus traktus solitarius gastrointestinal sistem (GIS)'den gelen uyarıları alan merkezlerdir. Arkuat nükleusta iki hücre grubu yer alır ve birbirleriyle ters yönde fonksiyon gösterirler Naslund (2007). Bir grup nöron nöropeptid Y (NPY), Agouti-related peptide (AgRP)'di içeren oroksijenik (iştah artırıcı) peptitleri eksprese eden nöron grubu ve diğeri proopiomelanocortin (POMC) ve kokain ve amferamin düzenleyici transkrip (CART) içeren anoreksijenik (iştah azaltıcı) peptitlerin eksprese olduğu nöron grubudur. Bu hücreler, üzerlerindeki peptid hormon reseptörleri ile leptin ve insülin tarafından da kontrol edilirler Ahima ve Antwi (2008). NPY inhibe edilirken, POMC uyarılır. Bu karmaşık sistemin her aşamada eksiksiz çalışması iştahın kontrolü için önemlidir POMC nöronlar hipotalamusun diğer bölgeleri paraventriküler nükleus (PVN), ventromedial nükleus (VMN) ve lateral hipotalamik nükleus (LHA)'daki sekonder düzenleyici nöronlara aksonal uzantılarını gönderirler. Adı geçen bu merkezlerde hipotalamusun iştah kontrolünde rol alırlar. PVN, VMN ve DMN'un hasarı iştah artışı ile giden ağır obeziteye neden olurken LHA hasarı hipofaji ve kilo kaybına neden olur Yu ve Kim (2012).

Periferik hormonlardan olan ve yağ dokusundan sentezlenen leptin anoreksijenik POMC nöronlarını uyarır ve orexigenic nöropeptid Y (NPY) nöronlarını inhibe ederek iştahı baskılar

Suzuki vd. (2012). Açlık durumunda ise tam tersi etki gösterir. Bu geri besleme devresi normal enerji homeostazının sürdürülmesi için gerekli olsa da, obezite de leptin direnci gelişir ve bu devrenin regülasyonunda bozulma meydana gelir. Aynı hipotalamik nükleuslar üzerinden etkilerini gösteren diğer hormonlar ise insulin ve ghrelindir. Leptin gibi periferik yağ dokusu hakkında bilgi ileten ve benzer etki gösteren insulin daha çok enerji metabolizmasındaki akut değişikliklere cevap verir, açlıkta mideden salınan ghrelinin ise oroksijenik etkiye sahip gastrointestinal sistemden köken alan tek hormondur (Benoit 2004; Kojima 1999; Álvarez-Castro 2013).

Yaşam kalitesine olan olumsuz etkileri yanında, yüksek morbidite ve mortaliteye sahip obezitenin patogenezi araştırmak için yapılan çalışmalarda hayvan modelleri yakın zamanlarda literatürlerde yer almaya başlamıştır Kanasaki ve Koya (2011). Bununla birlikte hayvanlarda oluşturulan obezite modellerinin hiçbirisi insan obezitesine tam olarak eşdeğer tutulamaz. Farelerde en fazla çalışılan iki obezite modeli yüksek yağlı diyetle indüklenen (HFD-indüklenen) diyetle oluşan obesite (DIO) ve daha ciddi sonuçların ortaya çıktığı leptin eksikliğine bağlı obezite modelidir. Yüksek yağlı diyet (HFD) tüketimi veya leptin eksikliği ile sekonder obezite gelişen farelerde hipotalamik nöronların plastisitesi incelenmiş, yüksek yağlı diyetle indüklenen obeziteli fare hipotalamusunda, nöronal kayba neden olmaksızın erişkin nörojenезin inhibe edildiği gösterilmiştir. Yüksek yağlı diyet ile beslenen ve nörojenезi baskılanmış bu farelerde daha az yeni nöron oluşumu gözlenirken eski nöronların ise korunduğu bulunmuştur. Nöronların bu şekilde baskılanması ise yeni oluşan nöronların artan apoptozu ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. Obez fareler aynı zamanda diyabetiktir ve diyabetiklerinde aynı zamanda hipokampusta erişkin nörojenезin inhibe olduğu gösterilmiştir. Aynı şekilde araştırmacılar, leptin eksikliğinin farede azalan nörojenезi ile postnatal (doğum sonrası dönem) leptinin hipotalamik nörojenезi düzenlediğini göstermişlerdir. Yazarlar leptinin hipotalamik kök hücre havuzunun kurulması için gerekli olduğunu vurgulamışlardır McNay vd. (2012).

Santral sinir sisteminin diğer bölgelerinde olduğu gibi enerji dengesinin regülasyonundan sorumlu hipotalamik devrelerde de benzer sinaptik plastisite (sinaps sayısında, salınan transmitter miktarında, postsinaptik cevabı oluşturan aktivasyon eşiğinde değişiklikler) görülür. Beslenme durumunun değiştiği şartlarda (aşırı kalorik yağlı diyetle veya yiyecek kısıtlamasına maruz kalma) aynı sinyal farklı hücreler ve fizyolojik cevaplar açabilir. Melanokortin devrelerinde, POMC nöronlarında, NPY-AgRP nöronlarında yeniden yapılanmalar nöronal geri beslemenin değişmesi metabolik bozukluklar ve patolojik tablolara (obezite, diabet gibi) neden olur Zeltser vd. (2010).

Besin duyarlı hipotalamus nöronlarının plastisite gösterdiği, metabolik şartlar ve diyet içeriği gibi nöronal dış çevreyi değiştiren faktörlerden etkilendiği, aşırı besin alımının bu duyarlılığı bozduğu ve regülasyon mekanizmalarındaki zayıflamaya bağlı olarak obezite geliştiği bildirilmiştir. Hücre plastisitesinin enerji metabolizmasıyla ilişkilendirildiği bu çalışmada, astrositlerinde besin duyarlı nöronlar gibi beslenme hormonları ve moleküllerine duyarlı olduğu bildirilmiş, ancak tanisitlerden bahsedilmemiştir Blouet ve Schwartz (2010).

Arkuat nükleustaki iştahtan sorumlu NPY/AgRP/GABA nöronları ve doygunluktan sorumlu POMC/CART nöronları metabolik şartların değişmesine bağlı olarak (yüksek yağlı diyetle beslenmedeki pozitif enerji dengesi, yiyecek alımının azaldığı, engellendiği negatif enerji dengesi, leptin ve ghrelin uygulamalarında) diğer nöronlarla ve birbirleriyle yaptıkları sinapslarda ve bu bölgede yer alan glialarla olan bağlantılarında sinaptik plastisitenin gösterildiği diğer çalışmaların sonuçları derlenerek sunulmuş, ancak bu şartlar altında tanisitlerde plastisite gelişip gelişmediğinden hiç bahsedilmemiştir Dietrich ve Horvath (2013).

Beslenme davranışının regülasyonunda pürinerjik sinyalleme araştırıldığı çalışmada, 18 saat aç bırakılan sıçanlarda ATP/ADP analogları ve adenosinin intraserebraventriküler infüzyonuyla yiyecek alımının arttığı ancak purinerjik reseptör antagonistlerinin önceden uygulanması durumunda bu etkinin ortadan kalktığı gösterilmiştir Kittner vd. (2006). Aynı çalışmada ekstraselüler nükleotidlerin immunohistokimyasal çalışmayla VMH nöronlarındaki pürinerjik reseptörler üzerinden etki gösterebileceği bildirilmiş ancak bu sinyallemede tanisitlerden hiç bahsedilmemiştir.

Glia benzeri olan ve III. Ventrikülü döşeyen tanisitler hipotalamusun vücut ağırlığını ve enerji balansını kontrol eden ağların komponentleri olarak görülmektedir. Serebrospinal sıvı ile temas halindedir uzantılarını ise arkuat ve ventromedial hipotalamus nükleuslarıyla yakın ilişki kuracak şekilde gönderir. Ependimal hücreler kabaca kübik, bir çok silia ve sadece bir tane çok kısa bir uzantıya sahiptir. Tersine tanisitler silia içermez, mikrovilli veya diğer apikal özelleşmiş yapılar içerir ve beyin parankimine uzanan uzun bir çıkıntısı vardır Mathew (2008). Bu hücreler lokalizasyonuna göre ve biyokimyasal ve moleküler özelliklerine göre $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ ve $\beta 2$ olmak üzere 4 gruba ayrılırlar. $\alpha 1$ ve $\alpha 2$, VMN da yer alırken, $\beta 1$ üçüncü ventrikülün daha aşağı lateral duvarlarında lokalizedir, uzantıları ile arkuat nükleustaki nöronlarla hipotalamusdaki kapillerle olduğu gibi iletişim halindedir. $\beta 2$ tanisitler diğerlerinden farklıdır, çünkü median eminensde bulunan fenestralı kan-beyin bariyeri aracılığıyla dolaşan plazmaya direk girişe sahiptir Rodriguez vd. (2005). Tanisit uzantıları birkaç yüz mikron uzunluğundadır. Bu uzantıların hipotalamusda kapiller ve arterioller ile yakın ilişkide olduğu bulunmuştur.

Tanisitlerin en büyüleyici özelliği ise iştah ve enerji homeostazını kontrol eden nükleuslara doğru uzantılarını yönlendirmeleri ve bu nükleuslardaki nöronlar ile yakın temas halinde olmalarıdır. Tanisitlerin enerji homeostazının kontrolüne bir şekilde katıldığı fikri bundan dolayı çok çekicidir. Bu fikir uzun zamandır tamamen kuramsal (spekülatif) olmasına rağmen tanisitlerin kemosenör hücreler olarak, diyet-duyarlı yetişkin kök hücreler olma fikri ve vücut ağırlığının kontrolü ile ilişkili gen ekspresyonundaki değişiklikler için sürpriz yeri artan kanıtlarla desteklenmektedir.

Dişi wistar sıçanlarda III. Ventrikül ependimal hücresi tanisitlerde ATP yi parçalayan enzim ATPaz varlığının gösterilmesi, bu hücrelerin bir çok maddeyi beyin omurilik sıvısı (BOS) dan aktif transportla taşıma özelliğine sahip olabileceği hipotalamus nöronları ile ventrikül arasında köprü görevi göreceği fikrini oluşturmuştur Firth (1976). Üçüncü ventrikülde BOS ile temas eden tanisitler hipotalamusun beslenmeden sorumlu arkuat nükleus, VMN ve PVN'lara uzantılar gönderdiği ve bu nöronların da glukozu duyarlı oldukları bilinmektedir.

Ayrıca tanisitlerde glukoz taşıyıcısı GLUT2 protein varlığı fare beyinde immunohistokimya ve konfokal mikroskopik yöntemlerle gösterilmiştir Garcia vd. (2003), Bir başka çalışmada tanisitlerin glukozu verdiği cevap çalışılmış, ATP aracılıklı intrasellüler Ca^{+2} artışı gösterilmiştir. Tanisitlerden glukozu cevap olarak ATP salgılandığı, glukozun metabolize olmayan analoglarına da benzer cevap verdikleri gösterilmiş ve böylece bu hücrelerin glukozu duyarlı hücreler olduğu düşüncesi desteklenmiştir Frayling vd. (2011). Yapılan çalışmalarda hipotalamik tanisitlerin glukosensör gibi davrandığı, artan glukozu kolaylaştırılmış diffzyonla hücre içine aldığı ve tıpkı pankreas beta hücresinde olduğu gibi ATP/ADP oranının artırarak K-ATP kanallarını kapattığı ve bu şekilde sinyal oluşturduğu gösterilmiştir. Tanisitlerde intrasellüler glukoz alımına cevaben salınan ATP nin konneksin kanalları aracılığı ile olabileceği araştırılmıştır Orellana vd. (2012). Pankreatik β hücreleri gibi glukozu parçalayan glikokinaz enzimi de hipotalamusta bulunmuş, ancak bu enzim nöron ve glialarda değil enteresan bir biçimde tanisitlerde eksprese edildiği RT-PCR, immunoblotting yöntemleri ile gösterilmiştir Millan vd. (2010). Hipotalamusun glukoz duyarlılığını içeren mekanizmalardan biri de glia-nöron arasında laktat aracılığı ile olan metabolik etkileşimdir.

Tanisitlerin glikolitik mekanizmayla glukozdan laktat ürettikleri bunu da komşu nöronlara aktardıkları görüşü, tanisitlerde laktat salınımına neden olan monokarboksilat taşıyıcılarının (MCT1 ve MCT4) varlığı, bu tanisitlerin uzantılarının sonlandığı arkuat nükleusun beslenmeden sorumlu oreksijenik ve anoreksijenik nöronlarında laktat alımından sorumlu taşıyıcı protein MCT2 ifade edildiğinin gösterilmesiyle önem kazanmıştır (Campos vd. 2011; Campos vd. 2013). Hem α hem de β tanisitler glukoz taşıyıcısı (GLUT2) ve ATP-duyarlı

K⁺(KATP) kanallarını içeren hipotalamus aracılıklı glukoz duyarlılığında yeralan glukoz-duyarlı maddeleri eksprese ederler. BOS' la direk temas halinde olan β 1 tanisitlerde GLUT2 ve glukokinaz ekspresyonu gerçekleşir, yüksek derecede glukoz alımı yaparlar, glikolitik yolla glukozu laktata metabolize ederler ve MCTs aracılığı ile AN daki nöronlara laktatı taşırlar.

Proöstrous döneminde ratlarda Gonadotropin saliverici hormon terminallerinin sonlandığı tuberal hipotalamusta median eminense yeralan tanisitlerin son ayakları arasında 5-6 saat süren yeniden yapılanmanın gösterilmesi çevre şartlarına bağlı olarak tanisit ve nöronal plastisitesinin oluştuğunu kanıtlar Prevot vd. 2010). Tanisitlerin benzer plastisiteyi metabolik değişikliklere bağlı olarakta göstermesi beklenir.

Hipotalamik tanisitlerin kemosensitif hücreler gibi BOS daki değişimleri algılayıp, intrasellüler Ca²⁺ artışı ile ATP salgıladığı ve tanisit-nöron haberleşmesinde pürinerjik sinyallemenin önemi yapılan çalışmalar ışığında tartışılmış, tanisitlerin metabolik durumun değişmesi ile fonksiyonunun değişebileceği, nöronlarla astrositler gibi direk olarak haberleşeceği ve bunların sonucu olarak tanisitlerin beslenme davranışını kontrol edebileceğinin araştırılması gerektiği bildirilmiştir Dale (2011)

Adolesan dönemde yüksek yağlı diyetin (HFD) uzun vadeli kilo alımına neden olduğu çok sayıda çalışmalarla gösterilmiştir. Doğum sonrası yetişkin farelerde bromodeoksiüridin (BrdU) işaretleme metodu ile fare hipotalamusunda çoğalan hücreler sayılmış, medyan eminensin üçüncü ventrikülünde diğer hipotalamik bölgelere oranla BrdU + ependimal hücre tabakasında önemli bir artış olduğu gözlenmiştir. Bu çoğalan hücrelerin β 2-tanisit hücreleri olduğu nestin, Sox2 ve vimentin işaretleyicileri ile gösterilmiştir Lee vd. (2012). Tanisitlerin kültür ortamında ve beyin slaytlarında ortamın glukoz dengesindeki değişikliklere verdiği cevaplar incelenmiş, α tanisitlerin açlıkta, β tanisitlerin fazla yağlı diyetle prolifer olduğu kök hücre niteliği taşıdığı gösterilmiş, aşağıdaki soruların cevap beklediği vurgulanmıştır Bolborea ve Dale (2013).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Deney Hayvanları

Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinden temin edilen 36 adet Wistar türü yetişkin erkek albino sıçan kullanıldı. Sıçanların ortalama ağırlığı çalışmaya başlamadan önce ve deneyler sırasında ve çalışma tamamlandıktan sonra tartılarak kaydedildi. Günün 07:00-19:00 saatleri arası aydınlık 19:00-07:00 karanlık olacak şekilde otomatik gün döngüsü oluşturulan, ortamın sıcaklığı ortalama 25 °C, nem oranı %40-

50 arasında olacak şekilde klima ile sağlanan ortamlarda tutuldu. Kontrol sıçanlar standart sıçan yemi (AYTEKİNER, Türkiye) ile beslenip, su alımı kısıtlanmadı.

3.2 Yüksek Yağlı (Kalorili) Diyet Model Oluşturulması

Hayvanların % 20 yüksek kalorili diyetle beslemek için yüksek yağlı diyet modeli uygulandı. Bu diyetle beslenmesi için 100 gr normal standart pelet yeme 19 gram erimiş tereyağı ve 1 gram soya yağı emdirildikten sonra bir gün açık havada kurutulmuş Woods vd. (2003) yem hazırlandı; hayvanların 14 hafta boyunca bu yemle beslenmesi sağlandı. Hayvanların yem miktarında ve su alımında kısıtlama yapılmadı.

Hayvanlar %45 yağlı özel kırmızı yem ile 14 hafta boyunca bu yemle beslenmesi sağlandı.

3.3 Açlık Modeli Oluşturulması

72 saat boyunca sıçanların su alımı serbest bırakılıp yiyecek alımı engellenecek, akut ve total açlık oluşturuldu Şahin (2013).

3.4 Açık Alan Deneyleri

Deney hayvanlarının davranış parametrelerini elde etmek için kullanılır, 100x100x30 cm ebatlarında, zemini çizgilerle 16 eşit kareye ayrılmış (ortadaki 4 kare merkezi bölge, kenarlardaki 12 kare periferik bölge olarak kabul edilir) pleksiglastan yapılmış üstü açık, kare şeklinde bir düzendi Parent vd. (2012). Deney hayvanı açık alan düzeneğinin orta kısmına bırakılır. Değerlendirme için sıçanların beş dakikalık test süresince lokomotor aktive olarak, toplam kat ettikleri mesafe, keşif davranışı olarak; arka ekstremitelerin üzerine yükselme sayısı, otonomik fonksiyon olarak; kaçınma süresi ve sayısı, hareketsiz kalma (donma) süre ve sayısı , defekasyon sayısı belirlendi. Görüntülü kayıt sistemi ile aynı esnada merkezde ve periferde geçirdiği toplam süre periferden merkeze ve merkezden perifere geçiş süreleri sayı, sn cinsinden değerlendirildi.

3.5 Sıcak Plaka Testi (Hot Plate)

Ağrı eşiği değerlendirmek için kullanılır Eddy ve Leimback (1953). Isı kaynağı, zamanlayıcı ve güç kaynağından oluşan, 27.5 x 22.5 cm ebatlarında, kare şeklinde bir düzenektir ve rodentlerin ağrı eşiğinin değerlendirilmesinde halen en çok kullanılan yöntemlerdendir. Temel olarak 50-56°C'ye kadar ısıtılmış bir yüzeyden (bakır veya alüminyum) oluşur. Hayvanın ısıtılan yüzey üzerinde belli bir bölge sınırlarında kalması için hareket kabiliyetini sınırlamayacak büyüklükte cam veya pleksiglas silindirler kullanılır. Yüzeye bırakılmasından

hayvanın arka ayağını çekmesine kadar olan süre hesap edildi. Belirli bir süre bu düzenek içine konulan hayvanın, levhanın ısınması ile yalama, sıçrama gibi davranışları sayılır ve değerlendirildi. Literatürde en çok kullanılan yöntemlerden biri olmasına rağmen hayvanın ağrıyı algıladığı gözlemlene kriteri çeşitlilik gösterir, hangi davranışın ağrı belirtisi olarak kabul edileceği konusunda sorunlar vardır ve zor bir deney metodudur.

Davranış sadece arka ayağın çekilmesi olabileceği gibi ayak çekme ve yalama, sallama veya sıçrama şeklinde olabilir. Nadiren hayvan sadece ön ayaklarını yalayabilir veya ön ayaklarla başlayan reaksiyon arka ayağın yalanmasıyla sonlanabilir South ve Smith (1998). Bir farenin normal reaksiyon süresi ortalama 5 ile 20 saniye arasında değişir. Doku hasarına neden olacağı için test 60 sn'den fazla uygulanmamalıdır. 60 sn kadar tepki vermeyen sıçanlar zemin üzerinden çekilmelidir. Her iki davranışın da supraspinal olarak tamamlanan tepkiler olduğu düşünülür. Testin duyarlılığı, sıcaklığın azaltılması ve ilk uyarılan davranışın reaksiyon zamanının ölçülmesi ile artırılabilir, reaksiyon zamanındaki değişiklik anksiyolitik etki için belirleyicidir.

3.6 Kuyruk Çekme Testi (Tail Flick)

Ağrı eşiği tayininde kullanılır D'Amour ve Smith (1941). Ortam ısısı 20-21 °C olan sessiz bir odada gerçekleştirilirdi. Denek hayvanları kuyrukları dışarıda kalacak şekilde sıkıştırılır ve tail flick cihazından kuyrukları ışık uygulanan bölgeye yerleştirilirdi. Stimülasyonun başlaması ve kuyruk çekilmesi arasındaki zaman kuyruk çekme (tail-flick) süresi olarak ölçüldü. Kuyruğun çekilmesiyle ışık kaynağı ve süre durur. Reaksiyon süresinin uzaması analjezik etki olarak yorumlandı. Kuyruğun 20 sn den fazla ışık kaynağına maruziyeti, ciltte oluşabilecek yanık nedeniyle tavsiye edilmemektedir. Tail-Flick testi, spinobulbo- spinal nöral yapıların katıldığı kompleks bir reflekstir South ve Smith (1998).

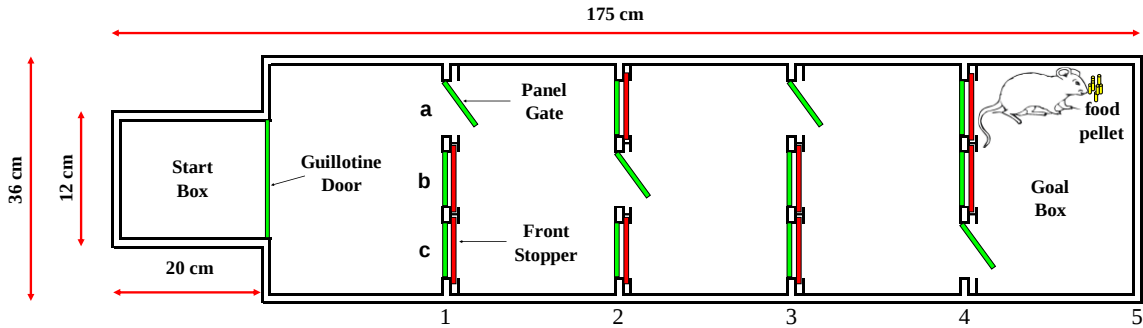
3.7 von Frey Flament Testi (von Frey)

Duyusal performansı test eder Osikowicz vd. (2013). Farklı kalınlıkta kılların ekstremiteye (bazen de farklı vücut yüzeylerine) teması ile deney hayvanının uyarana verdiği cevap esasına dayanır. Uyarıcı spesifik değildir. Serbest hareket eden denekte uygulama zordur. Düşük eşikli mekanoseptörleri de noziseptörler gibi aktive edilebilir. Sıçanlar zemini metal delikli telden oluşan, yan kısımları şeffaf mika ile kaplı bir düzeneğe yerleştirilirdi. Mekanik stimulus hayvanların arka pençe plantar yüzeyine yerleştirilirdi ve filamentler sırayla delikli metal zeminin altından uygulandı.

Her bir flament en düşükten başlanarak arka pençe tabanına giderek artan bir kuvvetle (2 g' dan 15 g' a kadar), hayvan pençesini çekene kadar basınç uygulanarak denendi. Geri çekme yanıtları, her ölçüm arasında 10 sn olacak şekilde üst üste 3 kez tekrarlandı. Geri çekme eşik değeri bu üç ölçümün ortalaması olan flament değeri olarak kabul edildi.

3.8 Üç Panelli Pist Testi (Three Panel Runway Task)

Uzamsal öğrenme ve referans bellek, çalışan bellek test edildi (Furuya vd. 1988; Matsumoto vd. 2004). Deney bir başlangıç kutusu, yiyecek pelet bulunan bir hedef kutusu ve dört ardışık seçim noktasından oluşan bir düzende gerçekleştirildi. Her bir seçim noktasında üç adet kapı bulunur. Bu kapılardan ikisi durdurucu kullanılarak sabitlenmiştir ve hayvanların geri dönmeleri bu durdurucu ile engellenmiştir. Hayvanlar hedefe ulaştıklarında iki adet yiyecek pelet bulmaktadırlar (**Sekil1**). Deney sırasında günde bir oturum (session) yapılmakta, bir oturum da altı denemeden (trial) oluşmaktadır. Denemeler arası hayvan iki dakika süreyle kafesine konularak dinlendirildi. Deneyin alıştırmaya aşamasında tüm durdurucular kaldırılır. Başlangıç kutusuna konulan hayvanın, hedef kutusunu bulması için gerekli süre (latensi) ortalama 20 saniyenin altına inince, deneyin ikinci aşamasına geçti. Bu aşamada seçim noktalarındaki kapılardan ikisi sabitlenmiştir ve sıçanın doğru kapıları öğrenmesi beklenildi. Çalışan bellek çalışmalarında, oturumlar arası açık kapı konumları değişirken, referans bellek çalışmalarında her gün kapı konumları sabittir. Sıçanın yeme ulaşana kadar yaptığı hatalı kapıdan geçme teşebbüs sayısı ve yeme ulaşana kadar geçen toplam süre kaydedildi. Her sıçan her gün 6 defa bu işleme tabi tutuldu. Hatalı kapı itirme sayısı üst üste 3 gün 6'nın altına indikten sonra sıçanlar öğrenmiş kabul edildi ve deneye alındı. Referans bellek (Reference Memory =Long term memory)-hata sayısı 6'nın altına inmeli, Çalışan bellek (Working Memory =Short term memory)-hata sayısı 12'nin altına inmeli. Açık kapının yeri her gün değiştirildi.



Şekil 1. Kognitif fonksiyonların değerlendirildiği üç panel test düzeneği

3.9 Biyokimyasal ve Hormon Analizleri

Alınan kan örneklerinde plazma glukoz konsantrasyonu, glukoz oksidaz metodu ile ölçülecek. Ketamin ve Xylazine karışımı ile anestezi yapılan sıçanlarda kardiyak kan alınacak, serum santrifüj sonrası ayrılıp analizler yapılana kadar -80 °C de saklanacak. Serum total kolesterol, trigliserit seviyeleri Aeroset yöntemi ile ticari kitler kullanılarak (Abbott, USA) saptanacak, serum insulin miktarı radyoimmunoassey yöntemi kullanılarak yine ticari rat kiti ile ölçülecek (Linco Research, St. Charles, MO, USA) analiz edilecektir. Grelin ve Leptin seviyesi ticari rat kiti (Uscn Life Science Inc., PRC ve Sunred Biological Technology, SRB/Shanghai) kullanılarak ELİSA yöntemi ile tayin edilecektir.

3.10 Histolojik Doku Takip Yöntemi

Çalışmada kullanılan deneklerin hayatlarına son verildikten sonra çıkarılan beyin dokuları 2 hemisfere ayrılarak tespit işlemi için %10'luk formaldehit içine alındı. Tespit solüsyonunda 72 saat bekleyen beyin dokuları akan musluk suyunda yıkandıktan sonra dereceli alkol serilerinden geçirilerek ksilol ile şeffaflaştırıldıktan sonra parafine gömülerek bloklama yapıldı. Doku hazırlama metodu Tablo 1 de verilmiştir.

Çalışmada kullanılan beyin dokularından alınan 5 µm'luk kesitler polilizin kaplı lamlara alındı. Hazırlanan lamlar standart histolojik takip yöntemi kullanılarak ksilol ile parafini uzaklaştırıldı ve dereceli alkol (%100, %96, %80, %70, %50) serilerinden geçirilip suda yıkandı. Genel histolojik yapının belirlenmesi amacıyla kesitler Hematoksilen-Eosin (HE) ile boyanarak önce artan alkol serilerinden daha sonra ksilolden geçirildi ve entellan kullanılarak lamel yardımıyla kapatıldı. HE boyama teknikleri Tablo 2 ayrıntılı şekilde verilmiştir.

3.11 İmmunohistokimya Boyama Protokolü

İmmunohistokimyasal boyama için %10'luk formalin fiksasyonu sonrası rutin takip ile hazırlanmış parafine gömülü dokulardan 5µm'luk kesitler dokuların dökülmemesi için poli-L-lizinle kaplı lamlara alındı. Kesitler, 60°C'lik etüvde 1 saat bekletildikten sonra 15 dakika ksilen ile deparafinize, daha sonra derecesi azalan alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edildi ve distile suda yıkandı. Kesitler 1mM sitrat buffer ile mikrodalga fırında 20 dakika kaynatılarak oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Dokular fosfat buffer saline (PBS) ile 10 dakika yıkandı. Spesifik olmayan boyamaları ve zemin boyamasını en aza indirmek için endojen peroksidaz aktivitesi hidrojen peroksit ile bloke edildi ve daha sonra 10 dakika PBS da yıkandı. Primer antikor damlatılarak +4°C'de bir gece inkübe edilmesi sağlandı.

İmmunohistokimyasal boyama için kullanılan kit, üretici firmanın kullanım talimatlarına uygun olarak kullanıldı. İmmunohistokimyasal boyama aşamalarından sonra dokular, azalan alkol serilerinden geçirilerek 15 dakika ksilende bekletildi ve daha sonra kapatma solüsyonu ile kapatıldı. İşlemlerin tamamı oda ısısında ve kesitlerin kurumaması için nemli ortamda gerçekleştirildi. Hazırlanan kesitler bir araştırma mikroskobunda (Olympus BX51) incelendi.

MAP-2 ve Vimentin antikorları için uygulanan immunohistokimya boyama prosedürü sonrası elde edilen dokularda korois plexus alanları belirlendi ve bu bölgede immunoreaktivite yoğunlukları Image J software programı kullanılarak yapıldı. Elde edilen veriler doğrultusunda istatistiksel analiz yapıldı.

3.12 Immunoflouresan Boyama Protokolü

Açlık ve obezite oluşturulan deney grubu ve kontrol grubu sıçanların beyin kesitlerinde immunoflouresan boyama prosedürü; Frozen cihazı ile alınan kesitler -80°C'de muhafaza edildi. İmmunoflouresan boyama için -80°C'den çıkarılan kesitler oda sıcaklığında 10 dk kurumaya bırakıldı. Sonra, %4 Paraformaldehit (PFA) içinde 10 dk fikse edildi. 3 defa 5'er dk fosphat buffer saline (PBS) içinde yıkanıp 10 dk %0,1 TritonX100' de bekletildi. Tekrar 3 kez 5'er dk PBS içinde yıkama basamağından sonra %10 normal goat serum damlatılan kesitler, 20 dk oda sıcaklığında bekletildi. Yıkama yapılmadan primer antikor damlatıldı. Primer antikor ile dokuların +4°C'de bir gece inkübe edilmesi sağlandı. Ertesi sabah PBS'de yıkanan kesitlere sekonder antikor damlatılarak oda sıcaklığında yaklaşık 60dk kadar bekletildi. Sekonder antikor aşamasından sonra kesitler PBS ile yıkanarak dokudaki bütün hücrelerin çekirdeklerinin görünür hale getirilebilmesi için 1 dk. DAPI uygulandı. Tekrar 3 kez 5'er dk PBS içinde yıkama yapıldı. Fluoromount medium ile kapatma işlemi gerçekleştirilerek immunoflouresan protokol tamamlandı ve flouresan mikroskop altında koroid pleksusa ait hücrelerin nestin immunoflouresan immunreaktiviteyi ölçüldü.

Nestin antikoruna için uygulanan immunoflouresan boyama prosedürü sonrası elde edilen dokuların immunoflouresan yoğunlukları Image J software programı kullanılarak yapıldı. Alınan veriler doğrultusunda istatistiksel analiz yapıldı.

3.13 İstatistiksel Analiz

İstatistik metodları IBM SPSS Statistic 21 paket programı kullanılarak yapıldı.

3.13.1 Açık Alan Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Grupların birbiriyle karşılaştırılması normallik testi uygulanarak parametrik testlerden (One-Way ANOVA)- Tukey testi ile değerlendirildi.

3.13.2 Hot Plate,Tail Flick ve von Frey Testleri Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Grupların birbiriyle karşılaştırılması normallik testi uygulanarak nonparametrik testlerden (One-Way ANOVA)- Tamhane testi ile değerlendirildi.

3.13.3 Üç Panel Testi Değerlendirilmesi

Grupların birbiriyle karşılaştırılması normallik testi uygulanarak parametrik testlerden (One-Way ANOVA)- Tukey testi ile değerlendirildi.

3.13.4 Kanda Biyokimya ve Hormon (Eliza Yöntemi ile) Değerlendirilmesi

Grupların birbiriyle karşılaştırılması normallik testi uygulanarak nonparametrik testlerden (One-Way ANOVA)- Tamhane testi ile değerlendirildi.

3.13.5 Histoloji Dokuları İmmunofluoresan Boyama Değerlendirilmesi

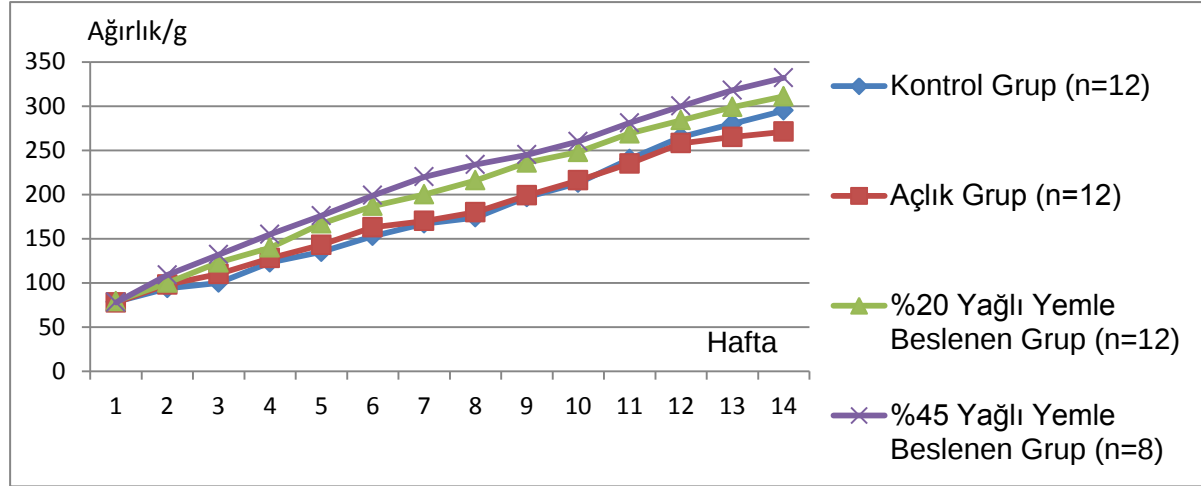
Histoloji dokuları immunofluoresan boyama gruplar arasında normallik testi uygulanarak nonparametrik testlerden (One-Way ANOVA)- Tamhane testi ile değerlendirildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmada açlık ve yüksek kalorili modeli oluşturulan Wistar Albino erişkin erkek sıçanlarda davranış parametrelerine olan etkisi; açık alan düzeneğiyle, hafıza ,referans ve çalışan belleğe etkisi; üç panel testle, ağrı eşiği değerlendirilmesi; hot plate ve tail flick testle ve duyuusal performans; von Fray filament testi ile değerlendirildi. Çalışma sonunda intrakardiyal alınan kanda glikoz, trigliserit ve kolesterol değerleri ve insulin, leptin, ghrelin hormonları analiz edildi. Doku perfüzyonu yapılarak hipotalamusun çıkarıldı ve kesitlerin

alındı. Alınan kesitlerde periodic acid schiff (PAS) boyama, immünofloresans boyama ve immünohistokimya boyama yöntemi uygulandı.

Deney gruplarındaki sıçanların çalışma başlangıcından, çalışma sonuna kadar geçen 14 hafta boyunca ortalama ağırlıkları (gram) **Şekil 2.**'de sunulmuştur.



Şekil 2. Deney gruplarındaki sıçanların 14 hafta ortalama ağırlıkları (gram). X eksenine gruptaki sıçanların ortalama ağırlıkları (gram), y eksenine süre (hafta)

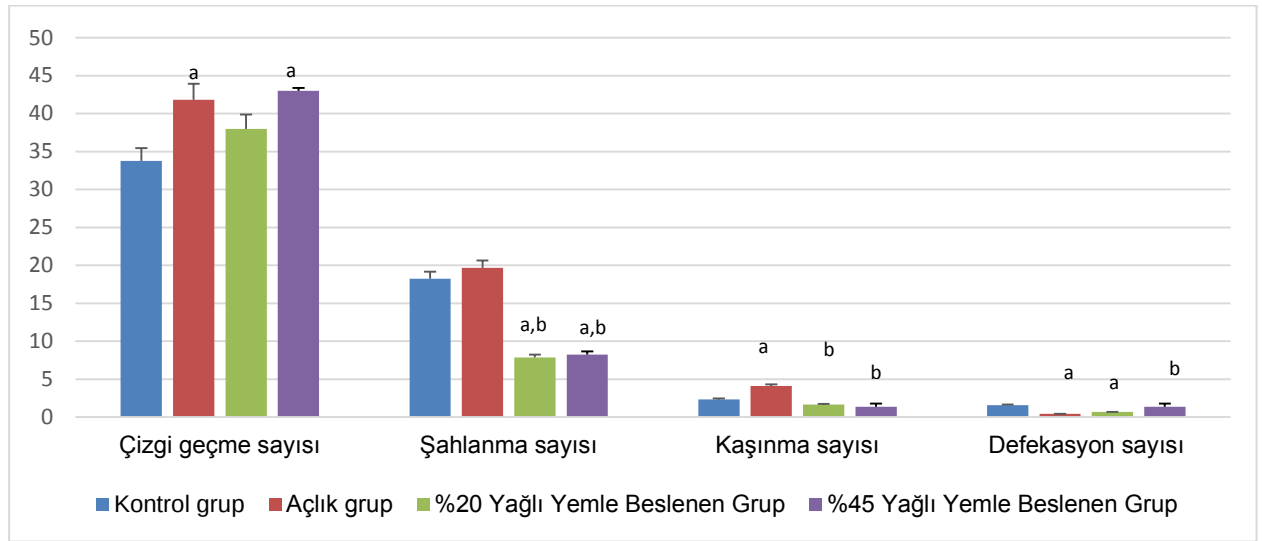
4.1 Davranış Deneyleri

Açık alan düzeneğinde deney gruplarındaki sıçanların davranışları değerlendirilip **Tablo 1.** ve **Şekil 3.**'de sunulmuştur. Çizgi geçme sayısı kontrol grubuna göre açlık grubunda ($p=0,008$) anlamlı olarak farklıdır ($p<0,05$). Şahlanma sayısı, kontrol ve açlık grubuna göre yüksek kalori grubunda ($p=0,001$) anlamlı olarak azdır ($p<0,05$). Kaşınma sayısı, açlık grubuna diğer gruplara göre anlamlı olarak farklıdır ($p<0,05$). Defekasyon sayısı, açlık ve yüksek kalori grubunda kontrol grubuna göre ($p=0,01$) anlamlı olarak azdır ($p<0,05$).

Tablo 1. Deney gruplarında açık alan test düzeneğinde çizgi geçme, şahlanma, kaşınma ve defekasyon sayısı

Grup	Kontrol Grup (n=12)	Açlık Grup (n=12)	%20 Yağlı Yemle Beslenen Grup (n=12)	%45 Yağlı Yemle Beslenen Grup (n=8)	p
Çizgi Geçme Sayısı	33,75±7,2	41,83±5,68 ^a	38,16±6,75	43,37±8,94 ^a	0,015
Şahlanma Sayısı	18,25±5,2	19,66±4,49	7,83±2,58 ^{a,b}	8,25±1,75 ^{a,b}	0,001
Kaşınma Sayısı	2,33±0,98	4,08±1,97 ^a	1,66±0,65 ^b	1,37±0,74 ^b	0,001
Defekasyon Sayısı	1,58±0,79	0,41±0,77 ^a	0,66±0,65 ^a	1,37±0,91 ^b	0,002

Ortalama ± standart sapma. p < 0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir. ^a Kontrol grubundan anlamlı olarak farklıdır. ^b Açlık grubundan anlamlı olarak farklıdır. ^c Yüksek kalori grubundan anlamlı olarak farklıdır.



Şekil 3. Deney gruplarında açık alan test düzeneğinde çizgi geçme, şahlanma, kaşınma ve defekasyon sayısı

Ortalama ± standart sapma. p < 0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir. ^a Kontrol grubundan anlamlı olarak farklıdır. ^b Açlık grubundan anlamlı olarak farklıdır. ^c Yüksek kalori gruplarından anlamlı olarak farklıdır.

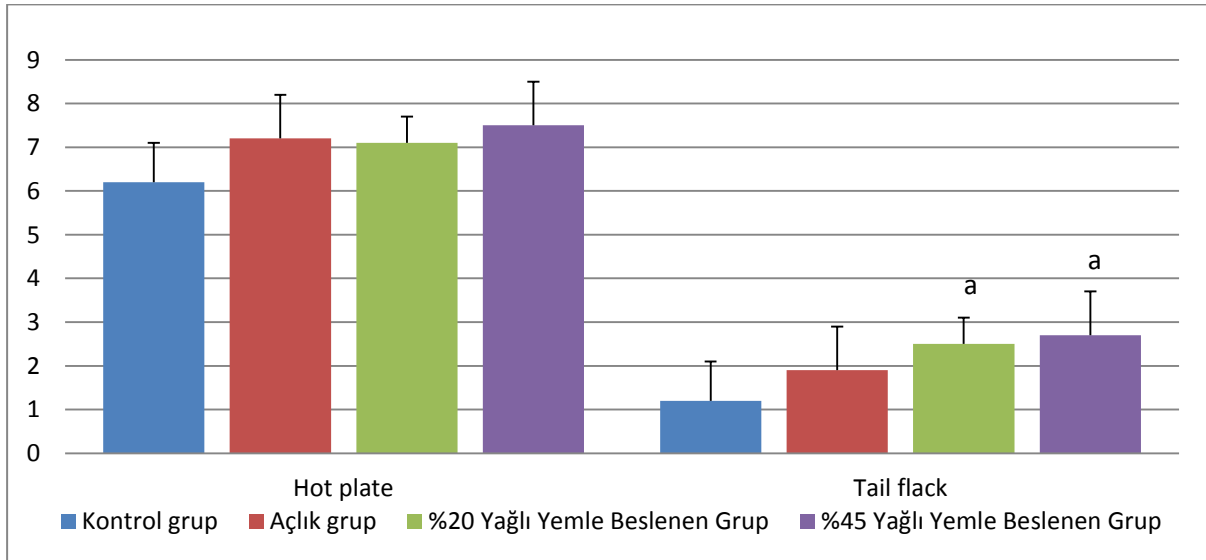
4.2 Ağrı Eşiği Değerlendirme

Ağrı eşiği değerleri **Tablo 2.** ve **Şekil 4.** 'de sunulmuştur. Hot plate testinde deney hayvanlarının ayaklarını yalama süresi (saniye) değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p>0,05$). Tail flick deney hayvanlarının kuyruk çekme süresi (saniye) değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre yüksek kalori grubunda ($p=0,035$) anlamlı olarak farklıdır ($p<0,05$).

Tablo 2. Deney gruplarında Hot Plate (sn) ve Tail Flick (sn) süreleri

Grup	Kontrol Grup (n=12)	Açlık Grup (n=12)	%20 Yağlı Yemle Beslenen Grup (n=12)	%45 Yağlı Yemle Beslenen Grup (n=8)	p
Hot plate (sn)	6,2±1,2	7,21±2,12	7,16±1,35	7,57±1,45	0,234
Tail flick (sn)	1,75±0,4	1,92±0,6	2,5±1,04 ^a	2,75±1,18 ^a	0,032

Ortalama ± standart sapma. $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir. ^a Kontrol grubundan anlamlı olarak farklıdır.



Şekil 4. Deney gruplarında Hot Plate (sn) ve Tail Flick (sn) süreleri

Ortalama ± standart sapma. $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir. ^a Kontrol grubundan anlamlı olarak farklıdır. x eksenı süre (saniye)

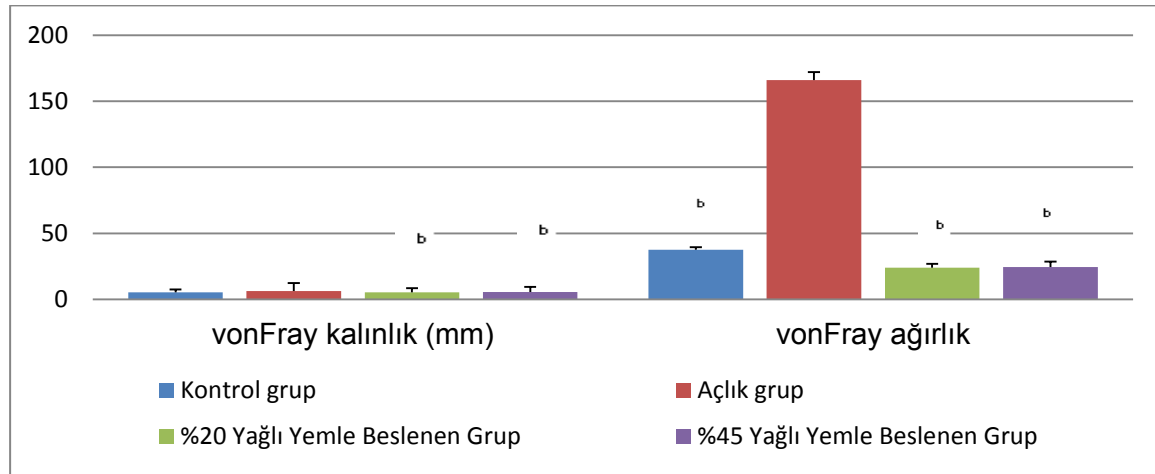
4.3 Duyusal Performans Değerlendirme

Duyusal performans değerleri **Tablo 3.** ve **Şekil 5.** 'de sunulmuştur. Von Frey filamentlerinin ayak pençe yabanına batırılarak filamentin incelik ve basıncına göre deney hayvanlarının pençe çekerek verdikleri tepki test edildi. Deney grupları arasında Von Frey filamentlerinin inceliğine (mm) ve basınç (gr) göre değerlendirildiğinde açlık grubu diğer gruplardan anlamlı olarak farklıdır ($p<0,05$).

Tablo 3. Deney gruplarında von Frey kalınlık (mm) ve von Frey ağırlık (gr) analizi

Grup	Kontrol Grup (n=12)	Açlık Grup (n=12)	%20 Yağlı Yemle Beslenen Grup (n=12)	%45 Yağlı Yemle Beslenen Grup (n=8)	<i>p</i>
vonFray kalınlık (mm)	5,4±0,4 ^b	6,33±0,22	5,41±0,1 ^b	5,42±0,09 ^b	0,001
vonFray ağırlık (gr)	37,6±50,9 ^b	166,6±73,1	24,16±4,28 ^b	24,62±3,88 ^b	0,001

Ortalama ± standart sapma. $p< 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir. ^b Açlık grubundan anlamlı olarak farklıdır.



Şekil 5. Deney gruplarında von Frey kalınlık (mm) ve von Frey ağırlık (gr) analizi

Ortalama ± standart sapma. $p< 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir. ^b Açlık grubundan anlamlı olarak farklıdır.

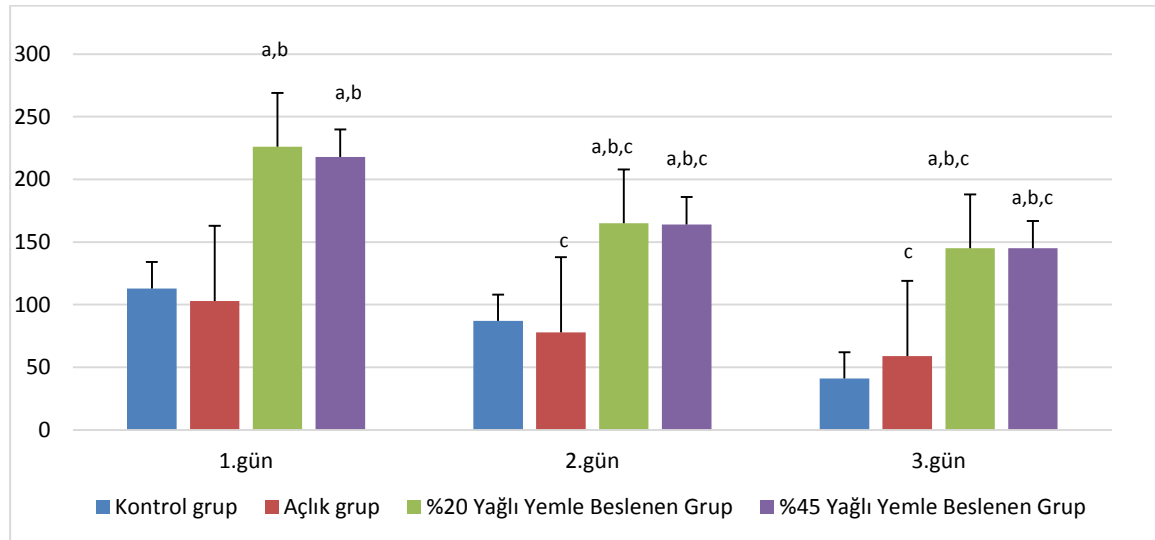
4.4 Referans Bellek Değerlendirme

Üç panel testinde referans bellek değerlendirildiğinde veriler **Tablo 4.** ve **Şekil 6.** 'de sunulmuştur. Deney gruplarının ardı ardına 3 gün aynı kapılar açıkken yeme ulaşması için geçen süre (saniye) ve yanlış tercih ettikleri kapı hata sayısı değerlendirildiğinde üç gün boyunca kontrol grubuna göre yüksek kalori grubunda ($p=0,001$) anlamlı olarak farklıdır ($p<0,05$).

Tablo 4. Deney gruplarının üç panel testinde referans bellek yeme ulaşma süresi (sn)

Grup	Kontrol Grup (n=12)	Açlık Grup (n=12)	%20 Yağlı Yemle Beslenen Grup (n=12)	%45 Yağlı Yemle Beslenen Grup (n=8)	<i>p</i>
1. gün	113,6±57,5	103,5±56,1	226,4±63,3 ^{a,b}	218,5±66,2 ^{a,b}	0,001
2. gün	87,8±44,8	78,5±41,1 ^c	165,8±64,4 ^{a,b,c}	164,94±62,48 ^{a,b,c}	0,001
3. gün	41,1±18,3 ^c	59,1±25,05 ^c	145,5±70,8 ^{a,b,c}	145±71, ^{a,b,c}	0,001
<i>p</i>	0,032	0,002	0,001	0,015	

Ortalama ± standart sapma. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir. ^a Kontrol grubundan anlamlı olarak farklıdır. ^b Açlık grubundan anlamlı olarak farklıdır. ^c Birinci günden anlamlı olarak farklıdır.



Şekil 6. Deney gruplarında üç panel testinde referans bellek yeme ulaşma süresi (sn)

Ortalama $\pm$ standart sapma. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir. ^a Kontrol grubundan anlamlı olarak farklıdır. ^b Açlık grubundan anlamlı olarak farklıdır. ^c Birinci günden anlamlı olarak farklıdır. x eksenini gün ve y eksenini süre (saniye)

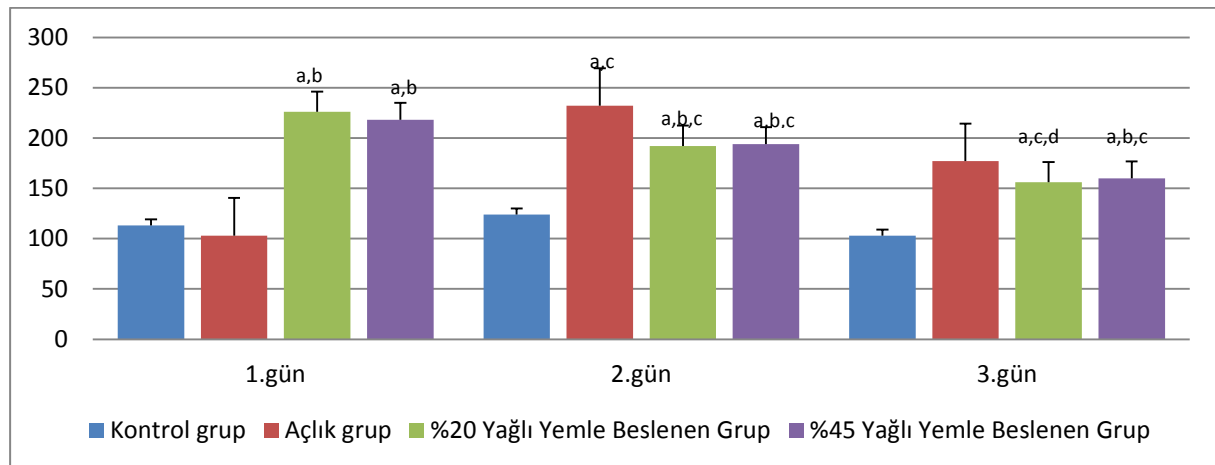
4.5 Çalışan Bellek Değerlendirme

Üç panel testinde referans bellek değerlendirildiğinde veriler **Tablo 5.** ve **Şekil 7.** 'de sunulmuştur. Deney gruplarının ardı ardına 3 gün farklı kapılar açıkken yeme ulaşması için geçen süre (saniye) ve yanlış tercih ettikleri kapı hata sayısı değerlendirildiğinde üç gün boyunca kontrol grubuna göre diğer gruplarda anlamlı olarak farklıdır ($p < 0,05$).

Tablo 5. Deney gruplarının üç panel testinde çalışan bellek yeme ulaşmada süresi(sn)

Grup	Kontrol Grup (n=12)	Açlık Grup (n=12)	%20 Yağlı Yemle Beslenen Grup (n=12)	%45 Yağlı Yemle Beslenen Grup (n=8)	<i>p</i>	Grup
1. gün	113,6 $\pm$ 57,5	103,5 $\pm$ 56,1	226,4 $\pm$ 63,3 ^{a,b}	218,5 $\pm$ 66,2 ^{a,b}	81,34	0,001
2. gün	124,9 $\pm$ 48,7	232 $\pm$ 39,9 ^{a,c}	192 $\pm$ 6,2 ^{a,b,c}	194,75 $\pm$ 69,17 ^{a,b,c}	44,06	0,001
3. gün	103,9 $\pm$ 42,5	177,1 $\pm$ 66,02 ^{a,c,d}	156,7 $\pm$ 64,8 ^{a,c,d}	160,4 $\pm$ 64,5 ^{a,b,c}	19,25	0,001
<i>p</i>	0,356	0,03	0,001	0,032		

Ortalama $\pm$ standart sapma. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir. ^a Kontrol grubundan anlamlı olarak farklıdır. ^b Açlık grubundan anlamlı olarak farklıdır. ^c Birinci günden anlamlı olarak farklıdır. ^d İkinci günden anlamlı olarak farklıdır.



Şekil 7. Deney gruplarının üç panel testinde çalışan bellek yeme ulaşmada süresi

Ortalama $\pm$ standart sapma. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir. ^a Kontrol grubundan anlamlı olarak farklıdır. ^b Açlık grubundan anlamlı olarak farklıdır. ^c Birinci günden anlamlı olarak farklıdır. ^d İkinci günden anlamlı olarak farklıdır. x ekseni gün ve y ekseni hata sayısı.

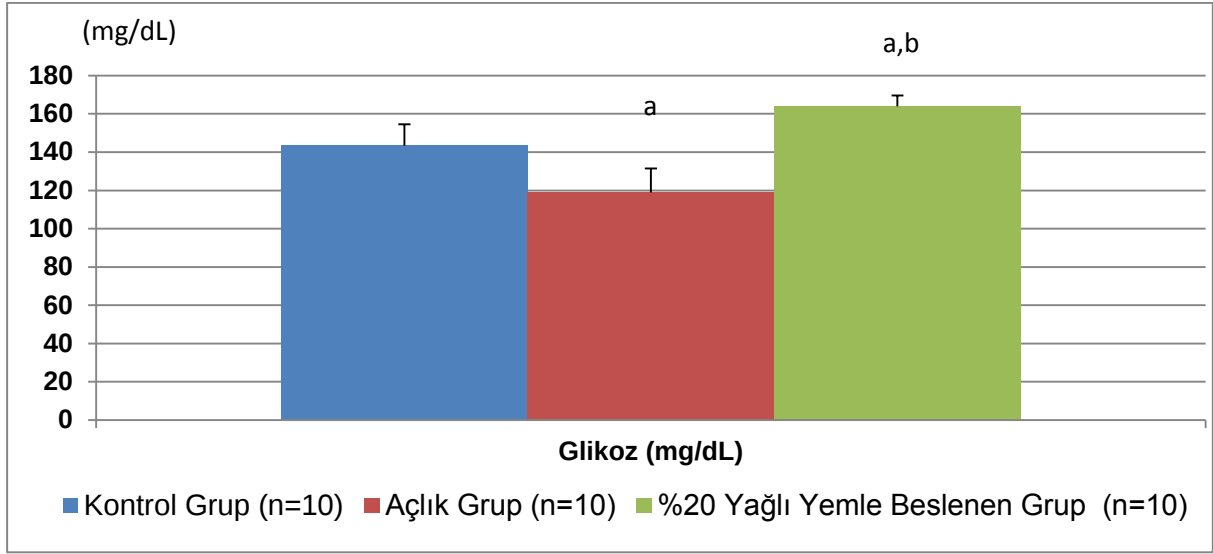
4.6 Kanda Biyokimya ELİZA kit Değerlendirilmesi

Çalışma sonunda deney gruplarından alınan intrakardiyak kanda Erciyes Üniversitesi Gülseren ve Mustafa Erdoğan Merkez Laboratuvarında analiz edildi. Glikoz , trigliserit ve kolesterol değerleri diğer gruplardan anlamlı olarak farklıdır. Biyokimya sonuçları **Tablo 6.** **Şekil 8., Şekil 9., Şekil 10.** ' de ve Erciyes Üniversitesi Genkök Araştırma Merkezinde analiz edilen intrakardiyak kanda Eliza sonuçları **Tablo 7., Şekil 11., Şekil 12., Şekil 13.**'de sunulmuştur.

Tablo 6. Deney gruplarında çalışma sonunda intrakardiyak alınan kanda glikoz, trigliserit ve kolesterol değerleri

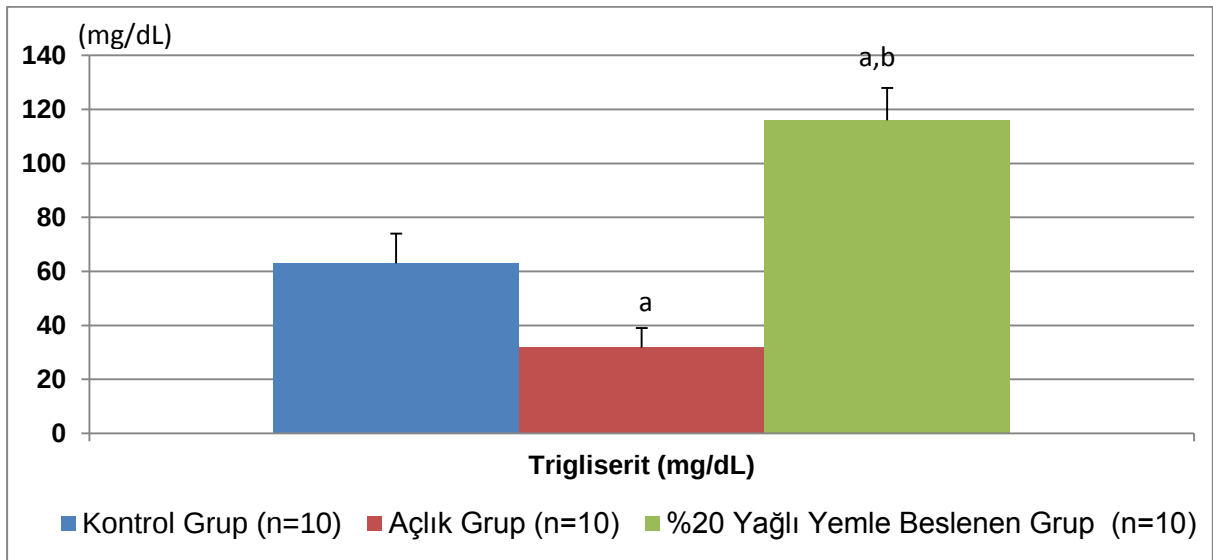
Grup	Kontrol Grup (n=10)	Açlık Grup (n=10)	%20 Yağlı Yemle Beslenen Grup (n=10)	p
Glikoz (mg/dL)	143,5 $\pm$ 11,1	119,1 $\pm$ 18,8 ^a	164,8 $\pm$ 5,6 ^{a,b}	0,001
Trigliserit (mg/dL)	63,1 $\pm$ 11,08	28,1 $\pm$ 8,8 ^a	116 $\pm$ 12,04 ^{a,b}	0,001
Kolesterol (mg/dL)	63,5 $\pm$ 7,3	51,6 $\pm$ 10,01	105,6 $\pm$ 8,57 ^{a,b}	0,001

Ortalama $\pm$ standart sapma. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir. ^a Kontrol grubundan anlamlı olarak farklıdır. ^b Açlık grubundan anlamlı olarak farklıdır.



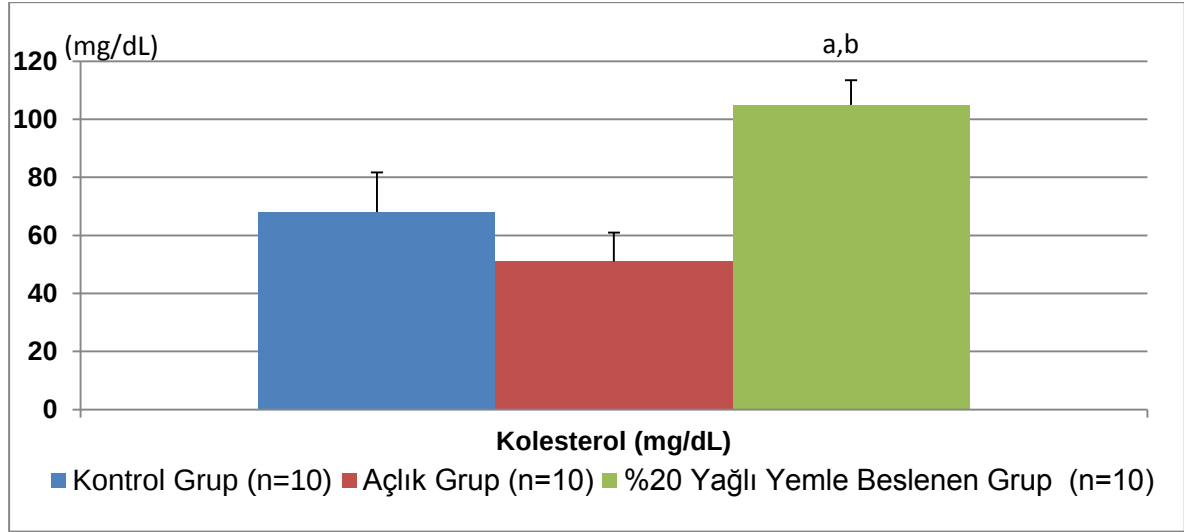
Şekil 8. Deney gruplarında çalışma sonunda intrakardiak alınan kanda glikoz değerleri

Ortalama $\pm$ standart sapma. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir. ^a Kontrol grubundan anlamlı olarak farklıdır. ^b Açlık grubundan anlamlı olarak farklıdır. x eksenini deney gruplarını ve y eksenini glikoz (mg/dL)



Şekil 9. Deney gruplarında çalışma sonunda intrakardiak alınan kanda trigliserit değerleri

Ortalama $\pm$ standart sapma. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir. ^a Kontrol grubundan anlamlı olarak farklıdır. ^b Açlık grubundan anlamlı olarak farklıdır. x eksenini deney gruplarını ve y eksenini trigliserit (mg/dL)



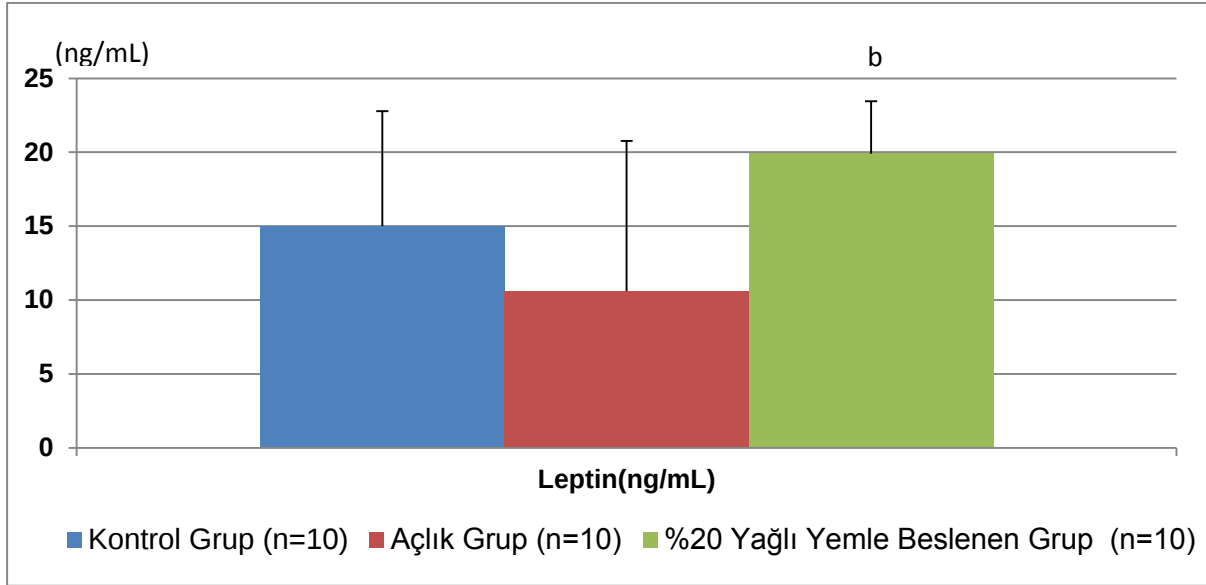
Şekil 10. Deney gruplarında çalışma sonunda intrakardiyak alınan kanda kolesterol değerleri

Ortalama $\pm$ standart sapma. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir. ^a Kontrol grubundan anlamlı olarak farklıdır. ^b Açlık grubundan anlamlı olarak farklıdır. x eksenini deney gruplarını ve y eksenini kolesterol (mg/dL)

Tablo 7. Kan serumunda Leptin, İnsülin ve Ghrelin miktarının deney gruplarında değerlendirilmesi

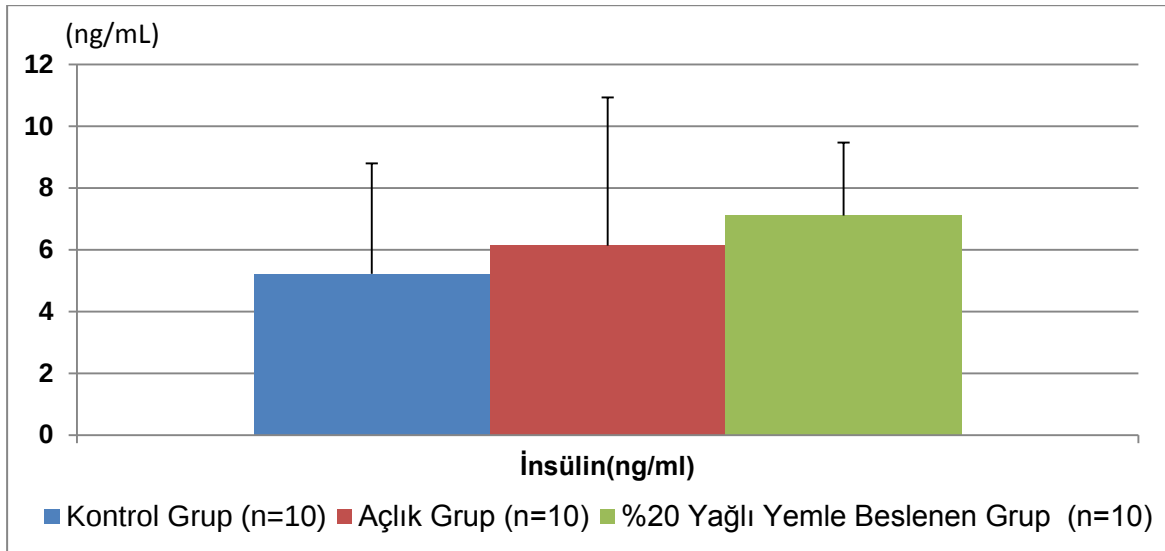
	Kontrol Grup (n=10)	Açlık Grup (n=10)	%20 Yağlı Yemle Beslenen Grup (n=10)	<i>p</i>
Leptin(ng/mL)	15 $\pm$ 7,79	10,64 $\pm$ 10,17	19,96 $\pm$ 3,5 ^b	0,038
İnsülin(ng/mL)	5,22 $\pm$ 3,58	6,13 $\pm$ 4,81	7,11 $\pm$ 2,34	0,551
Ghrelin(pg/mL)	408,6 $\pm$ 216,1	449,64 $\pm$ 210,9	758,66 $\pm$ 133,9 ^{a,b}	0,001

Ortalama $\pm$ standart sapma. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir. ^a Kontrol grubundan anlamlı olarak farklıdır. ^b Açlık grubundan anlamlı olarak farklıdır.



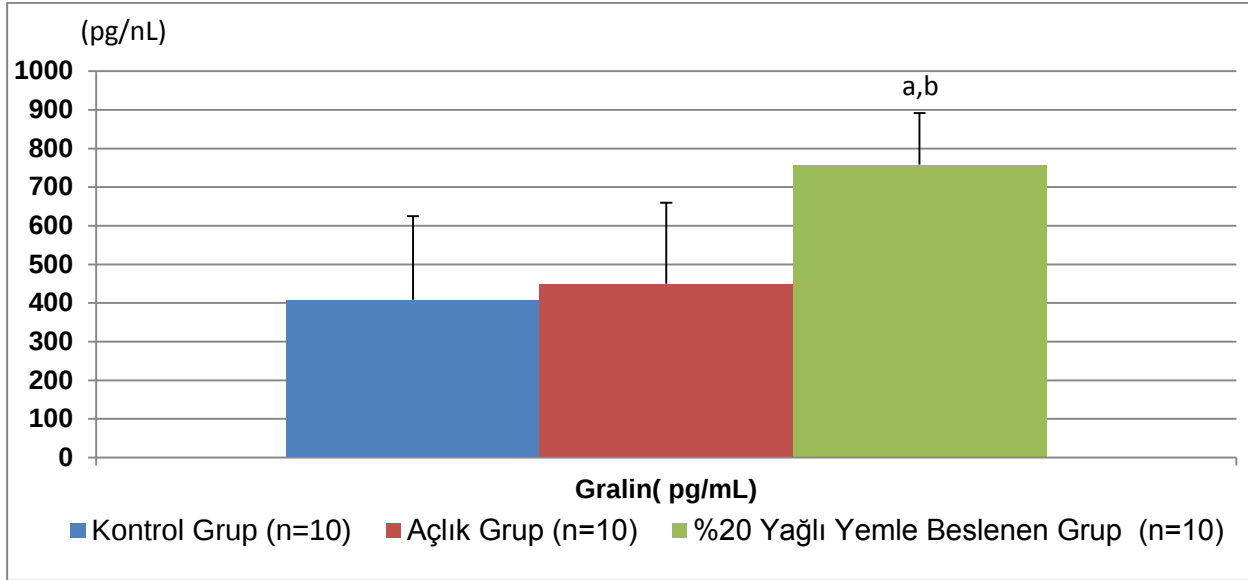
Şekil 11. Kan serumunda Leptin miktarının deney gruplarında değerlendirilmesi

Ortalama $\pm$ standart sapma. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir.^b Açlık grubundan anlamlı olarak farklıdır. x eksenini deney gruplarını ve y eksenini leptin (ng/mL)



Şekil 12. Kan serumunda İnsülin miktarının deney gruplarında değerlendirilmesi

Ortalama $\pm$ standart sapma. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir. x eksenini deney gruplarını ve y eksenini insülin (ng/mL)



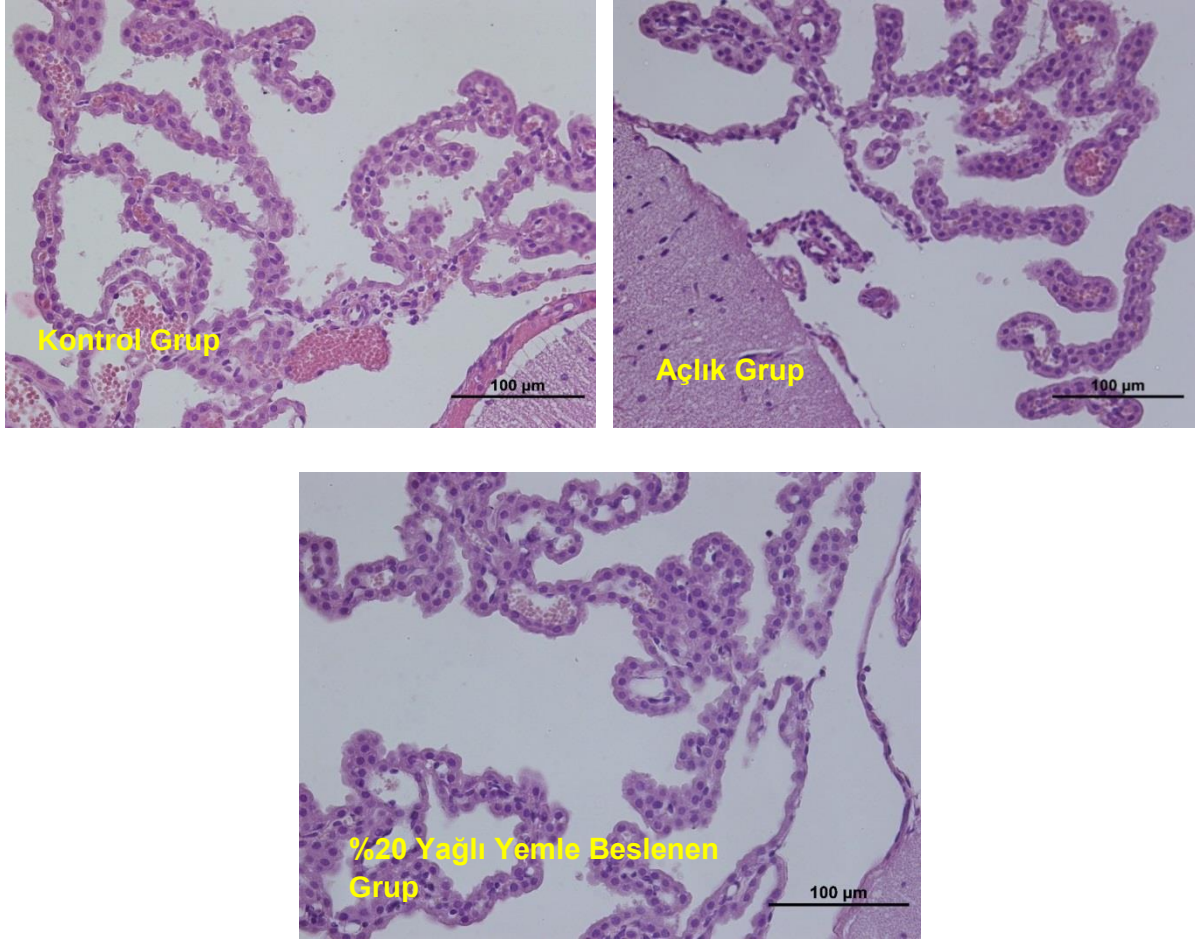
Şekil 13. Kan serumunda Grelin miktarının deney gruplarında değerlendirilmesi

Ortalama $\pm$ standart sapma. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir.^a Kontrol grubundan anlamlı olarak farklıdır.^b Açlık grubundan anlamlı olarak farklıdır. x eksenini deney gruplarını ve y eksenini gralin (pg/mL)

4.7 Histoloji doku takibi

4.7.1 Hemotoksilen Eozin boyama

Yapılan deney sonucunda ratlardan elde edilen beyin dokularına Hematoksilen-eozin boyama metodları uygulandı. Işık mikroskopik incelemelerde kontrol grubunda, pleksus koroideusu oluşturan tipik tek katlı kübik/prizmatik karakterdeki epitel hücreleri ile bol kan damarları içeren pia mater tabakasının ventriküllere doğru kıvrımlar halinde sarkan bir yapı şeklindeki yerleşimi gözlemlendi. Açlık ve yüksek kalori gruplarında da pleksus koroideusun morfolojik görünümü kontrol grubu ile benzerdi. H&E boyama sonuçları **Şekil 14.**'de gösterilmiştir.



Şekil 14. Deney gruplarında Hematoksilen-eozin boyama metodları uygulama sonrası 3.ventrikül çevresi hücreler.

4.7.2 MAP-2 ve Vimentin immunreaktif yoğunluğu

Çalışmada, deneklerden alınan beyin dokularına ait plexus koroideus kesitlerinde MAP-2 ve Vimentin ekspresyonları avidin-biotin-peroksidaz yöntemiyle belirlendi. Preparatlardan alınan görüntülerden immunreaktivite yoğunluğunu belirlemek için Image-J software programı kullanılarak plexus koroideus alanlarında ölçümler yapıldı. MAP-2 ve Vimentin primer antikorları kullanılarak yapılan immunohistokimya sonuçları **Tablo 8**, **Şekil 15.** ve **Şekil 16.**'de gösterilmiştir.

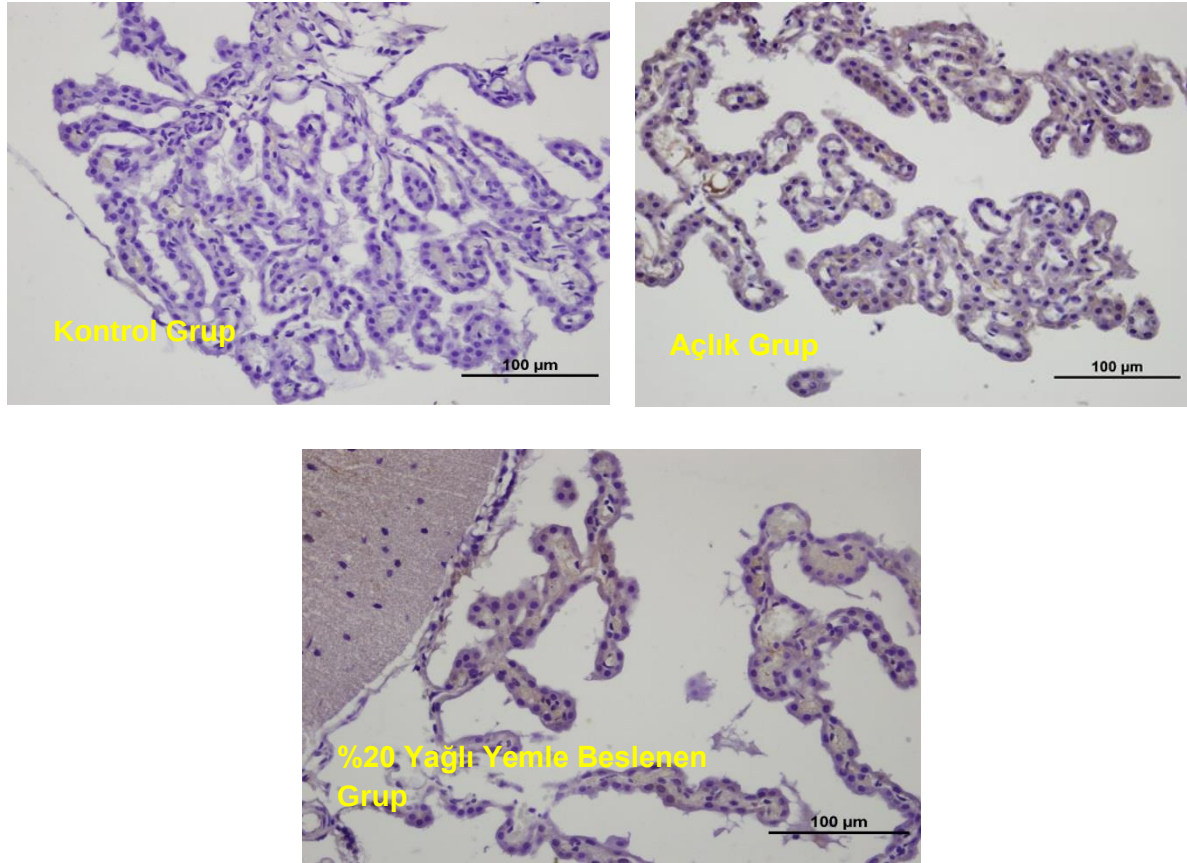
Deney grupları arasında MAP-2 değerlendirildiğinde açlık grubu diğer gruplardan ($p=0,001$) anlamlı olarak farklıdır. Vimentin değerlendirildiğinde her üç grupta ($p=0,001$) anlamlı olarak farklıdır.

Tablo 8. Deney grupları histoloji dokuları immunofluoresan boyama

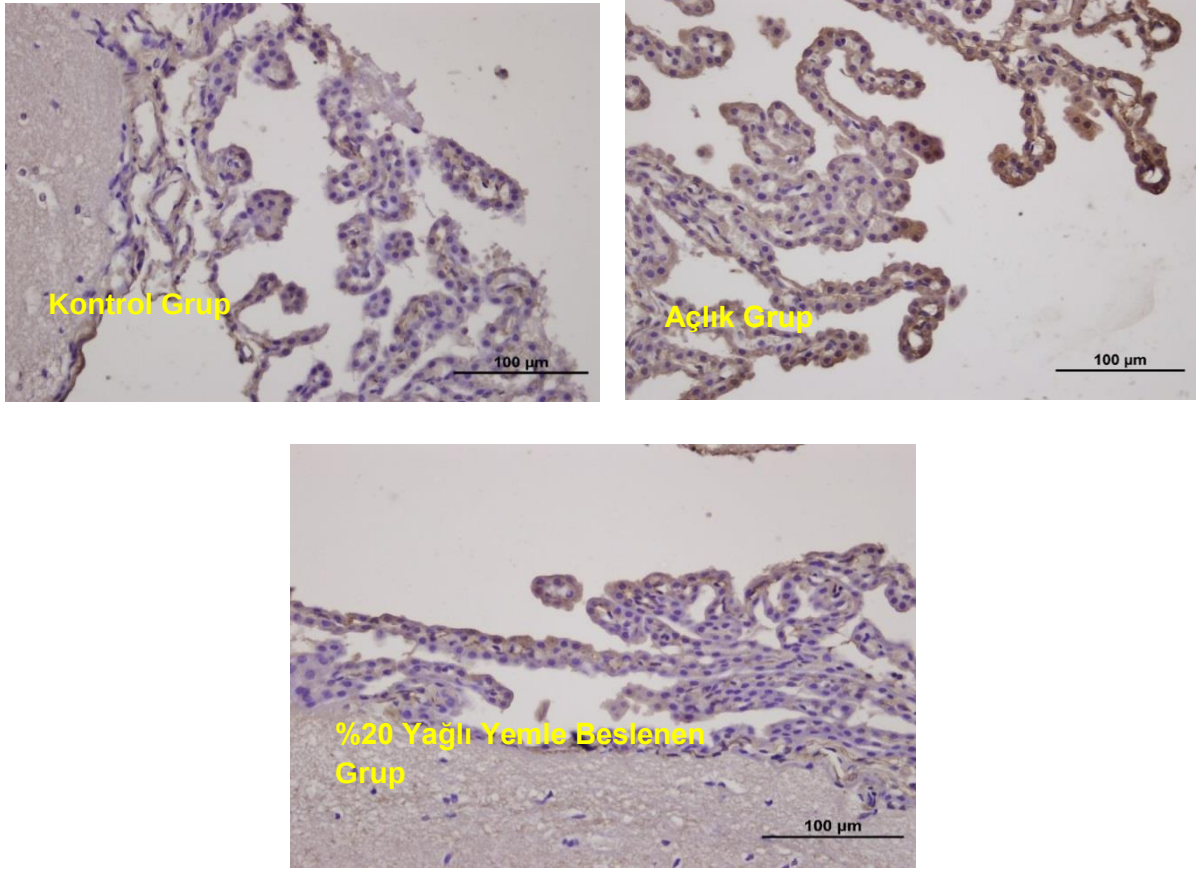
Grup	Kontrol Grup (n=12)	Açlık Grup (n=12)	%20 Yağlı Yemle Beslenen Grup (n=12)	p
MAP-2	111,02±10,01	129,6±9,48 ^a	120,15±10,14 ^{a,b}	0,001
Vimentin	115±14,4	130,78±14,73 ^a	119,33±10,15 ^{a,b}	0,001
Nestin	16,98±3,10	22,76±7,13 ^a	17,67±5,04 ^b	0,001

p< 0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir.^a Kontrol grubundan anlamlı olarak farklıdır.

^b Açlık grubundan anlamlı olarak farklıdır.



Şekil 15. Deney gruplarında MAP-2 primer antikoru uygulanan 3. Ventrikül çevresi hücreler



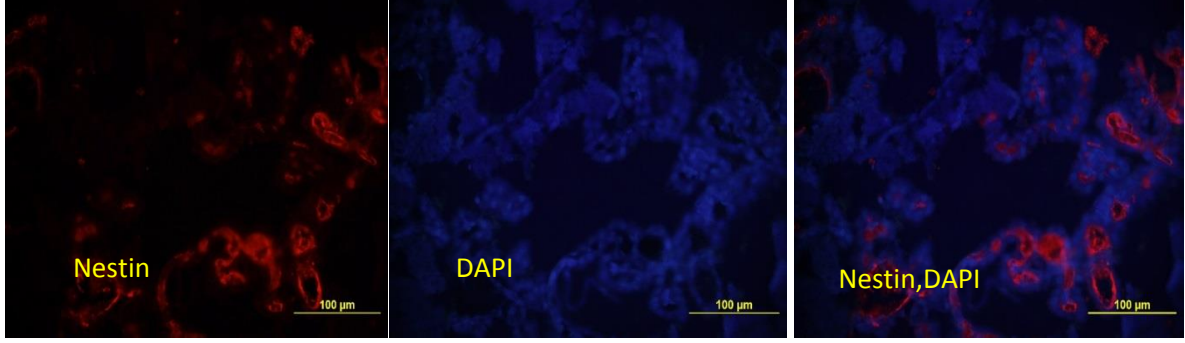
Şekil 16. Deney gruplarında Vimentin primer antikoruna uygulanan 3. Ventrikül çevresi hücreler

4.7.3 Nestin immüno Floresan boyama

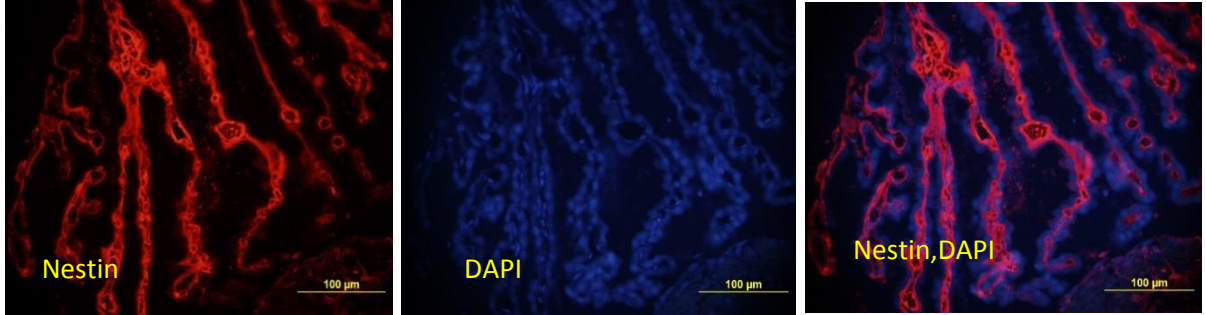
Deney gruplarında nestin immüno Floresan immüno reaktivite sonuçlarını belirlemek ve gruplar arasında karşılaştırma yapabilmek amacıyla frozen kesit alınan beyin dokularına ait pleksus koroideus kesitlerine nestin immüno Floresan boyama yöntemi uygulandı. Preparatlardan alınan görüntülerden immüno reaktivite yoğunluğunu belirlemek için Image-J software programı kullanılarak pleksus koroideus alanlarında ölçümler yapıldı. Nestin immüno Floresan boyama sonrası elde edilen Floresan görüntüler **Şekil 17.**'de gösterilmiştir.

Deney grupları arasında Nestin değerlendirildiğinde açlık grubu diğer gruplardan ($p=0,001$) anlamlı olarak farklıdır.

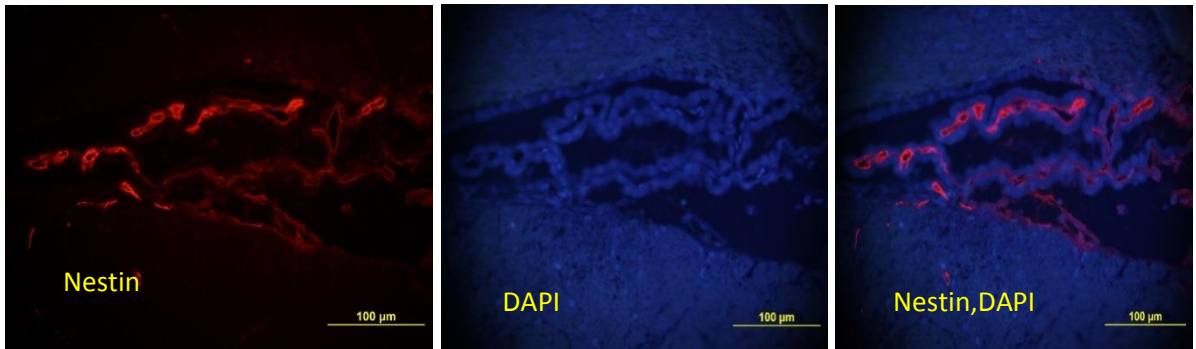
Şekil 18, 19, 20' de ise Deney gruplarında histolojik çalışma sonrası sırasıyla, MAP-2 , Vimentin ve Nestin proteinlerinin immunoreaktivite yoğunluğu gösterilmiştir.



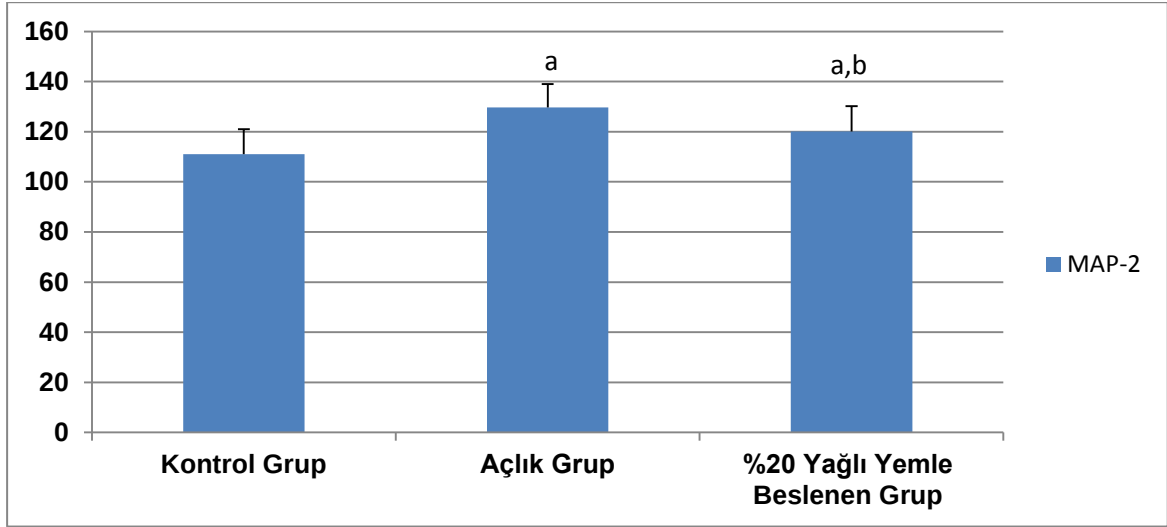
Şekil 17. Nestin Boyama Kontrol Grubu Sıçanda



Şekil 18. Nestin Boyama Açlık Grubu Sıçanda

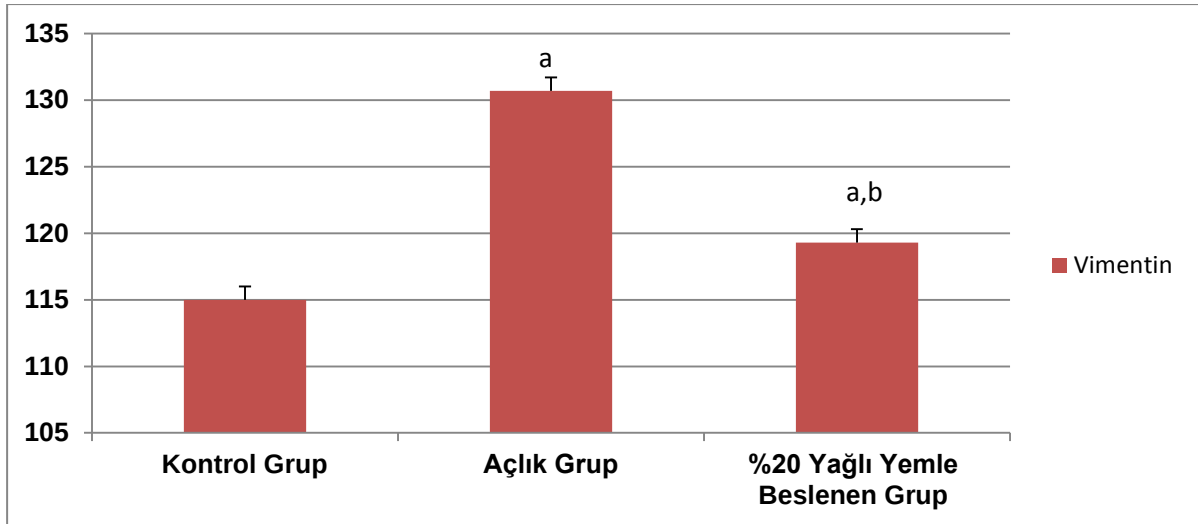


Şekil 19. Nestin Boyama %20 Yağlı Yemle Beslenen Grup Sıçanda



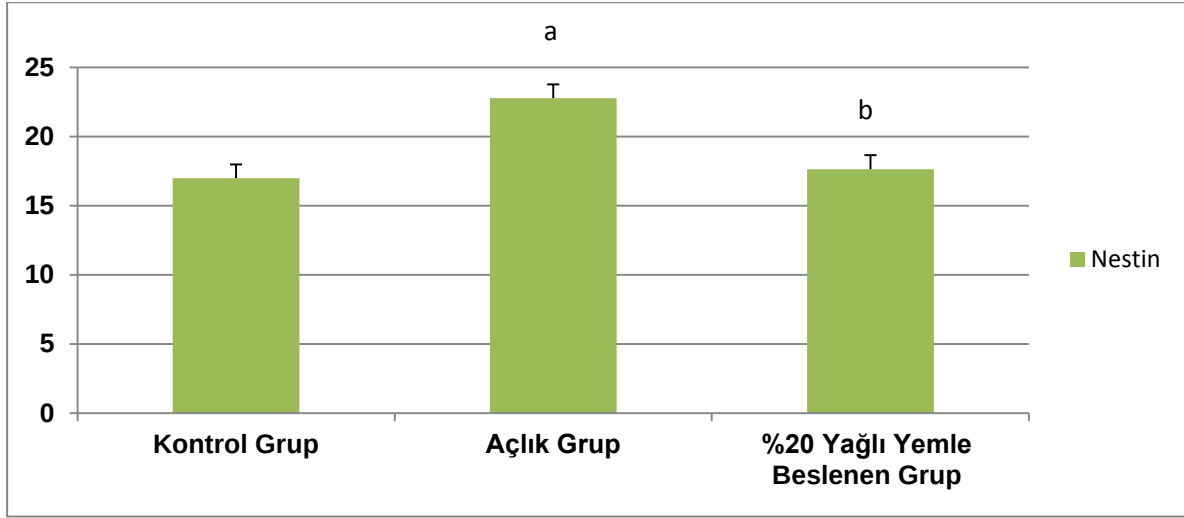
Şekil 20. Deney gruplarında histoloji MAP-2 immunoreaktivite yoğunluğu

Ortalama $\pm$ standart sapma. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir. ^a Kontrol grubundan anlamlı olarak farklıdır. ^b Açlık grubundan anlamlı olarak farklıdır. x eksenini deney grupları ve y eksenini Nestin immunoreaktivite yoğunluğu



Şekil 21. Deney gruplarında histoloji Vimentin immunoreaktivite yoğunluğu

Ortalama $\pm$ standart sapma. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir. ^a Kontrol grubundan anlamlı olarak farklıdır. ^b Açlık grubundan anlamlı olarak farklıdır. x eksenini deney grupları ve y eksenini Vimentin immunoreaktivite yoğunluğu



Şekil 22. Deney gruplarında histoloji Nestin immunoreaktivite yoğunluğu

Ortalama $\pm$ standart sapma. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir. ^a Kontrol grubundan anlamlı olarak farklıdır. ^b Açlık grubundan anlamlı olarak farklıdır. x eksenini deney grupları ve y eksenini Nestin immunoreaktivite yoğunluğu

5. TARTIŞMA/SONUÇ

Açlık ve obezite modeli (yüksek kalorili diyet modeli) oluşturulan sıçanlarda davranış, kognitif fonksiyonlar, duyu ve motor performans değerleri kontrol sıçanların değerleri ile karşılaştırıldığında;

1. Açık alan parametreleri; lokomotor aktivitenin açlık ve yüksek kalorili diyet modellerinde arttığını, keşif davranışının açlık modelinde artıp (yiyecek arama davranışı olarak yorumlanabilir), obezite modeli sıçanlarda azaldığını (kilo artışına bağlı doğrulma hareketinde azalma), kaşınma sayısının açlık modelinde yağ kaybına bağlı olarak arttığını, defekasyon sayısının da alınan az besine bağlı olarak azaldığı görülmektedir. Davranış parametreleri az besin alımında yüksek kalorili diyet modeline göre daha fazla değişikliğe uğramıştır.

2. Ağrı eşiği değerlendirildiğinde sıcak plaka testinde üç grup arasında anlamlı fark bulunmamış, ancak kuyruk çekme testinde obezite geliştirilen sıçanlarda kuyruk çekme süresindeki uzama artan yağ dokusuna bağlı olarak ağrı eşiğinin yükseldiği şeklinde yorumlanabilir. Yüksek kalorili diyetle beslenen sıçanlarda ağrı eşiğini değiştirmiştir.

3. Duysal performans değerlendirmesinde, (Von Frey Filamentleri ile somatik duyu değerlendirme) açlık grubu sıçanlarda duyu eşiği yükselmiş,yüksek kalorili diyet alan ve kontrol sıçanlarda duyu eşiği farklı bulunmamıştır. Somatik duyu eşiği de açlıkta yükselmiştir.
4. Referans bellek açlıkta kontrolden farklı bulunmamış, ancak yüksek kalorili diyet (Yağlı diyet) modeli geliştirilen sıçanlarda yeme ulaşma süreleri artmış, hata sayıları artmış ve referans bellek performansı bozulmuştur.
5. alışan bellek obezitede kontrol ve açlık grubuna göre yeme ulaşma sresinde uzama ve hata sayısındaki artışa bağlı olarak anlamlı olarak bozulmuştur.Bir günlük açlık önemli olmazken 2. ve 3. Günde açlık grubunda çalışan bellek performansı da etkilenmiştir.
6. açlık grubunda kan glukozu azalmış ve kolesterol çok fazla değişmezken, yüksek kalorili diyet grubunda anlamlı olarak her ikisinde de artış olmuştur.
7. İmmünohistokimyasal boyamaların sonuçlarına göre üç protein ekspresyonunda hem açlıkta hem yüksek kalorili diyet modelinde kontrol sıçanlara göre artmış, ancak bu değişimden daha çok açlık grubu sıçanlar etkilenmiş fark daha fazla bulunmuştur.

Sonuç olarak, Açlık veya yüksek kalorili diyetle beslenme durumlarında hem nöronal plastisitenin göstergesi olan davranış ve kognitif fonksiyonlarda değişiklikler gözlenirken hemde hipotalamusla ilişkili olan enerji metabolizmasında bir takım görevler yüklenen tanisitlerde histolojik boyama sonuçlarına göre ekspresyon edilen protein yoğunluklarında değişiklikler gözlenmiştir. Bu proteinlerden özellikle nestin yetişkin nrogenizde rol alan bir protein olarak adlandırıldığı için açlıkta tanisitlerin özellikle bu metabolik duruma adaptasyon sağlamak için sayı olarakta artabilecekleri, ancak bunun kanıtlanabilmesi için daha ileri tekniklerle hücre proliferasyonunun gösterilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Obezite geliştiğinde veya yüksek yağlı diyetle beslenildiğinde de yine bu protein ekspresyonları açlık durumundaki kadar olamasa da kontrol bulgularına göre anlamlı olarak artmıştır. Sonuç metabolizmadaki değişiklerin adaptasyonunda tanisitler özel hücre içi mekanizmalarını, membran proteinlerini değiştirerek kendilerine yüklenen fonksiyonları yeni duruma adapte etmeye çalışıyor olabilirler.

Daha ileri tekniklerle hücre içi sinyal yolaklarının araştırılması ve PCR uygulanarak plastisiteden sorumlu tutulan proteinlerin kalitatif ve kantitatif analizlerinin yapılması tanisitlere yüklenen yeni fonksiyonlara netlik kazandıracaktır.

6.KAYNAKLAR

- Ahima R.S., Antwi D.A. 2008. "Brain regulation of appetite and satiety", J Endocrinol Metab Clin North Am, 37,811-823.
- Álvarez-castro P., Pena L., Cordido F. 2013. "Ghrelin in obesity, physiological and pharmacological considerations", Mini Rev Med Chem, 13 (4),541-552.
- Benoit S.C., Clegg D.J., Seeley R.J., Woods S.C. 2004. "Insulin and leptin as adiposity signals", Recent Prog Horm Res, 59,287-304.
- Blouet C., Schwartz G.J. 2010 "Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis", Behav Brain Res,209,1– 12.
- Borborea M., Dale N. 2013. "Hypothalamic tanycytes: potential roles in the control of feeding and energy balance", Trends neurosci, 36(2),91-100.
- Cortés-Campos C., Elizondo R., Carril C., Martinez F., Boric K., Nualart F., Garcia-Robles M.A. 2013. "MCT2 expression and lactate influx in anorexigenic and orexigenic neurons of the arcuate nucleus", PLoS One, 8(4),1-15.
- Cortés-Campos C., Elizondo R., Llanos P., Uranga R.M., Nualart F., Garcia M.A., M.C.T. 2011. "Expression and lactate influx/efflux in tanycytes involved in glia-neuron metabolic interaction", PLoS One, 6(1),1-13.
- D'amour F.E., Smith D.L. 1941. "A method for determining loss of pain sensation", J Pharmacol Exp Ther, 72,74-79.
- Dale N., 2011. "Purinergic signaling in hypothalamic tanycytes: potential roles in chemosensing", Semin Cell Dev Biol, 22(2),237-244.
- Dietrich M.O., Horvath T.L. 2013. "Hypothalamic control of energy balance:insights into the role of synaptic plasticity", Trends in Neurosciences, 36 (2),65-73.
- Dina C. 2008. "New insights into the genetics of body weight", Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 11,378-384.
- Eddy N.B., Leimback D. 1953. "Synthetic analgesics. II. Dithinylbutenyl and dithinyl buteny 58 lamines", J Pharmacol Exp Ther, 107, 385-393.

- Filippini B.M., Abraham M.A., Yue J.T., Lam T.K. 2013. "Insulin and glucagon signaling in the central nervous system", *Rev Endocr Metab Disord.*, 14(4),365-375.
- Firth J.A., Bock R. 1976. "Distribution and properties of an adenosine triphosphatase in the tanycyte ependyma of the third ventricle of the rat", *Histochemistry*, 47(2),145-57.
- Frayling C., Britton R., Dale N. 2011. "ATP-mediated glucosensing by hypothalamic tanycytes", *J Physiol*, 589(9),2275– 2286.
- Furuya Y., Yamamoto T., Yatsugi S., Ueki S. 1988. "A new method for studying working memory by using the three-panel runway apparatus in rats", *Japanese Journal of Pharmacology*, 46,183–188.
- García M., Millán C., Balmaceda-Aguilera C., Castro T., Pastor P., Montecinos H., Reinicke K., Zúñiga F., Vera J.C., Oñate S.A., Nualart F. 2003 "Hypothalamic ependymal-glial cells express the glucose transporter GLUT2, a protein involved in glucose sensing", *J Neurochem*, 86(3),709-724.
- Gölgeli A. 2013. "Tanisitler Nöroendokrin Fonksiyonların Modulatorü Olabilirmi", 39. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Ankara, 10-14 Eylül , ss:6, (2013).
- Kanasaki K., Koya D. 2011. "Biology of obesity:Lessons from animal models of obesity", *Journal of Biomedicine and Biotechnology* , 1-11.
- Kang J.Y., Lee S.Y., Rhee C.K., Kim S.J., Kwon S.S., Kim Y.K. 2013. "Effect of aging on airway remodeling and muscarinic receptors in a murine acute asthma model", *Clinical Interventions in Aging*, 8, 1393–1403.
- Kittner H., Franke H., Harsch J.I., El-Ashmawy I.M., Seidel B., Krügel U., Illes P. 2006. "Enhanced food intake after stimulation of hypothalamic P2Y1 receptors in rats: modulation of feeding behaviour by extracellular nucleotides", *Eur J Neurosci*, 24(7), 2049-2056.
- Kloepper J.E., Tiede S., Brinckmann J., Reinhardt D.P., Meyer W., Faessler R., Paus R. 2008. "Immunophenotyping of the human bulge region: the quest to define useful in situ markers for human epithelial hair follicle stem cells and their niche", *Experimental Dermatology*, 17, 592–609, (2008).
- Kojima M., Hosoda H., Date Y., Nakazato M., Matsuo H, Kangawa K. 1999. "Ghrelin is a growth –hormone- releasing acylated peptide from stomach, *Nature*", 402, 656-60.

Konturek S.J., Konturek J.W., Pawlik T., Brzozowski T. 2004. "Brain-gut axis and its role in the control of food intake", *J Physiol Pharmacol.*, 55, 137-154.

Lee D.A., Bedont J.L., Pak T., Wang H., Song J., Angulo A.M., Takiar V., Charubhumi V., Balordi F., Takebayashi H., Aja S., Ford E., Fishell G., Blackshaw S. 2012 "Tanycytes of the hypothalamic median eminence form a diet responsive neurogenic niche", *Nat Neurosci*, 15(5), 700-707.

Mathew T.C. 2008. "Regional analysis of the ependyma of the third ventricle of rat by light and electron microscopy", *Anat Histol Embryol*, 37,9-18.

Matsumoto Y., Yamaguchi T., Watanabe S., Yamamoto T. 2004. "Involvement of arachidonic acid cascade in working memory impairment induced by interleukin-1 beta", *Neuropharmacology*, 46,(8), 1195–1200.

Mcnay D.E.G., Briancon N., Kokoeva M.V., Flier E.M., Flier J.S. 2013. "Remodeling of the arcuate nucleus energy-balance circuit is inhibited in obese mice", *The Journal of Clinical Investigation*, 122 (1), 142-152.

Millán C., Martínez F., Cortés-Campos C., Lizama I., Yañez M.J., Llanos P., Reinicke K., Rodríguez F., Peruzzo B., Nualart F., García M.A. 2010. "Glial glucokinase expression in adult and post-natal development of the hypothalamic region", *ASN Neuro*, 2(3),135-145.

Näslund E., Hellström P.M. 2007. "Appetite signaling: from gut peptides and enteric nerves to brain", *Physiol Behav*, 92, 256- 262.

Orellana J.A., Sáez P.J., Cortés-Campos C., Elizondo R.J., Shoji K.F., Contreras-Duarte S., Figueroa V., Velarde V., Jiang J.X., Nualart F., Sáez J.C., García M.A. 2012. "Glucose increases intracellular free Ca²⁺ in tanycytes via ATP released through connexin 43 hemichannels", *Glia*, 60(1), 53-68.

Osikowicz M., Longo G., Allard S., Cuello A.C., Ribeiro-da-Silva A. 2013. "Inhibition of endogenous NGF degradation induces mechanical allodynia and thermal hyperalgesia in rats", *Mol Pain*, 9: 37;1-13.

Parent A.J., Beaudet N., Beaudry H., Bergeron J., Bérubé P., Drolet G., Sarret P., Gendron L. 2012. "Increased anxiety-like behaviors in rats experiencing chronic inflammatory pain", *Behav Brain Res*. 229(1),160-167.

- Prevot V., Bellefontaine N., Baroncini M., Sharif A., Hanchate N.K., Parkash J., Campagne C., de Seranno S. 2010. "Gonadotrophin-releasing hormone nerve terminals, tanycytes and neurohaemal junction remodelling in the adult median eminence: functional consequences for reproduction and dynamic role of vascular endothelial cells", *J Neuroendocrinol*, 22(7), 639-649.
- Rodriguez E.M., Blazquez J.L., Pastor F.E., Pelaez P., Pena P., Peruzzo P., Amat P. 2005. "Hypothalamic tanycytes: a key component of brain-endocrine interaction", *Int Rev Cytol*, 247, 89-164.
- Romao I., Roth J. 2008. "Genetic and environmental interactions in obesity and type 2 diabetes", *J Am Diet Assoc*, 108,24-28.
- Rui L. 2013. "Brain regulation of energy balance and body weight", *Rev Endocr Metab Disord.*, 14(4),387-407.
- Smeets P.A., Charbonnier L., van Meer F., van der Laan L.N., Spetter M.S. 2012 "Food-induced brain responses and eating behavior", *Proc Nutr Soc*, 71(4), 511-520.
- South S.M., Smith T.M. 1998. "Apparent Insensitivity of the Hotplate Latency Test for Detection of Antinociception Following Intraperitoneal, Intravenous or Intracerebroventricular M6G Administration to Rats", *J Pharmacol Exp Ther.*, 286(3), 1326-1332.
- Suzuki K., Jayasena C.N. Bloom S.R. 2012. "Obesity and appetite control", *Exp Diabetes Res*, 2012,1-19
- Şahin Ü. 2013. "Akut Açlık Oluşturulan Yetişkin Erkek Sıçanlarda Siyatik Sinir Hasarıyla Gelişen Nöropatik Ağrının Davranış Öğrenme Ve Hafızaya Etkisinin Araştırılması (Yüksek lisans Tezi)", Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi.
- Woods C.S., Seeley R.J., Rushing P.A., D'Alessio D., Tso P. 2003 "A Controlled high-fat diet Induces an obese syndrome in rats", *J. Nutr*, 133: 1081–1087.
- Yay A., Özdamar S., Canöz Ö., Tucer B., Baran M. 2013. "Nestin Expression In Meningiomas Of Different Grades", *J Neurol Sci Turk*, 30:(3), 532-540.
- Yu J.H., Kim M.S. 2012. "Molecular mechanisms of appetite regulation", *Diabetes Metab J*, 36(6):391-398.

Zeltser L.M., Seeley R.J., Tschop M.H. 2012. "Synaptic plasticity in neuronal circuits regulating energy balance", *Nature Neuroscience*, 15(10), 1336-1342.