



T. C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DPP4 İNHİBİTÖRÜ İLE TEDAVİ EDİLEN OBEZ SIÇANLARDA ÖĞRENME VE SİNAPTOFİZİN İLİŞKİSİNİN ANALİZİ

Murat KORKMAZ
DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK DOKTORA PROGRAMI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI

İKİNCİ DANIŞMAN
Prof. Dr. Can DEMİREL

Gaziantep

2021

BEYAN

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

15.01.2021

Murat KORKMAZ

TEŞEKKÜR

Doktora sürecim boyunca, tez konumun belirlenmesi ve çalışmamın bütün aşamalarında değerli bilgi, tecrübe, sabır ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, akademik ufkumu genişleten, kıymetli hocam sayın Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI'ya en büyük teşekkürü borç bilirim.

Doktora tez dönemim boyunca bilgi, birikim ve önerileri ile sürekli yol gösterici olan, kıymetli vakitlerini benimle paylaşan ikinci tez danışmanım, değerli hocam sayın Prof. Dr. Can DEMİREL'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışma sonuçlarımızın değerlendirilmesinde, endokrinoloji ve metabolizma hastalıkları üzerindeki tecrübelerini, hücresel ve moleküler mekanizmalarla harmanlayarak katkıda bulunan sayın Prof. Dr. Ersin AKARSU hocama teşekkür ederim.

Tez çalışmamın ilerleyişini değerlendiren, Tez izleme komitesindeki hocalarım sayın Doç. Dr. Şenay GÖRÜCÜ YILMAZ ve Dr. Öğr. Üyesi Gülper NACARKAHYA'ya teşekkür ederim.

Tez çalışmamın protein ifade analizleri süresince katkı ve yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Abu Shameem MD Saadat KHANDAKAR'a teşekkür ederim.

Laboratuvarda beraber çalıştığımız, iyi ve kötü günlerimde her zaman yanımda olan değerli arkadaşım, İbrahim YILMAZ'a teşekkür ederim.

Bugünlere gelmeme vesile olan, beni yetiştirip büyüten, maddi manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen kıymetli AİLEM'e çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) 1002 programı, 219S063 Nolu Projesi tarafından desteklenmiştir. Destekleri için TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGE VE KISALTMALAR	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Obezite Tanımı ve Epidemiyolojisi	4
2.2. Obezite Etiyolojisi	7
2.3. Obezite Tedavisi	8
2.4. Sinaptik Veziküller	9
2.4.1. Sinaptofizin.....	16
2.5. İnkretinler.....	18
2.5.1. DPP4	20
2.5.1.1. DPP4 inhibisyonu	21
2.5.2. DPP4 inhibitörleri.....	21
2.5.2.1. DPP4 inhibitörleri ile gerçekleştirilen hayvan çalışmaları	22
2.6. Egzersiz.....	23
2.7. Hipokampus	23
2.8. Öğrenme ve Bellek Türleri	25
2.9. Morris Su Tankı	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	30

3.1. Gereç	30
3.1.1. Çalışmada kullanılan deney hayvanları	30
3.1.2. Çalışmada kullanılan kimyasal ve çözeltiler	30
3.1.3. Çalışmada kullanılan cihazlar	32
3.2. Yöntem.....	34
3.2.1. Hayvan Deneyleri	34
3.2.1.1. Hayvanların beslenme ve bakımları	34
3.2.1.2. Çalışmada yer alan deney grupları.....	35
3.2.1.3. DPP4 inhibitörü uygulaması	36
3.2.1.4. Yüzme egzersizi.....	36
3.2.1.5. Öğrenme deneyleri.....	36
3.2.1.6. Hayvan deneylerinin sonlandırılması	38
3.2.2. Moleküler Genetik Analizler	38
3.2.2.1. Total RNA (mRNA) eldesi	38
3.2.2.2. Elde edilen RNA'ların kalite ve miktar tayini	39
3.2.2.3. mRNA'dan cDNA eldesi	40
3.2.2.4. Primer seçimi	40
3.2.2.5. Preamplifikasyon reaksiyonunun hazırlanması	41
3.2.2.6. qRT-PCR (Real Time-PCR, Gerçek Zamanlı-PCR)	42
3.2.3. Western blot.....	44
3.2.3.1. Doku homojenizasyonu ve protein izolasyonu	44
3.2.3.2. Elde edilen proteinlerin kalite ve miktar tayini	45
3.2.3.3. Protein konsantrasyonlarının eşitlenmesi ve protein denatürasyonu	45
3.2.3.4. Proteinlerin jele yüklenmesi ve elektroforezi	46
3.2.3.5. Proteinlerin membrana transferi	46
3.2.3.6. Membranın bloklanması	47
3.2.3.7. Birincil antikor ile işaretleme	47

3.2.3.8. İkincil antikor ile işaretleme	47
3.2.3.9. Görüntüleme ve analiz	48
3.2.4 İstatistiksel analizler	48
4. BULGULAR.....	49
4.1. Hayvan Deneyleri Sonuçları	49
4.1.1. Haftalık ağırlık takibi sonuçları	49
4.1.1.1. Obezite tedavisi öncesi ortalama ağırlık değerleri.....	49
4.1.1.2. Obezite tedavisi sürecindeki ortalama ağırlık değerleri	52
4.1.2. Haftalık kan glikoz değerleri takibi sonuçları.....	55
4.1.2.1. Obezite tedavisi öncesi ortalama kan glikoz değerleri	55
4.1.2.2. Obezite tedavisi sürecinde ortalama kan glikoz değerleri sonuçları.....	57
4.1.3. Morris su tankı öğrenme deneyi sonuçları.....	60
4.1.3.1. Öğrenme denemeleri sıcaklık haritası sonuçları.....	62
4.1.3.2. Probe denemeleri sıcaklık haritası sonuçları	66
4.2. Moleküler Genetik Analiz Sonuçları	70
4.2.1. Hipokampus dokularında Syp gen ifade analizi sonuçları.....	70
4.2.2. Hipokampus dokularında Syp protein ifade analizi sonuçları	73
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	75
6. KAYNAKLAR	81
7. EKLER	100
8. ÖZGEÇMİŞ	101

SİMGE VE KISALTMALAR

AD	Alzheimer hastalığı
BCA	Bisinkoninik asit
Bp	baz çifti
BSA	Bovine Serum Albumin
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
CSP	Sistein Dizi Proteini
DPP4	Dipeptidil Peptidaz 4
ECL	Enhanced Chemiluminescence
GIP	Glikoza Bağımlı İnsülinotropik Polipeptit
GLP-1	Glukagon Benzeri Peptit 1
GLP-1 RA	GLP-1 Reseptör Agonistleri
HFD	Yüksek Yağlı Diyet
HRP	Horseradish Peroxidase
KKH	Koroner Kalp Hastalığı
LTP	Uzun Dönem Kuvvetlendirme
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
MWM	Morris Su Tankı
PMSF	Fenilmetilsülfonil Florür
PVDF	Polyvinylidene Fluoride
SYP	Sinaptofizin
SV	Sinaptik Veziküller
TBS	Tris Buffered Saline
TBST	Tris Buffered Saline – Tween 20

RT-PCR	Real-time PCR
T2DM	Tip 2 Diyabet
TOHTA	Türkiye Obezite ve Hipertansiyon Araştırması
TURDEP II	Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması-II
VAMP	Sinaptobrevin
VKİ	Vücut Kitle İndeksi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Sinaptik veziküllerin trafiğinde görev alan proteinler.....	14
Şekil 2.2. Presinaptik moleküller ve dinamikler.....	15
Şekil 2.3. SYP geninin X kromozomu üzerindeki yerleşimi.....	16
Şekil 2.4. SYP geninin etkileşimde olduğu proteinler.....	17
Şekil 2.5. GLP-1RA'ların ve DPP4 inhibitörlerinin Etki Mekanizması.....	19
Şekil 2.6. İnsan ve sıçan beyinlerindeki homolog hipokampus bölgeleri	25
Şekil 4.1. Obezite tedavisi öncesi ortalama ağırlık sonuçları grafiği	50
Şekil 4.2. Obezite tedavisi öncesi haftalık ortalama ağırlık sonuçları grafiği.....	51
Şekil 4.3. Obezite tedavisi sürecinde grupların ortalama ağırlık sonuçları grafiği	53
Şekil 4.4. Obezite tedavisi sürecinde grupların haftalık ortalama ağırlık sonuçları grafiği	54
Şekil 4.5. Obezite tedavisi öncesi ortalama kan glikoz sonuçları grafiği.....	56
Şekil 4.6. Obezite tedavisi sürecinde grupların ortalama kan glikoz sonuçları grafiği..	58
Şekil 4.7. Obezite tedavisi sürecinde grupların haftalık ortalama kan glikoz sonuçları grafiği.....	59
Şekil 4.8. Grupların ortalama platforma kaçış süreleri sonuçları grafiği	61
Şekil 4.9. Morris su tankında Kontrol Grubu ısı haritası.....	62
Şekil 4.10. Morris su tankında Kontrol+NaCl Grubu ısı haritası.....	63
Şekil 4.11. Morris su tankında Obez Grubu ısı haritası.....	63
Şekil 4.12. Morris su tankında Kontrol+DPP4i Grubu ısı haritası.....	64
Şekil 4.13. Morris su tankında Obez+DPP4i Grubu ısı haritası.....	64
Şekil 4.14. Morris su tankında Kontrol+Egzersiz Grubu ısı haritası.....	65
Şekil 4.15. Morris su tankında Obez+Egzersiz Grubu ısı haritası.....	65
Şekil 4.16. Morris su tankında Kontrol Grubu probe deneme ısı haritası	66
Şekil 4.17. Morris su tankında Kontrol+NaCl Grubu probe deneme ısı haritası	67
Şekil 4.18. Morris su tankında Obez Grubu probe deneme ısı haritası	67
Şekil 4.19. Morris su tankında Kontrol+DPP4i Grubu probe deneme ısı haritası	68
Şekil 4.20. Morris su tankında Obez+DPP4i Grubu probe deneme ısı haritası	68
Şekil 4.21. Morris su tankında Kontrol+Egzersiz Grubu probe deneme ısı haritası.....	69
Şekil 4.22. Morris su tankında Obez+Egzersiz Grubu probe deneme ısı haritası	69
Şekil 4.23. Gruplara ait Syp geni ortalama delta CT değerleri grafiği	71

Şekil 4.24. Gruplara ait Syp geni ortalama kat değişim değerleri grafiği	72
Şekil 4.25. Gruplara ait Syp protein düzeylerinin western blot görüntüleri.....	73
Şekil 4.26. Gruplara ait Syp protein düzeylerinin dansitometrik analizi sonrası ortalama bant yoğunluğu grafiği.....	74



TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Yetişkinlerde zayıflık, aşırı kilo ve obezitenin vücut kitle indeksine göre uluslararası sınıflandırılması.....	5
Tablo 2.2. Sinaptik Proteinler ve Özellikleri	10
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan özel karışım yüksek yağlı yem içeriği	35
Tablo 3.2. Öğrenme deneyinde sıçanların suya atış noktaları.	37
Tablo 3.3. cDNA Tepkime Koşulları	40
Tablo 3.4. qRT-PCR’da kullanılan TaqMan Primerler ve detayları	41
Tablo 3.5. PreAmp karışımı bileşenleri ve oranları	41
Tablo 3.6. PreAmp Tepkime Koşulları	42
Tablo 3.7. TaqMan primerleri yükleme için hazırlama bileşenleri ve oranları	43
Tablo 3.8. qRT-PCR için kullanılan bileşenler ve oranları.....	43
Tablo 3.9. Biomark Thermal Programı (qRT-PCR Tepkime Koşulları)	44
Tablo 4.1. Obezite tedavisi öncesi ortalama ağırlık değerleri.....	49
Tablo 4.2. Obezite tedavisi sürecinde grupların ortalama ağırlık değerleri.....	52
Tablo 4.3. Obezite tedavisi öncesi ortalama kan glikoz değerleri	55
Tablo 4.4. Obezite tedavisi sürecinde grupların ortalama kan glikoz değerleri.....	57
Tablo 4.5. Grupların ortalama platforma kaçış süreleri	60
Tablo 4.6. Hipokampus dokusunda gruptaki Syp genine ait kat değişimleri	70

ÖZET

DPP4 İNHİBİTÖRÜ İLE TEDAVİ EDİLEN OBEZ SIÇANLARDA ÖĞRENME VE SİNAPTOFİZİN İLİŞKİSİNİN ANALİZİ

Murat KORKMAZ

Doktora Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tez danışmanı: Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI

İkinci Tez danışmanı: Prof. Dr. Can DEMİREL

Ocak 2021, 101 sayfa

Bu çalışmanın hedefi; obeziteye bağlı ortaya çıkan bilişsel fonksiyonlardaki değişimin ve bu değişimlerin sinaptofizin molekülü ile ilişkisinin, tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan bir ilaç olan DPP4 inhibitörü ve egzersiz ile tedavi edilebileceği hipotezidir. Çalışmamızda 42 adet Wistar albino sıçan kullanıldı. Hayvanlar rastgele; obez, kontrol, kontrol+NaCl, obez+DPP4i, kontrol+DPP4i, obez+egzersiz, kontrol+egzersiz olarak yedi gruba ayrıldı. Deneysel obezite oluşturmak için obez olması hedeflenen hayvanlar ayrılarak, yüksek yağlı diyetle 8 hafta süreyle beslendi. Obez model oluşturulduktan sonra obezite tedavisi amacıyla DPP4i gruplarına sitagliptin, egzersiz gruplarına ise yüzme egzersizi uygulandı. Çalışmanın son haftası tüm gruplara Morris su tankı ile referans bellek öğrenme testi uygulandı. Ardından hayvanlardan anestezi altında hipokampus dokuları çıkarıldı. Çıkarılan dokulardan mRNA ve protein izolasyonları gerçekleştirildi. mRNA örneklerinden Real-Time PCR yöntemi ile Sinaptofizin gen ifade analizi yapıldı. Protein lizatlarından ise Western Blot yöntemi ile Sinaptofizin proteininin seviyeleri saptandı. Öğrenme testinde, obez gruplarda DPP4i ve egzersiz uygulanan gruplarla, uygulanmayan grupların ortalama platforma kaçış süreleri arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0.05$). Bunun sonucunda obezitenin DPP4i ve egzersiz ile tedavi edildiği gruplarda; obez gruplara göre bilişsel performansın daha iyi olduğu sonucuna varılmıştır. Sinaptofizin Geni ekspresyon seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla obez gruplarda belirgin bir azalma saptanmıştır. Tedavi gruplarında ise DPP4 inhibitörü ve özellikle egzersiz uygulanan gruplarda sinaptofizin gen ifade seviyelerinde kontrol gruplarına göre artış gözlenmiştir ($p>0.05$). Gen ekspresyon sonuçları, protein düzeyinde gerçekleştirilen analizlerde de benzerlik göstermiştir. Bu sonuçlara göre obeziteye bağlı bilişsel fonksiyondaki performans ve sinaptofizin geni ilişkisi açısından; DPP4 inhibitörü, egzersiz kadar etkin bir sonuç göstermiştir. Bu da ileri moleküler ve metabolik araştırmalar için bir kaynak teşkil etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Bilişsel fonksiyon, DPP4 İnhibitörü, obezite, öğrenme, sinaptofizin

ABSTRACT

ANALYSIS OF THE RELATIONSHIP BETWEEN LEARNING AND SYNAPTOPHYSIN IN OBESE RATS TREATED WITH DPP4 INHIBITOR

Murat KORKMAZ

PhD Thesis, Department of Medical Biology

Supervisor: Prof. Dr. Sibel OGUZKAN BALCI

Second Supervisor: Prof. Dr. Can DEMIREL

January 2021, 101 pages

The aim of this study is; the hypothesis is that the change in cognitive functions due to obesity and the relationship of these changes with the synaptophysin molecule can be treated with DPP4 inhibitor, a drug used in the treatment of type 2 diabetes, and exercise. In our study, 42 Wistar albino rats were used. The animals were randomly divided into seven groups as obese, control, control+NaCl, obese+DPP4i, control+DPP4i, obese+exercise, control+exercise. To create experimental obesity, the animals that are targeted to be obese were separated and fed on a high fat diet for 8 weeks. After the obese model was created, sitagliptin was applied to the DPP4i groups and swimming exercise was applied to the exercise groups for obesity treatment. The last week of the study was performed reference memory learning test to the whole group with Morris water maze. Then, the hippocampus tissues were removed from the animals under anesthesia. mRNA and protein isolations were performed from the extracted tissues. Gene expression analysis of Synaptophysin was performed by Real-Time PCR method from mRNA samples. Synaptophysin protein levels were determined from protein lysates by Western Blot method. In the learning test, in the obese groups, there was a statistically significant difference between the average escape time of the DPP4i and exercise groups and the groups that did not ($p<0.05$). As a result, in groups where obesity is treated with DPP4i and exercise; It was concluded that cognitive performance was better than obese groups. There was a evident decrease in synaptophysin gene expression levels in obese groups compared to the control group. In the treatment groups, an increase was observed in synaptophysin gene expression levels in the DPP4 inhibitor and especially in the exercise groups compared to the control groups ($p>0.05$). Gene expression results were similar in analyzes performed at the protein level. According to these results, in terms of performance in cognitive function due to obesity and synaptophysin gene relationship; DPP4 inhibitor showed as effective a result as exercise. This provides a resource for advanced molecular and metabolic research.

Keywords: Cognitive function, DPP4 Inhibitor, obesity, learning, synaptophysin

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Obezite, genel olarak, sağlığı etkileyecek derecede vücut yağının aşırı arttığı fizyolojik bir durum olarak tanımlanır. Obezite dünya nüfusu içinde o kadar yaygındır ki, insan sağlığına yetersiz beslenme ve bulaşıcı hastalıklar kadar önemli derecede etki eder hale gelmiştir. Birçok hastalığın altında yatan önemli bir neden olarak rol almaktadır. Özellikle, tip 2 diyabet (T2DM), koroner kalp hastalığı (KKH), belirli kanser formlarının görülme sıklığı, solunum komplikasyonları (obstrüktif uyku apnesi), osteoartrit, demans, nöropsikiyatrik hastalıklar ve daha birçok sağlık sorunlarının güçlü bir risk faktörü olarak karşımıza çıkmaktadır (1, 2)

Obezite, dünyanın birçok yerinde önlenabilir ölümlerin önde gelen nedenlerinden biridir. Bu sağlık sorunu gelişmekte olan ülkeleri olduğu kadar gelişmiş ülkeleri de etkilemiştir (1). Yapılan çalışmalar Türkiye'deki obezite oranlarının, Avrupa'daki en yüksek oranlara sahip olduğunu göstermektedir (3).

Küresel obezite salgını bugün önemli bir halk sağlığı sorunudur. Şu anda obeziteyi sınıflandırmak için kullanılan vücut kitle indeksi (VKİ), anormal veya aşırı vücut yağ birikiminin kabul görmüş en önemli ölçütüdür (4).

Tip 2 diyabette klinik kullanımda olan dipeptidil peptidaz-4 (DPP4) inhibitörleri, özellikle Glukagon benzeri peptid 1 (GLP-1)'in aktif formunun DPP4 aracılı degradasyonunu inhibe eder ve intakt peptid oranı yükselir, buna bağlı olarak gıda ilişkili insülin salınımını artırır ve antihiperglisemik etki ortaya çıkar (5, 6). DPP4 inhibitörlerinden biri olan sitagliptin; son zamanlarda üzerine birçok çalışma yapılmış olan oral anti-diyabetik bir ilaçtır. Deneysel bir çalışmada; yüksek yağlı diyet içerikleriyle beslenen sıçanların sitagliptin tedavisiyle periferik insülin duyarlılığının artış gösterdiği ve plazma aktif GLP-1 seviyelerinde önemli bir artış olduğu bildirilmiştir. Bunun yanında beyindeki mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stres azalmış; bilişsel fonksiyonlarda iyileşme izlenmiştir (7).

Obezite tedavisinde egzersiz klinik olarak öne çıkan tedavi seçeneğidir. Düzenli egzersiz depresyona, uyku düzenlenmesine ve bilişsel fonksiyona etki ederek sağlıklı yaşama katkı sağlayan bir faktördür (8).

Sinaptofizin (SYP), nöronların presinaptik veziküllerinden izole edilen majör bir integral membran glikoproteinidir. Sinaptofizinin yapısı, dört transmembran alanı, bir N-terminal glikozilasyon alanı, dokuz temel tetrapeptit motifi tekrarı, çoklu kollajenaza duyarlı bölge ve birkaç kolajen tipi tripeptit içerir. Sinaptofizin mRNA'sı, birçok nöroendokrin tümör hücre dizisinin yanı sıra sinir dokularında da ifade olmaktadır. PC12 hücrelerinde ve beyin sinaptik veziküllerinde, sinaptofizin kolesterolü bağlar ve kolesterolün tükenmesi sinaptik vezikül benzeri mikro-parçacıkların biyolojik oluşumunu bloke eder. Ek olarak, sinaptofizin, dinamin molekülünü Ca^{2+} bağımlı olarak bağlar ve bu etkileşimi bozan peptitlerin enjeksiyonu nöronların yüksek frekanslı stimülasyonu sırasında nörotransmitter salımını azaltır. Nörotransmitter salımındaki bu düşüş, sinaptofizin bağımlı vezikül alımının inhibe edilmesinden kaynaklanır. Dolayısıyla, sinaptofizin, sinaptik veziküllerin biyolojik oluşumunda ve geri dönüşümünde önemli rollere sahip olabilir. Sinaptofizin, hesaplanmış moleküler ağırlığı 33 kD olan bir entegral membran glikoproteinidir, ancak glikozilasyon nedeniyle 38-42 kD ağırlıkta olduğu bildirilmiştir (9-11).

Obezite, sağlığın bozulmasına yol açabilen anormal ya da aşırı yağ birikmesini içeren multifaktöriyel, oldukça karmaşık bir klinik durum olarak tanımlanırken, DPP4 inhibitörleri diyabeti inhibe edebilen ajanlar olarak, egzersiz ise obeziteyi geri çeviren, etkilerini azaltan farmakolojik olmayan bir yöntem olarak önem kazanmaktadır. SYP geni nöroendokrin hücreler ve hipokampusu içeren beyin dokularında ifade olmaktadır ve nörotransmisyonun düzenlediği bilinmektedir. Eldeki bu veriler ışığında, farmakolojik olmayan bir yöntem olan egzersiz ve DPP4 inhibitörü tedavilerinin obez hayvan modelinde SYP geni ve proteininin ifade düzeyleri ile karşılaştırmalı olarak nasıl ilişkilendirileceği, obezitenin azaltılmasında ya da engellenmesindeki ve obezitenin neden olduğu bilişsel bozukluğun önlenmesindeki veya azaltılmasındaki moleküler hedeflerin aydınlatılmasına katkı sağlaması açısından önemlidir.

Çalışmamızda DPP4 inhibitörleri ve egzersizin obezite tedavisindeki etkileri ile obezitede gerilediği bilinen bilişsel fonksiyonlar ve bu fonksiyonları etkilediği düşünülen sinaptofizin molekülü obez sıçan modelinde analiz edilmiştir. Araştırmada obezitede bilişsel fonksiyonlardaki değişimlerin bir veziküler protein olan sinaptofizin molekülü ile olan ilişkisinin aydınlatılması ve obezitede DPP4 inhibitörü ve egzersiz tedavilerinin etkilerinin karşılaştırmalı olarak ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla oluşturulmuş deney gruplarında bilişsel fonksiyonlar Morris su tankı öğrenme modeli kullanılarak değerlendirilmiştir. Bütün gruplarda izole edilen hipokampus dokularında Sinaptofizin (Syp) geninin mRNA ve protein ifade düzeyleri ile DPP4 inhibitörlerinin ve egzersizin etkileri, öğrenme düzeyleri ile ilişkilendirilmiştir. Dünyada önemli bir sağlık problemi olan obezitede, bilişsel fonksiyonlardaki değişimin moleküler mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik olan bu çalışma sonuçlarımızın, tedavi yöntemlerinin ve bu mekanizmalardaki diğer moleküler mekanizmaların aydınlatılmasına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Obezite Tanımı ve Epidemiyolojisi

Obezite, özellikle T2DM, KKH, obstrüktif uyku apnesi, osteoartrit, astım ve belirli kanser türleri gibi bir dizi kronik hastalık için bir risk faktörüdür. Sonuç olarak yaşam süresini ve kalitesini düşürdüğü ortaya konmuştur (12-15). Bu nedenle, obezite çağımızın en önemli halk sağlığı sorunlarından birini oluşturmaktadır ve hem bireysel sağlık hem de ülkelerin sağlık sistemleri açısından büyük önem taşımaktadır. Obezite klasik olarak VKİ'ne göre tanımlanır ancak VKİ'nin aşırı veya anormal vücut yağ birikiminin tam anlamıyla kusursuz bir ölçüsü olmadığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalar, bel çevresi ölçüsü gibi niceliklerle vücut yağ dağılımının dikkate alınmasının hastalık öngörüsünü arttırabileceğini göstermiştir (16).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO), obeziteyi “yağ dokusunda sağlığın bozulabileceği ölçüde anormal veya aşırı yağ birikimi durumu” olarak tanımlamaktadır. Uluslararası kabul görmüş bir yöntem ile obezite, kilogram cinsinden ağırlık olarak hesaplanan VKİ'ne göre metre cinsinden yüksekliğe bölünerek sınıflandırılır. WHO ve batı toplumları için en güncel kılavuzlara göre obezite, $VKİ \geq 30 \text{ kg} / \text{m}^2$ olarak tanımlanmıştır (17, 18). Yetişkinlerde 25.0 ila 29.9 kg / m^2 'lik bir VKİ ise aşırı kilolu olarak tanımlanmaktadır (19). Dünya çapında, 2,1 milyar kişi üzerinde yapılan bir çalışmada, 1980-2013 yılları arasında aşırı kilolu veya obez olma sıklığı, yetişkinler için %27,5 ve çocuklar için %47,1 olarak bulunmuştur (20).

Tablo 2.1. Yetişkinlerde zayıflık, aşırı kilo ve obezitenin vücut kitle indeksine göre uluslararası sınıflandırılması (21)

VKİ (kg/m ²)		
Sınıflandırma	Temel Kesişim Noktaları	Geliştirilmiş Kesişim Noktaları
Zayıf (Düşük ağırlıklı)	<18.50	<18.50
Aşırı düzeyde zayıflık	<16.00	<16.00
Orta düzeyde zayıflık	16.00 - 16.99	16.00 - 16.99
Hafif düzeyde zayıflık	17.00 - 18.49	17.00 - 18.49
Normal	18.50 - 24.99	18.50 - 22.99
		23.00 - 24.99
Fazla kilolu	≥25.00	≥25.00
Preobez	25.00 - 29.99	25.00 - 27.49
		27.50 - 29.99
Obez	≥30.00	≥30.00
Obez I. derece	30.00 - 34.99	30.00 - 32.49
		32.50 - 34.99
Obez II. derece	35.00 - 39.99	35.00 - 37.49
		37.50 - 39.99
Obez III. derece	≥40.00	≥40.00

Tablo 2.1’de verilen nicel sınıflandırmalarla ifade edilen tanımlamalara ek olarak, obezite, kronik pozitif enerji dengesinden kaynaklı, yani besinlerden elde edilen enerji alımı, enerji harcamasını aştığında ortaya çıkan çok faktörlü bir hastalıktır. Fazla enerji, boyutu genişleyen yağ hücrelerinde depolanan, böylece vücut yağlarını artıran ve kilo alımına neden olan trigliserit haline dönüştürülür. İşlenmiş ve uygun fiyatlı gıda üreten ve enerji bakımından yoğun, ancak besin açısından fakir yiyecek ve içeceklerin aşırı

tüketimini teşvik eden gıda sistemlerinin küreselleşmesi, obezite salgınının ana itici gücü olarak tanımlanmıştır. Yaşam tarzlarının modernizasyonunun da bu itici güce dahil olmasıyla birlikte bu sorun küresel hale gelmiştir. Obezite eğilimlerini değerlendiren daha önceki çalışmalar, hem yetişkinlerde hem de her yaştan çocukta prevalansının arttığını, coğrafi konum, etnik köken veya sosyoekonomik durumun ayrımı olmadığını ortaya koymuştur. Düşük gelirli ülkelerde, obezite genellikle varlıklı ve kentsel çevrelerde orta yaşlı yetişkinler arasında daha yaygındır; oysa yüksek gelirli ülkelerde her iki cinsiyeti ve tüm yaşları etkilemektedir (22-24).

Türkiye’de obezite sıklığını ortaya koymak için yapılan farklı çalışmaların sonuçları da birbirine paralellik göstermektedir. Türkiye Obezite ve Hipertansiyon Araştırması (TOHTA) verilerine göre obezite prevalansı; kadınlarda %50,0; erkeklerde %40,0, Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması-II (TURDEP II) verilerine bakıldığında obezitenin prevalansı, kadınlarda %38; erkeklerde %22, Türkiye Obezite Profiline göre ise toplam prevalans %34,3; kadınlarda %48,4, erkeklerde ise %16,9 olarak bildirilmiştir (25).

Obezite, birçok fiziksel ve zihinsel hastalığın riskini artırır. Bu komorbiditeler en yaygın olarak metabolik sendromlarda gösterilir. T2DM, hipertansiyon, yüksek kolesterol ve trigliserit seviyeleri bu tıbbi sendromların bir kombinasyonu olarak gösterilmektedir (14, 26).

Komplikasyonlar ya doğrudan obeziteden kaynaklanır ya da yetersiz beslenme veya hareketsiz yaşam tarzı gibi ortak bir nedeni paylaşan mekanizmalar yoluyla dolaylı olarak meydana gelir. Obezite ile belirli koşullar arasındaki bağlantının gücü değişkenlik gösterir. En güçlülerinden biri, T2DM ile olan bağlantıdır. Fazla vücut yağı, erkeklerde diyabet vakalarının %64’ünü, kadınlarda ise % 77’sini oluşturmaktadır (27). Vücut yağı miktarındaki artışlar, vücudun insüline tepkisini değiştirerek potansiyel olarak insülin direncine yol açar. Artan yağ miktarı aynı zamanda proinflamatuvar ve protrombotik bir durum oluşturur (28-31).

Yakın zamanda yapılan çalışmalar obezitenin, 2019 koronavirüs (COVID-19) hastalığına yakalanma ve bu hastalıktan etkilenme riskini ciddi oranlarda arttırdığını göstermiştir (32, 33).

2.2. Obezite Etiyolojisi

Obezitenin nedenlerini belirlemek, bu sağlık sorunu ile m¼cadele çabalarının merkezinde yer almaktadır. Metabolik kusurlar gibi, genetik fakt¼rlerin de potansiyel etkileri ¼zerine birçok çalışma yapılmıştır ve bu çalışmalar, etkilenen bireyleri obezite gelişmesine yatkın hale getiren gen mutasyonlarının belirlenmesinde ¼nemli sonuçlar vermiştir. Bununla birlikte, bu sonuçlar sadece morbid obez hastaların k¼¼k bir y¼zdesi için g¼sterilmiřtir ve vakaların çoğunda tek bir genetik neden s¼z konusu değildir. Son yıllarda belgelenen, çarpıcı biçimde artan obezite oranlarının nispeten değışkenlik g¼stermeyen bir gen havuzunda meydana gelmesi, bu bilginin doğruluğunu destekler niteliktedir (34).

Zaman içinde obezite prevalansındaki değışimlerin çoğ, sosyal veya psikolojik koşullardaki değışikliklere değil, pozitif bir enerji dengesini destekleyen bir evre ile gıda arzı sınırlı olduğunda gelişen bir iştah kontrol sisteminin kombinasyonuna dayanmaktadır. Artık sanayileşmiş ¼lkelerde bol, oldukça lezzetli bir gıda arzı bulunmaktadır. Aynı zamanda, ulaşım sistemleri ve makineleşme, g¼nl¼k yaşamın enerji taleplerini azaltmıştır. İnsanlar enerji kaynaklarını depolayacak şekilde evrimleşmişse, bu kadar çok insanın artık aşırı kilolu olması şaşırtıcı değildir. Bu evrimsel bakış açısı, bir n¼fus d¼zeyindeki yaygınlık oranlarındaki artışı açıklamaya hizmet edebilirken, bazı insanların neden aşırı kilolu/obez olduğunu, neden bazılarının sabit bir v¼cut ağırlığını koruduğunu ya da gerçekte diğierlerinin neden d¼ř¼k v¼cut ağırlığını korumayı başardığını tek başına açıklayamamaktadır (35).

Bireysel d¼zeyde, aşırı gıda enerjisi alımı ve fiziksel aktivite eksikliğinin, çoğ obezite vakasını açıkladığı d¼ř¼n¼lmektedir (36). Sınırlı sayıda vaka tek bir sebepten kaynaklı olacak şekilde, ¼ncelikle genetik, tıbbi nedenler veya psikiyatrik hastalığa bağlıdır (37). Bunun tersine, toplumsal d¼zeyde obezite oranları artışının, kolay erişilebilir ve lezzetli beslenme, arabalara artan bağımlılık ve mekanize ¼retimden kaynaklandığı d¼ř¼n¼lmektedir (38-40).

Yapılan çalışmalara g¼re, obezitenin son yıllardaki artışına; yetersiz uyku, endokrin bozucular (lipid metabolizmasına m¼dahale eden çevresel etkenler), ortam sıcaklığı değışkenliğinin azalması, kilo alımına neden olabilecek ilaç kullanımının artması (atipik antipsikotikler gibi), kilo alma eğilimdeki yaş gruplarında y¼ksek oranda ağırlık artışı, ileri gebelik yaşının artışı (ocuklarda obeziteye yatkınlığa neden olabilmektedir),

kuşaktan kuşağa geçen epigenetik risk faktörleri ve doğal seleksiyon gibi önemli sebeplerin etkisi büyüktür (41).

Endokrin Topluluğuna göre, "obezitenin, aşırı kiloların pasif birikiminden kaynaklanmaktan çok, enerji homeostaz sisteminin bir bozukluğu olduğunu gösteren güçlü ve giderek artan kanıtlar bulunmaktadır" (42).

2.3. Obezite Tedavisi

Obezite, dünya çapında önlenabilir ölümlerin önde gelen nedenlerinden biridir (43, 44). Obezitenin temel tedavisi, kalori kısıtlı diyet ve fiziksel egzersiz yoluyla kilo vermektir (36, 45). Yaşam tarzı değişikliğinin bir parçası olarak diyet, zamanla yavaş kilo almaya rağmen sürekli kilo kaybına neden olur (46, 47). Ulusal Kilo Kontrol Kayıt Defterindeki katılımcıların %87'si 10 yıl boyunca %10 vücut ağırlığı kaybını koruyabilmiş olsa da, uzun vadeli kilo kaybı için en uygun diyet yaklaşımı hala bilinmemektedir (48).

İlaç tedavisi olarak orlistat, lorcaserin, liraglutide, phentermine-topiramate ve naltrekson-bupropionun uzun süreli kullanımına dair yapılmış çalışmalar ve veriler bulunmaktadır. Bir yıl sonra kilo kaybına neden olurlar. Bu kilo kaybı plaseboya göre 3,0 ila 6,7 kg arasında değişkenlik göstermiştir (49). Avrupa düzenleyici otoriteleri, lorcaserin ile kalp kapağı problemleri ve phentermine-topiramate ile de daha genel kalp ve kan damarı problemleri görülmesi nedeniyle bu iki ilacı kısmen reddetmiştir (50). Lorcaserin, Amerika Birleşik Devletleri'nde ise kanserle ilişkisi gösterilmesi nedeniyle 2020 yılında piyasadan kaldırılmıştır (51). Orlistat kullanımı, yüksek oranda gastrointestinal yan etki ile ilişkilidir ve böbrekler üzerindeki olumsuz etkiler konusunda endişeler ortaya çıkmıştır (52, 53). Bu ilaçların kardiyovasküler hastalık veya ölüm gibi uzun vadeli obezite komplikasyonlarını nasıl etkilediğine dair hiçbir bilgi bulunmamaktadır (54).

Obezite için en etkili tedavi bariatrik cerrahidir (55). Prosedür türleri arasında laparoskopik ayarlanabilir mide bandı, Roux-en-Y gastrik baypas, dikey kollu gastrektomi ve biliopankreatik saptırma yöntemleri yer almaktadır (49). İlaçlı veya ilaçsız davranışsal tedavilere yanıt vermeyen yetişkinler için, ABD'deki ve ülkemizdeki obezite kılavuzları, onları obezite cerrahisi hakkında bilgilendirmeyi tavsiye etmektedir (56, 57). Şiddetli obezite durumlarında ameliyat, uzun vadeli kilo kaybı, obezite ile ilgili

durumlarda iyileşme ve obeziteye bağlı genel ölüm oranının azalması ile ilişkilidir, ancak, bu sonuçların ameliyattan değil, ameliyat sonrası kilo kaybından kaynaklı metabolik sağlık sonuçlarının iyileşmesi olduğuna dikkat edilmelidir (58, 59). Yapılan bir çalışmada, uygulanan cerrahi prosedürün türüne bağlı olarak 10 yılda %14 ile %25 arasında bir kilo kaybı meydana geldiği gösterilmiştir (60). Vakaların yaklaşık %17'sinde komplikasyonlar meydana gelmektedir ve vakaların %7'sinde yeniden ameliyat gerekebilir (59). Araştırmacılar, maliyet ve riskleri nedeniyle, midede yer kaplayan cihazlar da dahil olmak üzere başka etkili ve daha az invaziv tedaviler arayışı içindedirler (59, 60).

2.4. Sinaptik Veziküller

Sinaptik veziküller (SV), tek tip boyutta ve bol miktarda organellerdir. Çapları elektron mikroskobu ile değerlendirildiğinde ~ 40 nm'dir, ancak doğal koşullar altında muhtemelen biraz daha büyüktürler. Nispeten küçük organeller olarak, SV sadece sınırlı sayıda protein ve fosfolipidi barındırabilir. Doğrudan ölçümler olmamasına rağmen, hesaplamalar, SV'nin vezikül başına yaklaşık 10.000 fosfolipit molekülü ve yaklaşık 5.000.000 ila 10.000.000 proteinin birleşik moleküler ağırlığını içerdiğini göstermektedir. Bu, bir protein için ortalama 50.000 moleküler ağırlıkla, bir sinaptik vezikülde maksimum 200 protein molekülünün mevcut olduğu anlamına gelir (61-63).

SV'nin net olarak bilinen tek işlevi nörotransmitter salınımıdır. SV biyolojide en iyi tarif edilen organeller olabilir, proteinlerinin tümü olmasa da çoğunun yapıları artık bilinmektedir. Günümüze kadar tanımlamaları tamamlanabilmiş olan sinaptik vezikül proteinlerinin bir listesi Tablo 2.2'de sunulmuştur. Birçok sinaptik vezikül proteininin fonksiyonları hala belirsizdir (63).

Tablo 2.2. Sinaptik Proteinler ve Özellikleri (63)

Proteinin İsmi	Proteinin Özellikleri
1. Sinaptik vezikül proteinleri (Şekil 2.1)	
Sistein dizisi proteini (CSP)	Ondan fazla sistein üzerinde palmitoillenmiş ve bir DNA-J homoloji alanı içeren periferik membran proteinidir. İşlevi bilinmemektedir.
Sitokrom b561	Salgı veziküllerinin alt kümelerinde intraveziküler monooksijenazlar için gerekli elektron taşıma proteinidir. Dopamin-β-hidroksilaz ve peptit amidaz aktivitesi için gereklidir.
Nörotransmitter taşıyıcılar	Muhtemelen glutamat, asetilkolin, katekolaminler, glisin / GABA ve ATP'ye özgü en az beş tür taşıma proteini vardır. Taşıyıcı türü, bir sinapsın verici özgülüğünü belirlemeye katkıda bulunur.
Rab and ra1 proteinleri	Rab3A, rab3C, rab5, rab7 ve ra1. Rab proteinleri sitozolik ve zara bağlı formlar arasında döngü yaptığından, tüm SV aynı anda tüm rab proteinlerini içermez. Rab proteinleri, yerleştirme ve füzyon süreçlerini düzenler.
Rabphilin-3A	GTP'nin bir fonksiyonu olarak rab3A ve rab3C'ye bağlanan periferik membran proteini, çoklu protein kinazlar için substrattır ve Ca^{2+} 'yi bağlayabilen iki C-terminal C_2 domaini içerir.
Salgı taşıyıcı membran proteinleri (SCAMPler)	Her yerde bulunan bu integral membran proteinleri, salgılama ve bilinmeyen fonksiyona sahip taşıma veziküllerinden oluşur.
SV2ler	12 transmembran bölge içeren, bakteriyel ve ökaryotik taşıyıcılar ile homoloji gösteren en az üç izoformlu (SV2A, B ve C) yüksek glikosile proteinlerdir. İşlevleri tam olarak bilinmemektedir.
Sinapsinler Ia, Ib, IIa and IIb	CaMKI ve protein kinaz A için fosforilasyon bölgeleri dahil olmak üzere ortak N-terminal alanlarına sahip, ancak C-terminalinden ayrılan monotopik membran proteinleridir. Sinapsinler Ia / b, CaMKII ve CDK 5 için C-terminal fosforilasyon bölgeleri içerirler. Aktin mikrofilamentleri, nörofilamentler, mikrotübüller, SH3 alanları, kalmodulin ve annexin VI ile in vitro etkileşirler.

Sinaptobrevinler (VAMPler)	Tetanoz toksini ve botulinum toksinleri B, D, F ve G tarafından parçalanan küçük zar proteinleridir.
Sinaptogyrin	Tirozinle fosforile edilmiş politopik membran proteini. İşlevi bilinmemektedir.
Sinaptofizinler	Tirozinle fosforile olan ve sinaptobrevinlere bağlanan sinaptoporin dahil politopik membran proteinleri. İşlevleri tam olarak bilinmemektedir.
Sinaptotagminler	C2 alanlarını içeren en az 12 izoformlu zar proteinleri; Ca^{2+} ve fosfolipidleri bağlar; ve nöroksinler, AP2 ve sintaksinlerle etkileşim kurar. Sinaptotagmin I ve II, muhtemelen hızlı Ca^{2+} bağımlı nörotransmitter salımında Ca^{2+} sensörleri olarak işlev görür; diğer sinaptotagminlerin işlevleri bilinmemektedir.
Klorür ve çinko için taşıma proteinleri (kanallar)	SV'nin çoğunda glutamat alımı ve çinko alımı için klorür akışına aracılık eden bileşenleridir. Çinko taşıyıcılar, endozomal ve plazma membranlı çinko taşıyıcılara homologdur; klorür taşıyıcılarının tanımlanması gerekmektedir.
Vakuolar proton pompası	12'den fazla alt üniteden oluşan protein kompleksidir. SV'nin en büyük bileşenini oluşturur ve nörotransmitter alımı için elektrokimyasal gradyan oluşturur.

2. Sinaptik veziküllerle ilişkili proteinler

Amfifizin	SV ile muhtemelen AP2 yoluyla birleşen ve sinaptotagmin'e bağlanan bir sinir terminali proteinidir. Endositozda işlev görebilir.
AP2 ve klatrin	AP2, endositoz için klatrinin birleşmesini tetiklemek üzere SV ve plazma membranları üzerindeki belirli bir reseptöre bağlanan bir protein kompleksidir.
Ca^{2+} , kalmodüline bağımlı protein kinazlar	Sinapsinleri ve rabfilin-3A'yı fosforile etmek için SV'le geçici olarak birleşebilir. İşlevi bilinmemektedir.

I ve II (CaMKI ve CaMKII)

Dinamin-1	Protein kinaz C ile fosforile olan, membran depolarizasyonu üzerine kalsinörin ile defosforile edilen ve AP2'ye bağlanan bu protein, endositoz için GTPaz'a ihtiyaç duyar. Gelişme için önemli ancak işlevi bilinmemektedir.
Dinein	Mikrotübül bazlı sinaptik vezikül taşınmasına aracılık eden motor proteindir. Hücre gövdesine retrograd aksonal taşınmada rol oynayabilir.
GDP ayrışma inhibitörleri (GDI'ler)	İzoprenillenmiş rab proteinlerini GDP bağlı formda bağlayarak bir sitoplazmik kompleks oluşturur.
Kinesinler	Mikrotübül bazlı sinaptik vezikül taşınması için gerekli motor proteinlerdir.
MSS4	Rab1, rab3 ve rab8 dahil rab proteinlerinin bir alt grubuna sıkıca bağlanan ve her yerde bulunan bir proteindir. İşlevi bilinmemektedir.
pp60 ^{src}	Sinaptofizin ve sinaptogyrini fosforile eden bir tirozin kinazdır.

3. Sinaptik plazma membran proteinleri

Munc13'ler	Forbol esterlerini bağlar ancak bir protein kinaz değildir. İşlevi bilinmemektedir.
Nöreksinler	Üç genden alternatif uç birleştirme ile oluşturulan ve 1.000'den fazla izoform içeren hücre yüzeyi proteinleridir. Nöroksinler, α -latrotoksin reseptörlerinden birini içerir ve nöronlar arasında hücre-hücre tanınmasında işlev görebilir.
SNAP-25	Botulinum toksinleri A ve E tarafından parçalanmış ve sintaksinlere bağlanan palmitoillenmiş periferik membran proteindir.
Sintaksinler (HPC-1)	Botulinum toksini C1 tarafından parçalanmış ve sinaptotagminlere, SNAP-25'e, sinaptobrevinlere, komplekslere, munc13'lere,

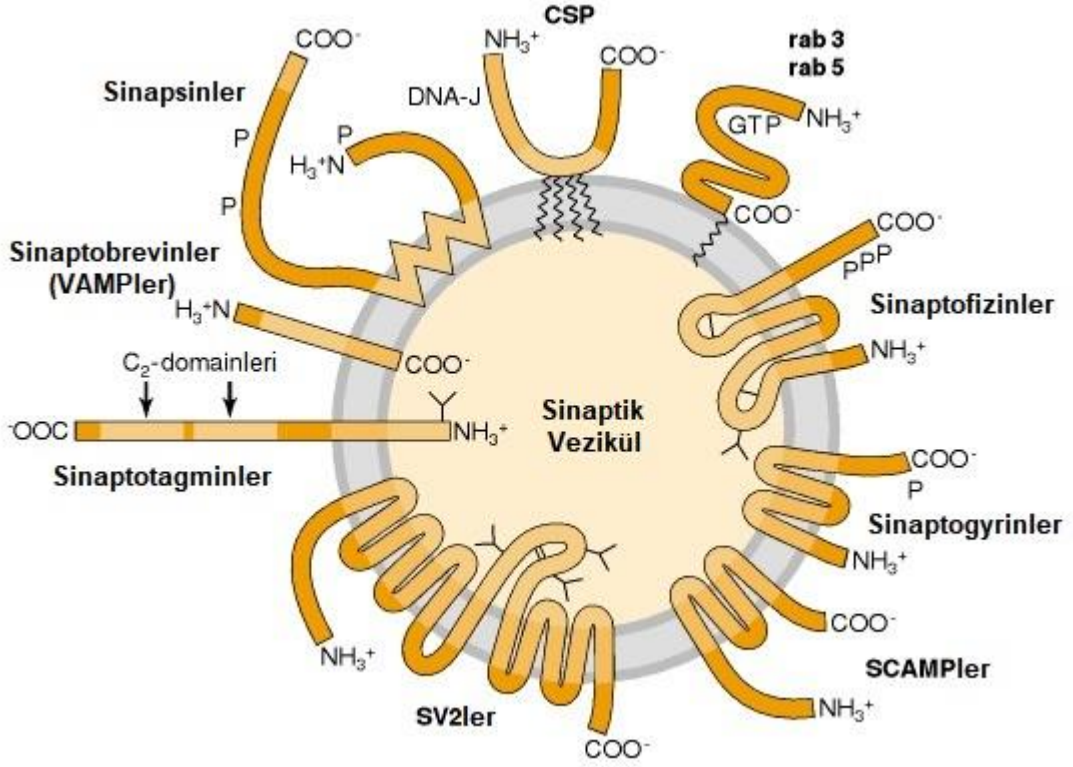
SNAP'lere, Ca^{2+} kanallarına ve munc18'lere bağlanan, her yerde bulunan membran proteinleridir.

Voltaj kapılı Ca^{2+} kanalları	Aktif bölgede nörotransmitter salınımı için Ca^{2+} akışına aracılık ederler.
RIM	GTP bağımlı bir şekilde rab3'e bağlanır ve füzyonun düzenlenmesinde rab3 faaliyetine aracılık edebilir.

4. Plazma membran proteinleriyle tersine çevrilebilir şekilde birleşen proteinler

Munc18'ler	Sintaksinlere sıkıca bağlanırlar.
<i>N-etilmaleimide duyarlı faktör</i> (NSF)	Veziküler taşıma sırasında in vitro membran füzyonu için gerekli trimerik ATPaz. Muhtemelen sinaptik vezikül geri dönüşümünde şaperonlar olarak işlev görmektedir.
$\alpha/\beta/\gamma$ -SNAP'lar	NSF'yi ATP'ye bağımlı bir şekilde zarlara katmak için gerekli olan çözünür NSF-bağlanma proteinleridir.

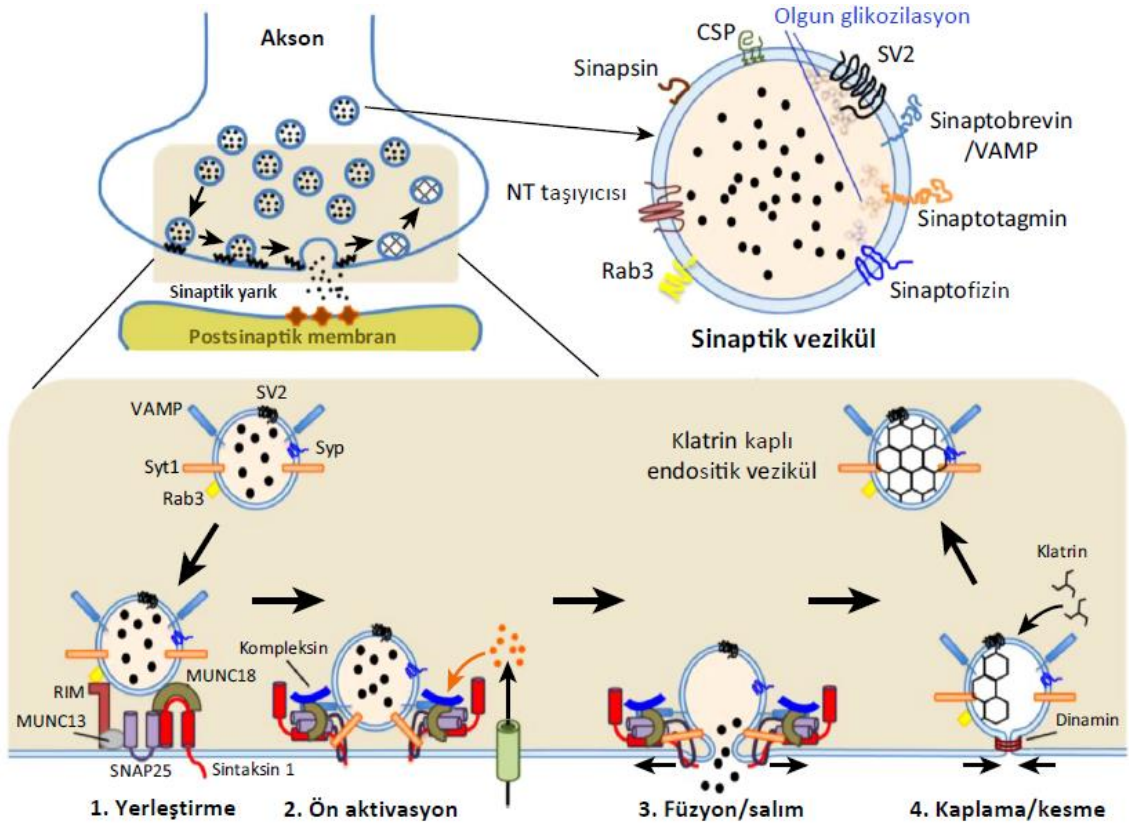
SV'in proteinleri, işlevlerine göre iki sınıfa ayrılır. Birinci sınıf, nörotransmitterlerin ve diğer bileşenlerin SV'e alımını gerçekleştiren taşıma proteinlerini içerir; ikinci sınıf ise, SV'nin hücre içi trafiğine aracılık eden trafik proteinlerini içerir. Sinaptik vezikül proteinlerinin taşıma sınıfı, sinaptik vezikülün içeriğini asitleştiren ve böylece bir elektrokimyasal zar geçiş gradyanı oluşturan proton pompasını içerir. SV'nin proton pompası vakuolar tiptedir ve en az 12 alt birimden oluşur. Muhtemelen her sinaptik kesecikte proton pompasının yalnızca tek bir kopyası mevcuttur. Proton pompasının toplam boyutu yaklaşık 600 ila 700 kDa'dır, bu da sinaptik vezikül üzerindeki tek bir kopyanın toplam sinaptik vezikül proteininin yaklaşık %10'unu oluşturacağını düşündürmektedir. Proton pompası tarafından oluşturulan elektrokimyasal gradyan, bir sinapsın verici tipinin oluşturulmasına önemli ölçüde katkıda bulunan nörotransmitter taşıyıcıları aracılığıyla, nörotransmitterlerin alımını besler. Ek olarak SV, Zn^{2+} taşınması, Cl^- akışı ve muhtemelen diğer aktiviteler için gerekli yardımcı taşıma proteinlerini içermektedir (63).



Şekil 2.1. Sinaptik veziküllerin trafiğinde görev alan proteinler (63)

SV'nin trafiğinde görev alan proteinlerinin çoğu, Şekil 2.1'de şematik olarak tasvir edilmiştir. Doğrudan SV'e bağlanan ve zar trafiğinde varsayılan işlevleri olan dokuz protein ailesi bulunmaktadır. Şekil 2.1, SV'nin proteinlerinin ortak bir yapısal temayı paylaşmadığını göstermektedir. Diğer organellere benzer şekilde, SV monotopik ve politopik proteinleri, sinapsinleri, sistein dizi proteini (CSP) ve rab proteinleri dahil olmak üzere ilişkili membran proteinlerini içerir. Sinaptik keseciklerde dört transmembran bölge içeren proteinlerin sayısı dikkat çekicidir. Bu topoloji, birden fazla sinaptik vezikül proteini ailesinde bağımsız olarak tekrarlanan tek topolojidir. Diğer tüm transmembran topolojileri sadece tek bir protein ailesinden meydana gelir. Dört transmembran bölgenin aynı topolojisine sahip üç farklı protein ailesi bulunmaktadır, bunlar; sinaptofizinler, sinaptogyrinler ve salgı taşıyıcı membran proteinleri (SCAMP'ler) (Tablo 2.2). Bu proteinlerin fonksiyonları, belirsizliğini korumaktadır. Birlikte ele alındığında, SV, çok çeşitli topolojiler ve yapılar sergileyen sınırlı sayıda zar proteininden meydana gelmektedir (Şekil 2.1) (63).

SV'ler, akson boyunca nörotransmitterleri (Şekil 2.2, siyah noktalar) içselleştirip depoladıkları presinaptik terminallere giden özel sferoid membran yapılarıdır. SV membranı, CSP, Rab3 ve VAMP gibi proteinleri ve de bazıları yüksek düzeyde glikozile edilmiş (sinapsin, sinaptotagmin, sinaptik vezikül proteini-2 (SV2) ve sinaptofizin) olan proteinleri barındırır ve bunların, etkili bir nörotransmisyon için hassas bir şekilde sınıflandırılması gerekmektedir (64).



Şekil 2.2. Presinaptik moleküller ve dinamikler (64)

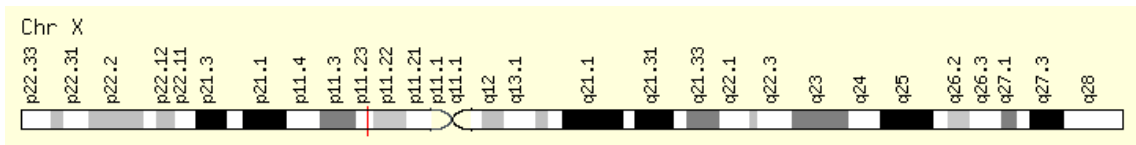
Nörotransmitter yüklü SV'ler, Rab3'ün RIM proteini ile etkileşimi ile presinaptik membrana yerleşir. Yerleştirme aşamasında SV'ler SNARE üçlü kompleksi (sintaksin 1, SNAP25 ve VAMP) ve SNARE efektörleri (MUNC'ler) ile yakın temas halinde görüntülenir. Ardından sinaptofizin tarafından algılanan artan Ca^{2+} presinaptik konsantrasyonlarına yanıt olarak, karmaşık konformasyonun proteinleri, SV'lerin plazma membranı ile kaynaşmasına ve içeriklerinin sinaptik yarığa salınmasına neden olarak bir ön aktivasyon işlemi gerçekleştirirler. Daha sonra füzyon / salım aşamasında, boş SV'ler

klatrin polimerleri ile kaplamaya ve plazma membranından dinamin kaynaklı kesmeye tabi tutulur. Kaplama / kesme işlemiyle, SV membran proteinlerinin geri dönüştürülmesine izin verilir (Şekil 2.2) (64).

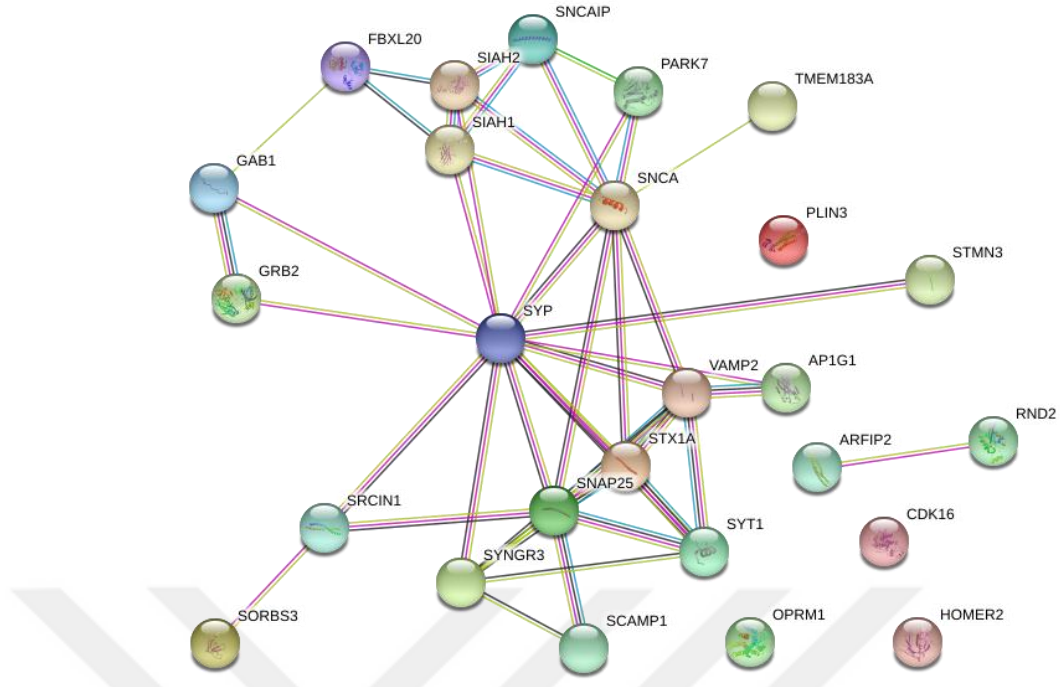
2.4.1. Sinaptofizin

Sinaptofizin (SYP), SV'de lokalize edilmiş bütünleyici bir zar proteindir (65). Vezikül presinaptik membran ile birleştiğinde oluşan gözenek kompleksinin bir parçasını içerdiği ve nörotransmisyonun etkinliğini değiştirdiği düşünülmektedir. Sinaptik terminaller için özel ve hassas bir belirteçtir (66-69). Sinaptofizin konsantrasyonlarının Alzheimer hastalığı (AD)'nda belirli beyin bölgelerinde azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca etkinliğinin şizofreni gibi nörodejenaratif hastalıklar ve psikiyatrik bozukluklarla da ilişki olduğu gösterilmiştir. Sinaptofizin ekspresyonundaki artışların, uzun dönem kuvvetlendirme (LTP) ile ilişkili olduğu bulunmuştur, bu da sinaptofizin ekspresyonunun düzenlenmesinin öğrenme ve belleğin altında yatan mekanizmalara katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir (70-75).

Majör sinaptik vezikül proteini p38 olarak da bilinen sinaptofizin, insanlarda SYP geni tarafından kodlanan bir proteindir (76). Bu gen, X kromozomunun (Xp11.23-p11.22) kısa kolunda bulunmaktadır (Şekil 2.3) (77). 12.406 baz uzunluğundadır ve eksi yöndeki iplikçik üzerinde uzanır. Kodlanan proteinin uzunluğu 313 amino asit ve molekül ağırlığı 33.845 kDa'dur (78).



Şekil 2.3. SYP geninin X kromozomu üzerindeki yerleşimi (77)



Şekil 2.4. SYP geninin etkileşimde olduğu proteinler (79)

Sinaptofizin, 38 kDa ağırlığındaki dört transmembran alanı olan bir sinaptik vezikül glikoproteinidir. Nöroendokrin hücrelerde ve sinaptik iletime katılan beyin ve omurilikteki hemen hemen tüm nöronlarda bulunur. Nöroendokrin tümörler için bir belirteç görevi görür ve sinaptaki her yerde bulunması, sinapsların ölçümü için sinaptofizin immün boyamasının kullanılmasını gündeme getirmiştir (80). Proteinin tam işlevi bilinmemekle birlikte, esansiyel sinaptik vezikül proteini sinaptobrevin ile etkileşime girmektedir fakat SYP geni hayvanlarda deneysel olarak etkisiz hale getirildiğinde, sinaptobrevinler yine de normal şekilde gelişir ve işlev görürler (81). Bununla birlikte son araştırmalar, farelerde sinaptofizinin ortadan kaldırılmasının, nesneleri tanıma azalma, keşif davranışlarında artış ve uzamsal öğrenmede azalma gibi davranış değişiklikleri meydana getirdiğini göstermiştir (82).

SYP genindeki patojenik mutasyonlar, X kromozomuna bağlı bilişsel problemler ile ilişkilendirilerek, hastalığın taramalarına dahil edilmiştir (83). İmmünohistokimya yöntemi kullanılarak sinaptofizin, adrenal medulla ve pankreas adacıklarının hücreleri dahil olmak üzere bir dizi nöral ve nöroendokrin dokularda gösterilebilir. Bu dokular için spesifik bir belirteç olarak, nöroblastoma, retinoblastoma, feokromositoma, karsinoid, küçük hücreli karsinom, medulloblastoma ve medüller tiroid karsinomu gibi bunlardan

kaynaklanan tümörleri tanımlamak için kullanılabilir (84). Syp'nin baskılanıp ifade edilmediğinde, güçlü presinaptik frekanslarda sinaptik bilgi transferinin azalmasıyla tanımlanan, kısa süreli sinaptik depresyona neden olduğu da yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (85-87).

Histopatolojik açıdan ele alındığında SYP, nöroendokrin salgı granül membranının ayrılmaz bir parçası olan ve çeşitli nöroendokrin tümörlerde monoklonal antikor (SY38) tarafından tanınan bir glikoproteindir (65, 88). Sinaptofizin, kromogranine karşı antikora göre daha yüksek duyarlılığa, ancak daha düşük spesifikliğe sahip geniş spektrumlu bir nöroendokrin belirteçtir (89). SY38 için immün boyamanın nöroendokrin tip metastazları belirlemede en etkili yöntem olduğu da yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Sinaptofizin immün boyama, tek başına bir neoplazmı "nöroendokrin" olarak adlandırmak için yeterli değildir. Uygun morfoloji bağlamında kullanıldığında, nöroendokrin özelliklerin belirlenmesi için fayda sağlamaktadır (88).

2.5. İncretinler

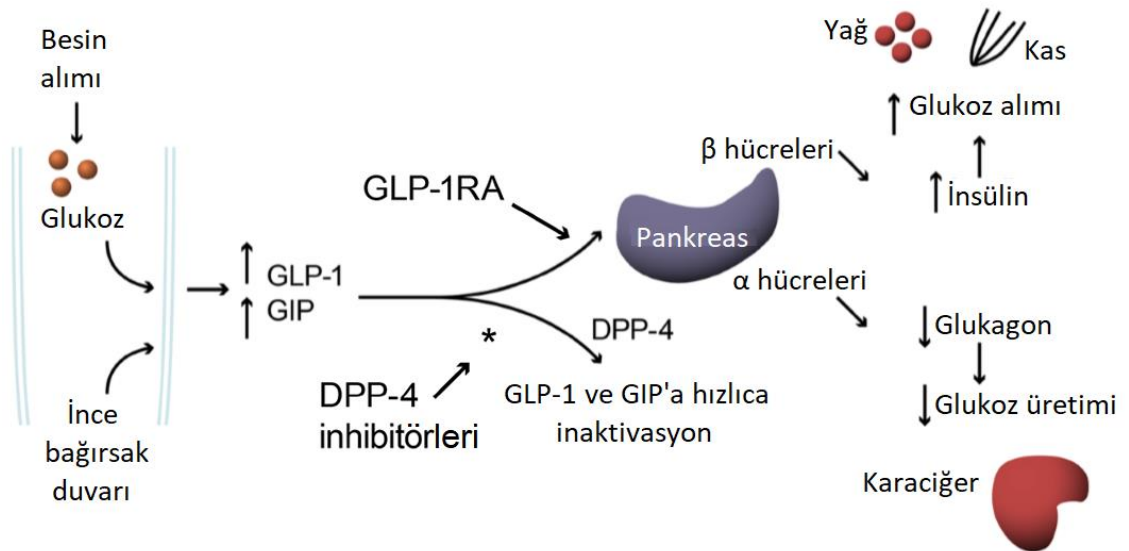
Oral glikoz uygulamasını takiben plazma insülin seviyelerindeki artış, iki koşul sırasında glikoz seviyeleri eşleştğinde intravenöz glikoz uygulamasından sonra görülen artışı aşmaktadır (90). Bu durum, oral glikozdan sonra salgılanan ve insülin salgılanmasını artıran bağırsak hormonlarıyla ilişkilendirilen inkretin etkisi olarak tanımlanmaktadır. En önemli iki inkretin hormonu, glikoza bağımlı insülinotropik polipeptit (GIP) ve glukagon benzeri peptit 1'dir (GLP-1) (91). İncretin hormonlarının bir oral glikoz yüklemesine karşı insülin yanıtına % 70'den fazla katkıda bulunduğu tahmin edilmektedir (92). Tip-2 diyabette inkretin etkisi, GLP-1'in bozulmuş salınımı ve GIP'nin kusurlu etkisinin bir kombinasyonu nedeniyle azalmaktadır (93).

GIP, ağırlıklı olarak duodenumda bulunan K hücreleri tarafından üretilen 42 amino asitli bir peptittir. GIP, yemek yedikten sonra dolaşıma salınır; yağ ve karbonhidratlar baskın uyarıcılar gibi görünürken, protein daha az önemli görünmektedir. GLP-1 ise, ağırlıklı olarak ince bağırsağın alt kısmında lokalize olan L hücreleri tarafından üretilir. GLP-1 yemek yedikten dakikalar sonra dolaşıma salınır. Yağ, karbonhidratlar ve protein, GLP-1 salgılanmasının güçlü uyarıcıları gibi görünmektedir (94, 95). Hem GIP hem de GLP-1 serbest bırakıldıktan sonra hızla etkisiz hale gelir. İnaktivasyona, N-terminal dipeptit ucunun çıkarılmasıyla peptitlerin kesilmesi neden olmaktadır. Bu işlem, dipeptidil peptidaz 4 (DPP4) enzimi tarafından yürütülür (96).

Hem GIP hem de GLP-1, inkretin etkisinin ana temeli olan, glikoza bağımlı bir şekilde insülin salgılanmasını uyarır (91, 93). Hormonların sinyalizasyonu, G-proteine bağlı GIP ve GLP-1 reseptörlerinin aktivasyonu yoluyla gerçekleştirilir. Inkretin hormonlarının insülinotropik etkisinin altında yatan moleküler mekanizma karmaşıktır. Protein kinaz A'nın aktivasyonu ile cAMP'de bir artışı içerir, ancak protein kinaz A'dan bağımsız mekanizmalar da mevcuttur (91, 93, 97).

İnkretin hormonları ayrıca glukagon salgılanmasını da etkiler. GIP'nin glukagon sekresyonunu uyardığı, GLP-1 ise glukagon sekresyonunu inhibe ettiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (98, 99).

İnkretin hormonlarının ekstrapankreatik etkileri de vardır. Her iki inkretin de mide boşalmasını engeller. GIP, lipogenezi indükler ve GLP-1, merkezi bir hareket yoluyla tokluğu indükler (93). GLP-1 ayrıca portal GLP-1 reseptörleri aracılığıyla hepatik vagal afferentleri aktive eder (100). Son olarak, GLP-1 miyokardiyal ve endotel fonksiyonunu iyileştirir (101, 102). Dolayısıyla GLP-1, diyabet tedavisinde tamamı potansiyel değere sahip olan çok sayıda eylemden sorumludur. Bu nedenle hormon, diyabet tedavisi için önemli bir strateji olarak öne çıkmaktadır.



Şekil 2.5. GLP-1RA'ların ve DPP4 inhibitörlerinin Etki Mekanizması (103)

Tip-2 diyabet için yeni bir terapi olarak GLP-1'in geliştirilmesinde, GLP-1'in DPP-4 tarafından hızlı bir şekilde etkisiz hale getirilmesi, önemli bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır, çünkü peptidin kesik formu büyük ölçüde etkisizdir. Bu sorunun üstesinden gelmek için iki strateji araştırılmış ve başarılı oldukları yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu stratejilerden biri, DPP-4'e dirençli olan GLP-1 reseptör agonistlerinin (GLP-1 mimetikleri) geliştirilmesidir; bu yaklaşımın önemli bir temsilcisi eksenatiddir (Byetta^R) (104). Diğer yaklaşım ise, GLP-1 inaktivasyonunu önleyen ve böylece inkretin hormonunun etkisini artıran ve uzatan DPP4 enzimini inhibe etmektir. Bu yaklaşımlar üzerine yapılan incelemeler, bu iki stratejinin önemini özetlemektedir (Şekil 2.5) (103, 105-109).

GLP-1, önemli bir diyabet tedavisi olarak çok ilgi uyandırmış olsa da, GIP için benzer bir rol araştırılmış ve hayal kırıklığı yarattığı bulunmuştur. Bunun başlıca nedeni, GIP'in insülinotropik etkisinin tip-2'de bozulduğu bulgusudur. Diyabette GIP, glukagon salgılanmasını engellemek yerine uyarmaktadır (110).

2.5.1. DPP4

DPP4 (DPP-4, DPP-IV, CD26, EC 3.4.14.5 olarak da adlandırılır) birkaç organda ifade edilir ve ayrıca dolaşımda bulunur (111, 112). DPP4'ün ana işlevi, 2. amino asitten sonra oligopeptitleri, 2. amino asit alanin (GLP-1'deki gibi) veya prolin ise tercihli bir yöntemle N-terminal ucundan ayırmaktır (111). DPP4'ün bu kısaltma etkisi hızlı ve etkilidir; Açlık koşulları altında dolaşımdaki toplam GLP-1'in yalnızca% 40'ı (ve yemek yenmesinden sonra % 60'ı) aktif GLP-1'dir ve aktif GLP-1'in yarılanma ömrü 2 dakikadan azdır (96). DPP4'ün inhibisyonu, bu yarı ömrü büyük ölçüde uzatır ve toplam dolaşımdaki GLP-1 havuzundaki aktif GLP-1 oranını artırır (111).

İnkretin hormonlarının yanı sıra, bir dizi başka biyoaktif peptid, DPP4 için potansiyel substratlardır. Örneğin nöropeptid Y, peptid YY, gastrin salgılayan polipeptid, hipofiz adenilat-siklaz aktive edici polipeptid, insülin benzeri büyüme faktörü-1, P maddesi ve çeşitli kemokinler DPP4 tarafından metabolize edilebilir (111). Bu, DPP4'ün sadece glukoz homeostazında değil, aynı zamanda kan basıncı, nörojenik iltihaplanma ve bağışıklık sistemi gibi diğer homeostatik mekanizmaların düzenlenmesinde de rol oynadığı anlamına gelebilir. Bununla birlikte, bu ve diğer biyoaktif peptitlerin fizyolojik koşullar altında DPP4 için substratlar olup olmadığı henüz belirlenmemiştir (112).

Biyoaktif peptitleri kesmeye yönelik enzim etkisinin yanı sıra, DPP4 ayrıca sinyalleri hücre dışı yollardan hücre içi yollara iletmek için bir reseptör görevi görebilir. Ayrıntılı olarak incelenmemiş olan DPP4'ün bu potansiyel işlevi, DPP4 inhibitörlerinden etkilenmiş görünmemektedir (112).

2.5.1.1. DPP4 inhibisyonu

DPP4 kesildiği ve dolayısıyla GLP-1'i inaktive ettiği için, glikoz homeostazının düzenlenmesinde rol oynar. Bu durum, DPP4'ün genetik olarak tanımlanmasına sahip farelerin, artırılmış insülin sekresyonu ile birlikte, oral glukoz uygulamasını takiben artmış glukoz toleransına sahip olduğu bulgularıyla açıkça gösterilmektedir (113). GLP-1'in potansiyel antidiyabetik etkisi nedeniyle, 1990'larda DPP4 inhibisyonunun diyabet tedavisi için bir hedef olabileceği öne sürülmüştür (114). Bu önerinin gerekçesi, DPP4 inhibitörü valin pirrolidin aktif GLP-1 konsantrasyonunu arttırdığını, insülin sekresyonunu arttırdığını ve glikoz toleransını iyileştirdiğini gösteren hayvan çalışmaları ile doğrulanmıştır (115, 116). İnsanlarda, DPP-4 inhibisyonunun aktif GLP-1'in tokluğa bağlı (prandial) seviyelerini 5–6 pmol/L'den, 15–20 pmol/L'ye yaklaşık üç kat arttırdığı gösterilmiştir (117).

2.5.2. DPP4 inhibitörleri

Sitagliptin (MK-0431, Januvia^R, Merck) ve Vildagliptin (LAF237, Galvus^R, Novartis) en ayrıntılı şekilde olmak üzere, birkaç farklı DPP4 inhibitörü geliştirilmiştir. Her ikisi de yavaş, sıkı bağlanma inhibisyon kinetiği gösterir ve enzimin hem rekabetçi hem de geri dönüşümlü inhibitörleridir (118, 119). Hem vildagliptin hem de sitagliptin oral olarak aktiftir ve hızla emilir; C_{max} (dolaşım sistemindeki en yüksek ilaç konsantrasyonu) 1–2 saat içinde gözlenir ve biyoyararlanım, oral alımdan sonra % 80'i geçer (120, 121). Karaciğer yetmezliği bileşiklerin farmakokinetiğini değiştirmiyor gibi görünmektedir, ancak böbrek yetmezliği dolaşımdaki sitagliptin seviyelerini arttırmaktadır. Bu nedenle FDA, sitagliptin tedavisine başlamadan önce böbrek fonksiyonunun değerlendirilmesini ve orta (kreatinin temizlemesi <50 mL/dakika) veya şiddetli (kreatinin temizlemesi <30 mL/dakika) böbrek yetmezliği olan hastalarda, sitagliptin dozunun 50 ve 25 mg'a düşürülmesini önermektedir. Dahası FDA, Novartis'ten böbrek yetmezliği olan hastalarda

vildagliptinin güvenliğini göstermek için ek bir çalışma yapmasını istemiştir. DPP4 inhibitörleri ve diğer ilaçlar için hiçbir ilaç etkileşimi gözlenmemiştir (122).

Sitagliptin ve vildagliptin, plazma DPP4 aktivitesini etkili bir şekilde inhibe eder. Yapılan farklı çalışmalarda sitagliptin veya vildagliptin uygulamasından sonra dolaşımdaki DPP-4 aktivitesinin etkileri gösterilmiştir. Bu çalışmalarda, uygulamadan 30 dakika sonra DPP4 aktivitesi halihazırda neredeyse % 100 oranında inhibe edilmektedir ve % 80'den fazla inhibisyon 16 saatten fazla sürmektedir. DPP4 aktivitesini tespit veya tahmin etmek için farklı yöntemlerin farklı çalışmalarda kullanıldığı ve bu nedenle sayıların karşılaştırılabilir olmadığı belirlenmelidir. Her durumda çalışmalar, günde bir kez uygulama ile belirgin DPP4 inhibisyonuna ulaşmanın mümkün olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, her iki bileşik de oral glikoz ile karışık bir yemekle birlikte verildiğinde tokluğa bağlı aktif GLP-1 konsantrasyonlarını artırır (117, 123).

2.5.2.1. DPP4 inhibitörleri ile gerçekleştirilen hayvan çalışmaları

Klinik öncesi çalışmalar, vildagliptinin insüline dirençli Zucker yağlı ve yüksek yağlı beslenen fareler, obez fareler ve yüksek yağla beslenen insüline dirençli C57BL/6J fareler gibi, bir dizi diyabet ve glukoz intoleranslı hayvan modelinde, glukoz toleransını iyileştirdiğini göstermiştir (124, 125). Benzer olarak sitagliptin, farelerde kombine yüksek yağlı diyet (HFD) ve streptozotosin modelinde glisemiye iyileştirdiği gösterilmiştir (126).

Sitagliptin ile tedavi edilen sıçanlarda, glukoz ve insülin düzeylerinde önemli bir azalmanın yanı sıra, çalışma ve referans belleklerinin önemli ölçüde iyileştiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (127).

Vildagliptin ile yapılan bir çalışmada ise, HFD ile beslenen sıçanlarda periferik insülin duyarlılığının önemli ölçüde iyileştiği, beyin insülin duyarlılığını geri kazanıldığı ve beyin mitokondriyal reaktif oksijen türlerinin üretiminin azaldığı gösterilmiştir. Bununla birlikte vildagliptinin, HFD ile beslenen sıçanlarda hipokampal sinaptik plastisiteyi ve bilişsel işlevi geri getiremediği ortaya konmuştur (128).

2.6. Egzersiz

Obezite, bireysel ve çevresel faktörlerin karmaşık bir etkileşiminin sonucu olarak kabul edilir; bu nedenle, yönetimi kapsamlı bir yaklaşım gerektirir. Egzersiz, kilo kaybına ek olarak genel sağlıkta iyileştirmeler ve komorbid hastalık riskinde azalmayı içeren bu yaklaşımın önemli bir bileşenidir (129).

En basit tanımı ile enerji harcamak için vücudun hareket etmesi fiziksel aktivite olarak tanımlanmaktadır. Fiziksel aktivite günlük yaşam içerisinde kas ve eklemlerimizi kullanarak enerji tüketimi ile gerçekleşen, kalp ve solunum hızını arttıran ve farklı şiddetlerde yorgunlukla sonuçlanan aktiviteler şekliyle tanımlanır. Örneğin, yüzmeye, koşma, sıçrama, bisiklete binme, çömelme kalkma, kol ve bacak hareketleri, baş ve gövde hareketleri gibi temel vücut hareketlerinin tümünü ya da bir kısmını içeren spor dalları, dans, egzersiz, oyun ve gün içerisindeki aktiviteler fiziksel aktivite olarak kabul edilirler. Egzersiz ise düzenli olarak yapılan fiziksel aktivitedir. Egzersiz düzenli ve tekrarlı vücut hareketlerini içerir. Kronik fiziksel aktivite beyin sağlığını geliştirir. İnsanlar arasında düzenli egzersizin depresyona, uyku kalitesine ve ileri yetişkinlerde bilişsel fonksiyonlara yararı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (8).

Egzersiz kronik hastalıkları iyileştirmekte, fonksiyonel sınırlamaları azaltmakta ve bilişsel hasarı ertelemektedir. Ayrıca egzersiz obeziteyi azaltarak dolaylı yoldan ya da bilişsel fonksiyonu etkileyerek doğrudan bilişsel yaşlanmayı da iyileştirmektedir. Orta yoğunluktaki egzersizin (1 sa/gün) bir dizi sosyal, fiziksel ve bilişsel yararı var iken ileri yetişkin yaştaki obez bireylerde kilo alımının engellenmesinde etkilidir. Egzersiz yağ kütlesinin artmasının engellenmesine ve yağsız (kas) kütleyi korumaya ve hatta arttırmaya yardım etmektedir (130).

2.7. Hipokampus

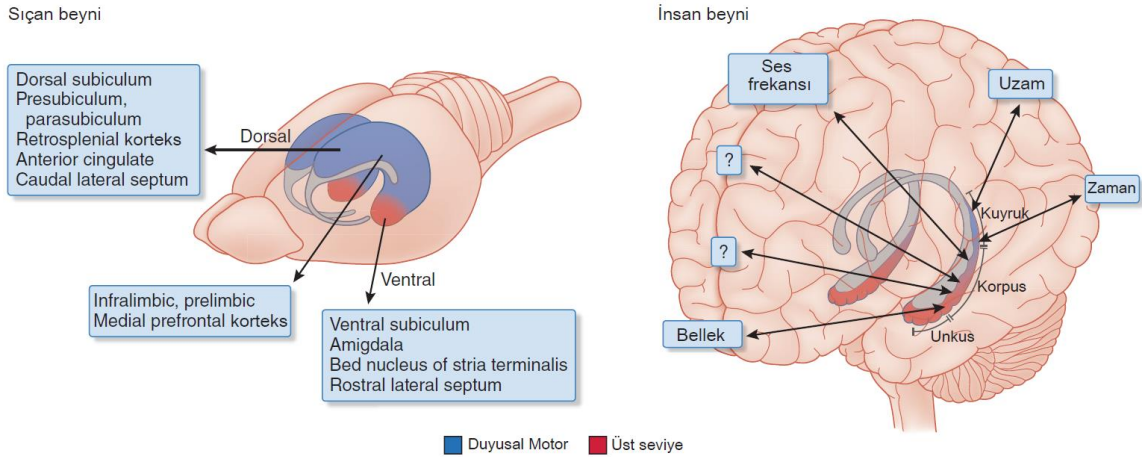
Hipokampus, uzamsal ve uzamsal olmayan bellekte yer alan, insanların ve diğer omurgalıların beyninin kritik bir bileşenidir (131-134). Uzunlamasına eksen boyunca, hipokampus fonksiyonel olarak dorsal, orta ve ventral bölümlere ayrılabilir (135, 136). Ayrıca enine eksen boyunca CA1, CA3 ve dentat girus (DG) olarak dört kısma bölünebilir. Hipokampus içinde, DG'nin giriş düğümünden CA3'e ve son olarak CA1 çıkış düğümüne doğru olan bir trisinaptik döngü vardır (137, 138).

CA1, hipokampusun ana çıktısını oluşturur. Klasik izleme yöntemleriyle, dorsal CA1'in (dCA1) subikulum ve entorinal kortekse çıkıntı yaptığı, ventral CA1'in (vCA1) medial prefrontal korteksi (mPFC), nukleus akümbensi (NAc) ve amigdalayı hedeflediği tespit edilmiştir (139-142).

Ventral hipokampus, farklı hedef alanları aracılığıyla duygusal ve motive edilmiş davranışlardan sorumludur. Ventral hipokampusun geniş alanları ve düşük uzamsal seçiciliği nedeniyle uzamsal bellek üzerinde zayıf etkilere sahip olduğu varsayılmıştı. Ancak Yang ve ark. yakın zamanda, BLP-vCA1 monosinaptik uyarıcı devresinin uyarılmasının uzamsal belleği geliştirirken, bu devreyi inhibe etmenin, sıçanlarda ve farelerde uzamsal belleği bozduğunu bulmuşlardır (143). vCA1'in uzamsal bellekteki rolü, doğrudan vCA1-prefrontal girdilerin uzamsal çalışma belleğindeki uzamsal işaretleri kodladığına dair kanıtla da desteklenmektedir. Bu nedenle, nöronların işlevsel çeşitliliği, vCA1'e çok çeşitli davranışsal fenotipler kazandırır (144).

Ventral bölümden farklı olarak, dCA1 öncelikle uzamsal navigasyon ve epizodik hafıza ile ilişkilidir (145). Farelerde, dCA1'e verilen zararların uzamsal bilişi etkilediği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (146).

İnsan ve sıçan beyinlerindeki hipokampuslarda homoloji gösteren birçok bölge bulunmaktadır. Kemirgen hipokampusun ventral kadranı primatlarda, yüksek dereceli neokorteksin gittikçe artan payına ayak uydurmak için orantısız bir şekilde genişleyerek, unkusu ve gövdeyi oluşturmuştur. Primat hipokampusünün nispeten küçük kuyruk kısmı yalnızca görsel-uzamsal alanlarla iletişim kurmaktadır. Bu kuyruk, kemirgen hipokampusun dorsal-orta bölgesi ile homolog olan kısımdır. Kemirgen beynindeki çoğu kayıt ve manipülasyon dorsal hipokampusta yapılmıştır (Şekil 2.) (147).



Şekil 2.6. İnsan ve sıçan beyinlerindeki homolog hipokampus bölgeleri (147)

2.8. Öğrenme ve Bellek Türleri

Öğrenme, sonraki davranışları değiştiren süreçtir, bellek ise geçmiş deneyimleri hatırlama yeteneğidir. Biliş ise bellek, çağrışım, dil, dikkat, kavram oluşturma ve problem çözme gibi süreçlere uygulanan geniş bir terim olarak tanımlanmaktadır (148).

Bellek, kısa süreli (çalışma belleği) ve uzun süreli belleğe sınıflandırılabilir. Kısa süreli belleğin sınırlı bir kapasitesi vardır ve yalnızca birkaç saniye ile bir dakika arasında sürer. Aksine, uzun süreli bellek, potansiyel olarak sınırsız bir süre için daha büyük miktarlarda bilgi depolayabilir. Bilim insanları uzun süreli belleği bildirimsel (açık) veya bildirimsel olmayan (örtük) belleğe ayırmışlardır (149). Bildirimsel bellek "ne" sorusuna cevap verir ve yerler, nesneler ve insanlar gibi gerçeklerin bilgisini ve bu gerçeklerin anlamını içerir. Bildirimsel bellek ayrıca, öğrenildikleri bağlamdan bağımsız olarak alınan bu gerçeklerin bilgisini içeren, zaman, yer ve anlamsal bellek gibi belirli bir bağlama özgü kişisel olarak deneyimlenen olay olan epizodik belleğe bölünmüştür (150, 151). Bildirimsel bellekte yer alan ana beyin yapısı, diğer medial temporal lob yapıları ile birlikte hipokampüstür (152). Yeni bir bildirimsel belleğin oluşturulması, yeni bilgi edinmeyi (kodlama), bilgiyi tutmayı (depolama) ve geri getirmeyi (geri getirmeyi) içeren sıralı bir süreçtir. Bildirimsel olmayan veya örtük bellek ise "nasıl" sorusuna yanıt verir. Motor becerilerin ve alışkanlıkların kazanılmasıdır ve neostriatum ve serebellum

tarafından aracılık edilir (153-155). Ek olarak, amigdala duygusal hafızaya aracılık eder ve hafızanın pekiştirilmesinde rol oynadığı gösterilmiştir (156).

Belirli bir zamansal ve uzamsal bağlamda hatırlama yeteneğine bağlı olan bir tür bildirimsel bellek türü olan olaysal bellek, özellikle normal yaşlanmaya karşı savunmasızdır. Yaşlı insanlar, olayların kendisinden ziyade bir olaysal olay ile ilgili bağlamı unutmaya daha yatkındır (151, 157). Yaşlıların, bir uyarıyı tekrar etmelerini veya tanımlarını gerektiren örtük bellek görevlerinde olduğu gibi, daha az çaba gerektiren bellek görevlerinde yeterince performans gösterdikleri gösterilmiştir (158-161). Ancak, akıllarında tuttıkları bilgileri hatırlamaları veya geri getirmeleri veya bazı eylemleri hatırlatıcı olmadan gerçekleştirmeleri gerektiğinde performansları azalır (161-163).

Tipik olarak, uzamsal bellek, bilgiyi uzamsal-zamansal çerçeve içinde depoladığı için, epizodik belleğin bir alt türü olarak tanımlanır. 1978'de ortaya atılmış olan bilişsel harita teorisi, uzamsal belleğin hipokampusu bağlı olduğunu öne sürmüştür (164). Durumun böyle olduğunu gösteren iki dizi kanıt vardı. İlki, 1950'lerin sonlarında bildiren amnezik bir vakaydı. Bu kişi, medial temporal lob cerrahi olarak çıkarıldıktan sonra yeni anılar edinmede ciddi bir bozukluk yaşadı (165). Diğer kanıt ise yer hücrelerinin keşfiydi. "Yer hücreleri, herhangi bir uyarıcıdan veya devam eden davranıştan bağımsız olarak hayvanın ortamdaki konumuna bağlı olan nöronlardır". Son zamanlarda, bilişsel haritalama kavramı, zihinsel görüntülerin inşasında hipokampusun rolünü tanımlamak için bir adım daha ileri götürüldü (166, 167).

Geçtiğimiz on yıllar boyunca, hipokampusün öğrenme ve hafıza için olduğu kadar yaşa bağlı bilişsel eksiklikler için de kritik olduğunu gösteren güçlü kanıtlar ortaya konmuştur (168-175). Hipokampal hasarı olan insan denekler üzerinde yapılan çalışmalar, bu beyin bölgesinin uzamsal bellekte kritik bir rol oynadığına dair önemli veriler sunmuştur (176-181). Ayrıca, hipokampal lezyonlar veya hipokampusta yaşla ilişkili değişiklikler, sıçanlar ve maymunlar gibi insan olmayan denekler üzerinde yapılan çalışmalar, uzamsal bellek performanslarında öğrenme bozukluğunu göstermektedir (182-184).

Bilişsel işlevi iyileştirmek için çeşitli takviyelerin etkisini ortaya koymak amacıyla yapılmış olan çok sayıda insan çalışması bulunmaktadır. Kafein, galantamin, memantin, donezepil, pirasetam ve rolipram ile sınırlı olmayan dahil çok sayıda takviye ve ilaçların biliş ve bellek gibi zihinsel işlevleri geliştirdiği ortaya konmuştur (185-191). Benzer

şekilde, bilim insanları hafıza kaybını önlemek veya tersine çevirmek için yollar bulma umuduyla, potansiyel mekanizmalar hakkında fikir edinmek ve beyin yaşlanmasının patofizyolojisini anlamak için deney hayvanlarını kullanmaktadırlar (192-198).

Uzamsal çalışma belleğinin aksine, uzamsal referans belleği daha fazla kapasiteye sahiptir, daha uzun sürer ve etkenlere direnir (199). Kemirgenler üzerinde gerçekleştirilen ilk davranış ve öğrenme deneylerinden bu yana, hipokampal temelli uzamsal öğrenme ve hafızanın değerlendirilmesi, kemirgenlere özgü çeşitli davranışsal uygulamalar tarafından değerlendirilmiştir. Bu davranışsal bellek uygulamalarının çoğu, sıçanlar için tasarlanmış ve oluşturulmuştur (200-204).

Son yıllarda DPP4 inhibitörleri ile kemirgenler üzerinde yapılan çalışmalarla da, bu ilaçların bellek ve bilişsel performansa olan etkileri ortaya konmaktadır (7, 128).

Sinaptik plastisite, sinapsların yapısını veya biyokimyasını ve post-sinaptik etkilerini değiştiren değişikliklerin yanı sıra, öğrenme ve hafızanın altında yatan hücresel mekanizma olarak kabul edilmektedir. 1940'ın sonlarında, Donald Hebb, kalıcı bellek izlerinin, sinir ağlarının sürekli aktivasyonu ile ortaya konulabileceğini öne sürmüştür (205). Otuz yıl sonra Bliss ve arkadaşları, yüksek frekanslı uyarıma yanıt olarak tavşan dentat girusundaki sinaptik güçte uzun süreli bir artış gözlemlemişlerdir (206). Bu sinaptik güçlendirme, sonunda uzun dönem kuvvetlendirme olarak bilinmeye başlamış ve en kapsamlı olarak hipokampüste çalışılmıştır (207). Uzun dönem kuvvetlendirme, bellek oluşumunun moleküler mekanizması için gerekli olduğu düşünülen özelliklerin çoğunu sergilemektedir (208-210).

LTP, yapay serebrospinal sıvı banyosunda canlı tutulan ince kesilmiş hipokampal dilimlerde kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Hipokampustaki üç ana anatomik yolağın herhangi birinde (perforant yolak, yosunlu lif yolağı veya Schaffer kollateral yolak) kısa, yüksek frekanslı bir eylem potansiyeli dizisi uzun dönem kuvvetlendirme üretir (211). Schaffer kollateral yolağı, presinaptik CA3 nöronları ve CA1 postsinaptik hedef hücreler arasında yer alır ve hipokampusta incelenmiş olan en iyi sinaptik yolaktır. Bu yolaktaki hipokampal lezyonlar LTP'yi bozmakta ve bellek bozukluklarına yol açmaktadır (212).

Uzamsal bellek ve sinaptik plastisite arasındaki güçlü bağlantı, konu üzerine yapılan derlemelerle kapsamlı bir şekilde gözden geçirilmiştir (213). Dahası, öğrenmenin hipokampusta LTP benzeri süreçleri tetiklediğine dair deneysel kanıtlar da bulunmaktadır (214, 215). Labirentlerdeki ve su tanklarındaki performans gibi, LTP de hipokampusun

bir özelliğidir. Yapılan çalışmalarda, belirli bir yaş grubundaki daha dayanıklı LTP'ye sahip hayvanların, en iyi uzamsal öğrenmeyi gösterme eğiliminde oldukları ve hipokampal sinapslarda, LTP ve uzamsal öğrenmenin benzer mekanik süreçlere bağlı olabileceği hipotezine destek sağladıkları gösterilmiştir (216).

2.9. Morris Su Tankı

Morris su tankı (MWM) 1984 yılında Richard Morris tarafından icat edilen, deney hayvanları üzerindeki öğrenme testlerinde ve bilişsel fonksiyonların değerlendirilmesinde kullanılan en yaygın yöntemdir (212). Test, mekansal veya yer öğrenimini değerlendirmek için bir yöntem olarak tasarlanmıştır. Güncel durumda MWM'nin yaygın kullanılmasına, testin birçok özelliği katkıda bulunmuştur. Bunlar arasında; gerekli ön eğitimin olmaması, çok çeşitli tank konfigürasyonları, test prosedürlerinde yüksek güvenilirliği ve farklı kemirgen türlerine uyarlanabilir olması, yaygınlığının kapsamlı kanıtları olarak sayılabilir (217).

MWM'nin öğrenme ve belleği değerlendirmede kullanımı, nörotransmitter sistemleri ve ilaç etkileri arasındaki ilişkileri gözden geçirmede de önemli katkılar sağlamaktadır. MWM performansı, LTP ve NMDA reseptör işlevi ile ilişkilendirilmiştir ve bu özelliği metodu, hipokampal devrelerin araştırılmasında anahtar bir teknik haline getirmektedir (217). MWM'in hipokampusta meydana gelen hasarın değerlendirilmesinde oldukça hassas olduğu gösterilmiştir (212).

HFD'e maruz kalmanın bilişsel performans üzerindeki etkilerini değerlendiren çalışmalarda, MWM açık ara en sık kullanılanıdır. Bugüne kadar yayınlanan kemirgenler üzerindeki çok sayıda çalışmanın ezici çoğunluğu, HFD ile beslenmenin MWM'de hipokampal bağımlı performansı bozduğunu ortaya koymuştur (218).

Tankın yer aldığı iç mekan, mümkün olduğunca özelliksiz olacak şekilde hazırlanmaktadır. Tank, platform ve opaklaştırıcı malzemeler (tempera boyası, polipropilen peletler, süt, beyaz veya siyah boyalar) eklenmesiyle opak hale getirilmiş su ile dolu yuvarlak bir havuz içermektedir. Fareler için havuzun boyutu 75-150 cm çapında olabilir. Sıçanlarda ise bu ölçüler 150-180 cm çapında olabilmektedir (212, 217).

Hayvan, suyun altına gizlenmiş platformu dört farklı başlangıç noktasından bulmayı öğrenir. Bir dizi denemeden sonra hayvanlar, gizli platformun yerini uzak ipuçlarına göre

öğrenir ve zamanla hayvanın platformu bulma gecikmesinin azalması beklenir. Öğrenme ve bellek performansı daha sonra, gizli platformun kaldırıldığı ve eski platform bölgesinde harcanan sürenin ölçüldüğü probe deneme adı da verilen bir araştırma denemesi ile test edilir. Bu test ile elde edilen çeşitli parametreler arasında platformu bulmak için gecikme süresi, yüzme yolu uzunluğu, yüzme hızı, her çeyrekte harcanan süre, platform geçişlerinin sayısı ve başarısız denemelerin yüzdesi yer almaktadır. MWM performansını ayrıca, günlük deneme sayısı, eğitim günleri sayısı, her denemenin süresi ve denemeler arası aralığı gibi etkileyebilecek diğer faktörlerin de etkileyebildiği gösterilmiştir. MWM, referans belleğinin, uzamsal çalışma belleğinin ve öğrenmenin doğru ve de tekrarlanabilir şekilde çalışılmasına imkan tanır (212).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında yer alan tüm hayvan deneyleri Gaziantep Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi (GAÜNDAM) laboratuvarlarında yapılmıştır. Çalışmanın moleküler genetik analizleri ise Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı araştırma laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada gerçekleştirilen tüm işlemler, Gaziantep Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (HADYEK) 24.04.2019 tarihli, 94 protokol ve 2019/15 numaralı etik kurul kararlarıyla uygun bulunmuştur (Ek 1).

3.1. Gereç

3.1.1. Çalışmada kullanılan deney hayvanları

Bu çalışmanın hayvan deneyleri kısmında 42 adet yetişkin, çalışma başlangıcında 180-220 gr ağırlığında olan, erkek Wistar albino sıçan GAÜNDAM'dan temin edilmiştir.

3.1.2. Çalışmada kullanılan kimyasal ve çözeltiler

Hayvanların beslenme ve bakımlarında;

- Standart sıçan yemi (Akın Yem, Türkiye)
- Yüksek yağlı sıçan yemi (Arden, Türkiye)

Hayvanların tedavi protokollerinde;

- Sitagliptin (MSD, ABD)
- Serum fizyolojik (%0.9 NaCl)

Hayvanların genel anestezisinde;

- Ksilazin (Bioveta, Çekya)
- Ketamin (Richter Pharma AG, Avusturya)

Dokuların saklanması;

- RNA Save (Biological Industries, İsrail)

RNA izolasyonunda;

- RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Almanya)

- Kloform (Sigma-Aldrich, ABD)

cDNA eldesinde;

- Reverse Transcription Kit (Fluidigm, ABD)

Real-Time PCR aşamasında;

- Syp TaqMan™ Primer Assay (Thermo Scientific, ABD)
- Gapdh TaqMan™ Primer Assay (Thermo Scientific, ABD)
- DNA Suspension Buffer, pH 8.0 (Teknova, ABD)
- Preamp Master Mix (Fluidigm, ABD)
- 2X Assay Loading Reagent (Fluidigm, ABD)
- Taqman GE Master Mix (Thermo Scientific, ABD)
- 20X DNA Binding Dye SLR (Fluidigm, ABD)
- Eva Green (Biotium, ABD)

Doku homojenizasyonu ve protein izolasyonunda;

- 10X RIPA Buffer (Cell Signaling Technology, ABD)
- PMSF (Cell Signaling Technology, ABD)
- Phosphatase Inhibitor Cocktail II (Bio Basic, Kanada)

Proteinlerin hazırlanması, jele yüklenmesi ve elektroforezinde;

- Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, ABD)
- 2x Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad, ABD)
- 10% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Jel (Bio-Rad, ABD)
- 10X Tris-Glycine SDS Running Buffer (Cell Signaling Technology, ABD)
- Color-coded Prestained protein marker (Cell Signaling Technology, ABD)

Proteinlerin membrana transferinde;

- PVDF membran (Thermo Scientific, ABD)
- Metanol (Sigma-Aldrich, ABD)
- 10X Tris-Glycine Transfer Buffer (Cell Signaling Technology, ABD)

Membranın bloklanmasında;

- %5'lik yağsız süt tozu (Cell Signaling Technology, ABD)

- 10X Tris Buffered Saline (TBS) (Cell Signaling Technology, ABD)
- TWEEN® 20 (Sigma-Aldrich, ABD)
- 1X TBST çözeltisi

Antikorlar ile işaretlemelemlerde;

- Birincil antikor Sinaptofizin (Cell Signaling Technology, ABD)
- Birincil antikor β -Tubulin (Cell Signaling Technology, ABD)
- İkincil antikor IgG, HRP-linked (Cell Signaling Technology, ABD)
- 1X TBST çözeltisi

Görüntüleme aşamasında;

- SignalFire™ ECL kemilüminesans kiti (Cell Signaling Technology, ABD)

3.1.3. Çalışmada kullanılan cihazlar

Hayvanların ağırlık ve kan glikoz ölçümlerinde;

- Hassas Terazi (Hanna, İtalya)
- Kan şekeri ölçüm cihazı (IME-DC, Almanya)

Öğrenme deneylerinde;

- Termal kamera (Axis Communications, İsveç)

Dokuların saklanması;

- -80 °C dondurucu (Hettich, Almanya)

RNA ve protein izolasyonlarında;

- Tissue Lyser LT homojenizatör (Qiagen, Almanya)
- Mikrosantrifüj (Eppendorf, Almanya)
- Soğutmalı mikrosantrifüj (Eppendorf, Almanya)

RNA ve proteinlerin miktar tayininde;

- Nanodrop spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD)
- Multiskan GO spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD)

cDNA eldesinde;

- Thermal Cyclers cihazı (Bioer, Zhejiang, Çin)

Real-Time PCR aşamasında;

- Thermal Cyclers cihazı (Bioer, Zhejiang, Çin)
- Plate karıştırıcı (Scientific Industries, ABD)
- Plate Santrijüj (Labnet, ABD)
- IFC Controller HX cihazı (Fluidigm, ABD)
- Biomark yüksek kapasiteli RT-PCR cihazı (Fluidigm, ABD)

Proteinlerin hazırlanması, jele yüklenmesi ve elektroforezinde;

- Thermal Cyclers cihazı (SensoQuest, Almanya)
- Mini PROTEAN® Tetra Cell elektroforez tankı (Bio-Rad, ABD)
- Elektroforez güç kaynağı (Bio-Rad, ABD)

Proteinlerin membrana transferinde;

- Mini PROTEAN® Tetra Cell elektroforez tankı (Bio-Rad, ABD)
- Elektroforez güç kaynağı (Bio-Rad, ABD)

Membranın bloklanması;

- Orbital çalkalayıcı (ISOLAB, Almanya)

Antikorlar ile işaretlemelerde;

- Orbital çalkalayıcı (Stuart, İngiltere)
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)

Görüntüleme aşamasında;

- Kemilüminesans görüntüleme cihazı (Vilber Lourmat, Fransa)

3.2. Yöntem

3.2.1. Hayvan Deneyleri

3.2.1.1. Hayvanların beslenme ve bakımları

Çalışmada yer alan 42 Wistar albino yetişkin erkek sıçan Gaziantep Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nden satın alınarak temin edildi. Ardından bu 42 adet erkek sıçan, 7 deney grubuna rastgele biçimde ayrılarak, power (güç) analizi sonucunda her deney grubuna eşit sayıda (n=6) olacak şekilde dağıtıldı.

Obez olması planlanan hayvan gruplarına çalışmanın başlangıcından itibaren başlanıp, 8 hafta süre ile kalorisinin % 60'ı yağ olan yüksek yağlı diyet (Tablo 3.1) ile beslenerek obezite oluşturuldu ve çalışmanın sonuna kadar yüksek yağlı diyet ile beslenmeye devam edildi. Kontrol grupları çalışmanın başlangıcından sonuna kadar standart sıçan yemi ile beslendi. Deney gruplarındaki tüm hayvanların haftalık ağırlık takipleri yapıldı. Sıçanlar 8 haftalık yüksek yağlı diyet sonunda Lee indeksine bağlı olarak obez kabul edildi. Bu indekse göre burun ucundan kuyruk sokumuna kadar olan mesafe boy uzunluğu olarak kabul edilerek, 0,3 değerinden yukarısı obez olarak kabul edildi. Tüm hayvanların günlük kan glikoz düzeyleri ölçülerek ve kaydedildi. Hayvanların haftalık olarak kuyruk venlerinden alınan bir damla kan ile şeker ölçüm cihazı ve stripleri (IME-DC, Bavyera, Almanya) kullanılarak kan glikoz düzeyleri ölçüldü. Bu şekilde kontrol grupları dışında tüm grupların obez olması sağlandı ve tüm çalışma süresince özel karışımli yem ile beslenmeye devam edildi. Deney hayvanları 21-23°C oda sıcaklığında ve 12 saat gece / 12 saat gündüz ışık sistemli, %40-50 nemde tutulan odalarda aynı bakım koşulları altında, çeşme suyu içirilerek, rahat hareket edebilecekleri büyüklükte, üzeri hava alabilecek durumda kapatılmış kafesler içerisinde altılı gruplar halinde konumlandırıldı. Bütün bu beslenme ve bakım işlemleri GAÜNDAM'da gerçekleştirildi.

Çalışmada kullanılan yüksek yağlı diyet, Research Diet diyetle indüklenmiş obezite (DIO) serisi, (D12331) formülü baz alınarak hazırlandı (Arden A.Ş., Ankara) (219) Özel karışım yüksek yağlı yemin içeriği tablo 3.1'de verildiği gibidir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan özel karışım yüksek yağlı yem içeriği

Hesaplanmış Değerler	% (Gr)
Kazein	228.00
DL-Methionine	2.00
Maltodekstrin	170.00
Sükroz	175.00
Soya yağı	25.00
Hindistan cevizi yağı	335.50
Mineral Karışımı (S10001)	40.00
SodyumBikarbonat	10.5
Potasyum Sitrat (H ₂ O'lu)	4.00
Vitamin Karışım (V10001)	10.00
Kolin	2.0
FD&C RedDye # 4	0.1
Toplam	1000.1

3.2.1.2. Çalışmada yer alan deney grupları

- 1. Kontrol grubu (K):** 16 hafta standart yem ile beslendi (220).
- 2. NaCl uygulanan kontrol grubu (K+NaCl):** 16 hafta standart yem ile beslendi (220). Daha sonra hayvanlara ikinci 8 hafta boyunca DPP4 inhibitörü çözücüsü olan NaCl gavaj yoluya verildi. % 0.9 NaCl, hayvanlara 1 ml olacak şekilde günde bir kere gavaj yoluyla uygulandı (221). Bu grubun uygulanma amacı; gavaj yoluyla verilecek olan DPP4 inhibitörü uygulanması esnasında, hayvanlar üzerinde gavajdan kaynaklı oluşabilecek ve öğrenme testi deneyleri sonuçlarını etkileyebilecek stres faktörünün, DPP4 inhibitörü çözücüsü olan NaCl'nin aynı oranda gavajla verilerek etkisini gözlemlemek ve kontrolünü sağlamaktır.
- 3. Obez grubu (Ob):** 16 hafta kalorisinin % 60'ı yağ içeren yüksek yağlı diyetle beslendi (219, 220)
- 4. Egzersiz uygulanan kontrol grubu (K+Eg):** 16 hafta standart yem ile beslendi ve obezite oluşturulduktan sonra hayvanlara çalışmanın 9. Haftasından itibaren, 8 hafta süren yüzme egzersizi uygulandı. Yüzme egzersizi, hayvanlara günlük 60 dakika olmak üzere haftanın her günü uygulandı (220, 222).

5. **Egzersiz uygulanan obez grubu (Ob+Eg):** 16 hafta kalorisinin % 60'ı yağ içeren yüksek yağlı diyetle beslendi. Obezite oluşturulmasının ardından, hayvanlara 8 hafta süren yüzme egzersizi uygulandı. Yüzme egzersizi, hayvanlara günlük 60 dakika olmak üzere haftanın her günü uygulandı (219, 220, 222).
6. **DPP4 İnhibitörü uygulanan kontrol grubu (K+DPP4i):** 16 hafta standart yem ile beslendi. Daha sonra hayvanlara ikinci 8 hafta boyunca DPP4 inhibitörü olarak sitagliptin verildi. Sitagliptin, hayvanlara 50 mg/kg olacak şekilde günde bir defa gavaj yoluyla uygulandı (221).
7. **DPP4 İnhibitörü uygulanan obez grubu (Ob+DPP4i):** 16 hafta kalorisinin % 60'ı yağ içeren yüksek yağlı diyet ile beslendi. Obezite oluşturulduktan sonra hayvanlara 8 hafta boyunca sitagliptin verildi. Sitagliptin, hayvanlara 50 mg/kg olacak şekilde günde bir kere gavaj yoluyla uygulandı (221).

3.2.1.3. DPP4 inhibitörü uygulaması

DPP4 inhibitörü uygulaması içeren gruplara çalışmanın ikinci 8 haftası boyunca sitagliptin fosfat monohidrat verildi. Sitagliptin, hayvanlara 50 mg/kg olacak şekilde günde bir kere gavaj yoluyla uygulandı (221).

3.2.1.4. Yüzme egzersizi

Egzersiz içeren gruplara (K+Eg, Ob+Eg), çalışmanın dokuzuncu haftasının başında başlanarak çalışmanın biteceği on altıncı haftanın sonuna kadar, toplam 8 hafta yüzme egzersizi uygulandı. Yüzme egzersizi, hayvanlara günlük 60 dakika olmak üzere haftanın her günü uygulandı (220, 222).

3.2.1.5. Öğrenme deneyleri

Bütün gruplardaki hayvanlara, tüm hayvan deneylerinin tamamlandığı on altıncı haftanın sonunda Morris su tankı kullanarak, yer öğrenme (gizli platform) protokolü uygulanarak, uzamsal referans bellek testi uygulandı. Öğrenme testi toplam 6 gün boyunca sürdü. İlk 5 gün öğrenme denemeleri, 6. gün ise belleği test eden probe denemeler gerçekleştirildi. Öğrenme denemeleri günde 4 deneme olarak uygulandı. Öğrenme denemelerine başlamadan önce stresi en aza indirmek adına, her hayvana 3 gün, günde bir defa, 1 dakika yüzme alıştırmaları uygulandı. Öğrenme testlerinin uygulandığı günlerde, Morris

su tankı, oda sıcaklığında su ile dolduruldu. Tank rastgele 4 kadrana bölünerek, platform bu kadranlardan herhangi biri seçilerek, bunlardan birinin merkezine su seviyesinin 1-2 cm altında kalacak biçimde yerleştirildi. Kullanılan platformun, su tankının çeperleri ve tabanıyla aynı renkte olması sağlandı. Suyu içerisindeki platformun görülmemesi amacıyla yeterli miktarda, toksik olmayan boya karıştırıldı. Tankın çevresine, hayvanların platformun yerini öğrenmesine yardımcı olacak uzamsal ipuçları asıldı. Bu ipuçları; kalp, daire, hilal ve yıldız görsellerinden seçildi. 5 gün süren öğrenme günleri boyunca platformun sürekli aynı kadrana ve aynı mesafede kalması sağlandı. Öğrenme denemelerinde hayvanın bırakılacağı noktalar belirlendi: Kuzey (K), Doğu (D), Güneydoğu (GD), Kuzeybatı (KB) gibi. Her öğrenme denemesi gününde, ilk deneme için hayvanın ilk suya bırakılış noktası bir önceki günden farklı olacak biçimde seçildi. Günlere göre atış sıraları;

Tablo 3.2. Öğrenme deneyinde sıçanların suya atış noktaları (217).

Gün	Birinci atış	İkinci atış	Üçüncü atış	Dördüncü atış
1.	K	D	GD	KB
2.	GD	K	KB	D
3.	KB	GD	D	K
4.	D	KB	K	GD
5.	K	GD	D	KB

K Kuzeyi, D Doğuyu, GD Güneydoğuyu, KB Kuzeybatıyı, GB Güneybatıyı, KD Kuzeydoğuyu, B Batıyı temsil etmektedir.

Öğrenme denemelerinde, hayvan seçilen suya bırakılma noktasından suya bırakıldı ve gizli platformu bulması için 120 saniye süre verildi. İlk gün atışlarında 120 saniye içerisinde platformu bulamayan hayvan, bu sürenin sonunda, platformun yerini öğrenebilmesi için platformun üzerine konarak 30 saniye süreyle bekletildi. Devam eden denemelerde, platformu bulan ve üzerine çıkan hayvanın başarılı olduğu kabul edildi ve akabinde öğrenme denemeleri sonlandırıldı. Öğrenme denemelerinin tamamlanmasının ardından, altıncı gün belleği test etme, probe denemesine geçildi. Probe denemelerine geçilmeden önce platform su tankından çıkartıldı. Hayvanlar KD kadrانından suya bırakılma noktasından suya bırakıldı ve her hayvana 60 saniye süre verildi. 60 saniye

sonunda hayvanlar su içerisinde alınıp kurularak kafeslerine konuldu. Öğrenme denemelerinin tamamı Morris su tankının üzerinde konumlandırılmış olan, tavana asılı termal bir kamera ve Etho Vision XT sürüm 11.5 video takip sistemiyle kaydedildi, öğrenme-bellek verileri analizler için depolandı.

3.2.1.6. Hayvan deneylerinin sonlandırılması

Çalışmanın on altıncı haftasının sonunda tüm hayvanlara, bütün gruplardan elde edilmesi planlanmış olan hipokampus doku örneklerini almak amacıyla genel anestezi (Ksilazin+ Ketamin; 5-10 mg/kg + 50-60 mg/kg, intraperitoneal) uygulanarak ötenazi gerçekleştirildi. Elde edilen hipokampus doku örnekleri Tıbbi Biyoloji AD.'nda bulunan -80 °C dondurucularda saklandı.

3.2.2. Moleküler Genetik Analizler

3.2.2.1. Total RNA (mRNA) eldesi

Bütün deney gruplarındaki hayvanlardan elde edilen ve RNA Save (Biological Industries, Beit-Haemek, İsrail. Cat. No. 01-891-1A) RNA stabilizasyon solüsyonu içerisine alınarak saklanan hipokampus dokularından total RNA izolasyonu için RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Almanya. Cat. No. 73404) kullanıldı. İlgili kitin çalışma protokolü şu şekilde gerçekleştirildi:

1. Stabilizasyon solüsyonu içerisinde saklanmış dokulardan uygun miktarlarda (30-40 mg) lam üzerinde kesilerek temiz tüplere alındı,
2. Her tüpe birer adet 5 mm çelik boncuk (Qiagen, Hilden, Almanya. Cat. No. 69989) eklendi.
3. Doku ve boncukları içeren tüplere 900 µl QIAzol Lysis Reagent eklendi,
4. Tüpler Qiagen Tissue Lyser LT (Qiagen, Hilden, Almanya. Cat. No. 69980) cihazına yerleştirildi, ardından 50 osc ve 5 dakika boyunca dokuların parçalama işlemi gerçekleştirildi,
5. Homojenat içeren tüpler, nükleoprotein komplekslerinin ayrışmasını desteklemek amacıyla 5 dakika boyunca oda sıcaklığında (15–25 °C) inkübe edildi,
6. Homojenat üzerine 100 µl gDNA Eliminator solüsyonu eklendi ve 15 sn süreyle iyice karıştırıldı,
7. Karışıma 180 µl kloform eklendi ve 15 sn süreyle iyice karıştırıldı,
8. Karıştırılmanın ardından homojenatlar 2-3 dk oda sıcaklığında inkübe edildi,

9. Doku çözeltileri 4 °C'de 15 dakika boyunca 12,000 x g'de santrifüj edildi,
10. Santrifüj sonrası tüplerde 3 faz elde edildi, en üst faz (yaklaşık 600 µl) yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı,
11. Üst fazı içeren yeni mikrosantrifüj tüplerine 600 µl 70% etanol eklenerek iyice karıştırıldı,
12. Karışımdan 700 µl alınarak, toplama tüpü içindeki RNeasy Mini spin kolonuna alındı ve oda sıcaklığında $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10.000 \text{ rpm}$) hızında 15 sn santrifüj edildi. Alt toplama tüpüne biriken kalıntılar atıldı.
13. Kolon içerisindeki kalıntıların tamamen temizlenmesi amacıyla toplama tüpü, içerisindeki RNeasy Mini spin kolon ile birlikte tekrar oda sıcaklığında $\geq 8000 \times g$ hızında 15 sn santrifüj edildi. Alt toplama tüpüne biriken kalıntılar atıldı.
14. RNeasy Mini spin kolon üzerine 700 µl Buffer RWT eklendi ve $\geq 8000 \times g$ hızında 15 sn santrifüj edildi. Alt toplama tüpüne biriken kalıntılar atıldı.
15. RNeasy Mini spin kolon üzerine 500 µl Buffer RPE eklendi ve $\geq 8000 \times g$ hızında 15 sn santrifüj edildi. Alt toplama tüpüne biriken kalıntılar atıldı.
16. RNeasy Mini spin kolon üzerine tekrar 500 µl Buffer RPE eklendi ve $\geq 8000 \times g$ hızında 15 sn santrifüj edildi. Alt toplama tüpüne biriken kalıntılar atıldı.
17. RNeasy Mini spin kolonlar yeni bir toplama tüpüne alınarak, Buffer RPE solüsyonunun tamamen uzaklaşması amacıyla, en yüksek hızda 1 dk santrifüj edildi.
18. RNeasy Mini spin kolonlar yeni birer 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınarak üzerlerine 30-50 µl RNaz içermeyen su eklendi ve $\geq 8000 \times g$ hızında 1 dk santrifüj edildi.
19. Santrifüj sonrası 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpündeki elde edilmiş total RNA'lar Tıbbi Biyoloji AD.'nda bulunan -80 °C dondurucularda saklandı.

3.2.2.2. Elde edilen RNA'ların kalite ve miktar tayini

İzole edilmiş olan total RNA numunelerinin konsantrasyonlarını ve kalitesini belirleyebilmek ve de cDNA reaksiyonları gerçekleştirilmesi öncesi, tüm örnekleri aynı konsantrasyon ve hacimlere ayarlayabilmek adına spektrofotometre ile ölçümler gerçekleştirildi.

RNA örneklerinin kalite ve miktar tayini NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, ABD) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. cDNA reaksiyonları için RNA konsantrasyonları 200 ng/μl olarak ayarlandı.

3.2.2.3. mRNA'dan cDNA eldesi

1. Temiz bir 96'lık piko plate'in kuyularına Fluidigm Reverse Transcription Kit (Fluidigm, Kaliforniya, ABD. Cat. No. 100-6298) 1 er μl pipetlendi.
2. cDNA reaktifinin üzerine 4 μl Total RNA örneklerinden pipetlendi.
3. Piko plate, plate karıştırıcıda 2.000 rpm'de 3 dk karıştırıldı. Vorteks üzerinde 2 sn karıştırılıp, 4-5 sn beklenerek bir kez daha karıştırıldı. Plate santrifüjünde 60 sn santrifüj edildi ve aşağıdaki thermal programla Gene Pro Thermal Cycler cihazına (Bioer, Zhejiang, Çin) alındı (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. cDNA Tepkime Koşulları

Sıcaklık (°C)	Zaman
25	5 dk
42	30 dk
85	5 dk
4	∞

4. Thermal program sonunda piko plate, plate karıştırıcıda 60 sn santrifüj edildi.
5. cDNA örnekleri, preamp aşaması için 1/4 oranında direk kullanıldı. Yani 1.25 μl cDNA, sonraki aşamada hazırlanan premap master mix ile karıştırıldı.

3.2.2.4. Primer seçimi

Real Time-PCR'da moleküler analizi hedeflenmiş olan SYP geni ve housekeeping gen olarak ise GAPDH geni TaqMan™ Gen ekspresyon primer assayleri kullanıldı. Kullanılmış olan TaqMan primer assaylere ait bilgiler Tablo 3.4'te verildiği gibidir.

Tablo 3.4. qRT-PCR’da kullanılan TaqMan Primerler ve detayları

Primer Assay	Cat. No.	Assay ID	RefSeq No.	UniGene ID
Syp	4448892	Rn01528256_m1	NM_012664.2	Rn.11067
Gapdh	4453320	Rn01775763_g1	NM_017008.4	Rn.129558

3.2.2.5. Preamplifikasyon reaksiyonunun hazırlanması

1. TaqMan primer assayler aşağıda verildiği gibi hazırlandı. Primerler tamamen çözüldükten sonra iyice vortekslenerek hızlı ve kısaca santrifüj edildi.

PreAmp Primer Havuzu Hazırlanması:

1. Çalışmada toplamda 2 primer ile çalışıldı, buna göre;
 - Her primerden bir tüpe 2 µl alındı.
 - Toplam hacim DNA Suspension Buffer, pH 8.0 (Teknova, Kaliforniya, ABD. Cat. No. T0223) ile 200 µl'ye tamamlandı.
 - Tüp vorteksle iyice karıştırılıp, PreAmp primer pool olarak sonraki adımda hazırlanan PreAmp karışımına eklendi.
2. Aşağıdaki karışım örnek başına olacak şekilde hazırlandı (Tablo 3.5).

Tablo 3.5. PreAmp karışımı bileşenleri ve oranları

Bileşenler	Hacim
Preamp master mix*	1 µl
PreAmp primer havuzu	1,25 µl
DNaz-RNaz içermeyen su	1,50 µl
Toplam Hacim	3,75 µl

*(Fluidigm, Kaliforniya, ABD. Cat. No. 100-5580)

3. Hazırlanan karışım eşit hacimlerde 8'li strip tüpe dağıtıldı.
4. cDNA örneklerinden 1.25 ul piko plate'e dağıtıldı. Örnek dağıtılan tüm kuyular kontrol edildi.
5. cDNA'lar üzerine hazırlanan PreAmp karışımı 3.75 µl olarak dağıtıldı. Karışım dağıtılan tüm kuyular kontrol edildi.
6. Piko plate, plate karıştırıcıda 2.000 rpm'de 3 dk karıştırıldı. Vorteks üzerinde 2 sn karıştırılıp, 4-5 sn beklenerek bir kez daha karıştırıldı. Plate santrifüjünde 60 sn santrifüj edildi ve aşağıdaki thermal programla Gene Pro Thermal Cycler cihazına (Bioer, Zhejiang, Çin) alındı (Tablo 3.6).

Tablo 3.6. PreAmp Tepkime Koşulları

Sıcaklık (°C)	Zaman	
95	2 dk	
95	15 sn	} 14 Döngü
60	4 dk	
4	∞	

7. Thermal program sonunda piko plate, plate karıştırıcıda 60 sn santrifüj edildi.
8. Tüm Örnekler 1/5 oranında sulandırıldı.

3.2.2.6. qRT-PCR (Real Time-PCR, Gerçek Zamanlı-PCR)

1. 20X konsantrasyondaki TaqMan primerler, aşağıdaki gibi hazırlanarak Biomark (Fluidigm, Kaliforniya, ABD) yüksek kapasiteli Real-Time PCR cihazına yüklemeye hazır hale getirildi (Tablo 3.7)

Tablo 3.7. TaqMan primerleri yükleme için hazırlama bileşenleri ve oranları

Bileşenler	Hacim
20X TaqMan Primer	12 µl
2X Assay Loading Reagent*	12 µl
Toplam Hacim	24 µl

*(Fluidigm, Kaliforniya, ABD. Cat. No. 100-7611)

2. RT-PCR karışımı aşağıda verildiği şekilde hazırlandı (Tablo 3.8)

Tablo 3.8. qRT-PCR için kullanılan bileşenler ve oranları

Bileşenler	Hacim
Taqman GE Master Mix*	2,5 µl
20X DNA Binding Dye SLR**	0,25 µl
DNA suspension buffer***	0,75 µl
Eva Green****	0,25 µl
Toplam Hacim	3,75 µl

*(Thermo Scientific, Waltham, ABD. Cat. No. 4369016)
**(Fluidigm, Kaliforniya, ABD. Cat. No. 100-3738)
*** (Teknova, Kaliforniya, ABD. Cat. No. T0223)
**** (Biotium, Kaliforniya, ABD. Cat. No. 31000)

3. Hazırlanan karışım eşit hacimlerde 8'li strip tüpe dağıtıldı.
4. Temiz bir piko plate alınarak, sulandırılmış preamplifiye örneklerden 1.5 µl dağıtıldı. Örnek dağıtılan bütün kuyular kontrol edildi.
5. Örnekler üzerine 4.5 µl hazırlanan PCR karışımı dağıtıldı. Karışım dağıtılan tüm kuyular kontrol edildi.
6. Piko plate, plate karıştırıcı da 2.000 rpm'de 3 dk boyunca karıştırıldı. Vorteks üzerinde 2 sn karıştırıldı, ardından 4-5 sn beklenerek bir kez daha karıştırıldı. Plate santrifüjünde 60 sn santrifüj edildi.

Hazırlanan primer ve PCR karışımı, cihaza yüklenecek olan Flex Six™ Gene Expression IFC (Fluidigm, Kaliforniya, ABD. Cat. No. 100-6308) çipin kuyularına 3.75 µl olarak pipetlendi. Çip, örnekler ve primerlerin, çipte bulunan kuyucuklara uygun şekilde yerleşmesi, karışması ve ön kontrolü için qRT-PCR aşaması öncesi IFC Controller HX (Fluidigm, Kaliforniya, ABD) cihazına konuldu. Kontrol işlemlerinin tamamlanmasının ardından çip, Biomark (Fluidigm, Kaliforniya, ABD) yüksek kapasiteli Real-Time PCR cihazında aşağıdaki thermal programa alındı (Tablo 3.9).

Tablo 3.9. Biomark Thermal Programı (qRT-PCR Tepkime Koşulları)

Sıcaklık (°C)	Zaman	
50	2 dk	} Thermal Karışım
70	30 dk	
25	10 dk	
50	2 dk	} Hot Start
96.5	10 dk	
96	15 sn	} 40 Döngü
60	1 dk	

3.2.3. Western blot

3.2.3.1. Doku homojenizasyonu ve protein izolasyonu

1. Bütün deney gruplarındaki hayvanlardan çıkarılan ve ayrı ayrı mikrosantrifüj tüplerine alınarak -80 °C'de saklanan hipokampus dokularından, uygun miktarlarda (30-40 mg) lam üzerinde kesilerek temiz tüplere alındı,
2. Her tüpe birer adet 5 mm çelik boncuk (Qiagen, Hilden, Almanya. Cat. No. 69989) eklendi,
3. Protein lizatları için her örnek başına, 10X RIPA Buffer (Cell Signaling Technology, Massachusetts, ABD. Cat. No. 9806) 1X şeklinde, PMSF (Cell Signaling Technology, Massachusetts, ABD. Cat. No. 8553) 1mM konsantrasyonda ve Phosphatase Inhibitor Cocktail II (Bio Basic, Ontario, Kanada. Cat. No. PL019) 2X konsantrasyonda taze hazırlandı.
4. Doku ve boncukları içeren tüplere 250 µl taze hazırlanan RIPA Buffer karışımından eklendi,

5. Tüpler Qiagen Tissue Lyser LT (Qiagen, Hilden, Almanya. Cat. No. 69980) cihazına yerleştirildi, ardından 50 osc ve 5 dakika boyunca dokuların parçalama işlemi gerçekleştirildi,
6. Homojenizasyonun ardından doku çözeltileri yeni tüplere alınarak, 4 °C'de 15 dakika boyunca 12,000 x g'de santrifüj edildi,
7. Santrifüj sonrası üst fazlar, temiz 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alınarak elde edilmiş protein lizatları Tıbbi Biyoloji AD.'nda bulunan -80 °C dondurucularda saklandı.

3.2.3.2. Elde edilen proteinlerin kalite ve miktar tayini

İzole edilen proteinlerin kalite ve konsantrasyonları, total proteinin kolorimetrik tespiti ve miktar tayini için bisinkoninik asite (BCA) dayalı bir yöntemi içeren Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Waltham, ABD. Cat. No. 2327) kullanılarak gerçekleştirildi.

Kit içerisinde yer alan BSA stok çözeltisinden, seri dilüsyonlar yapılarak BSA standartları hazırlandı. Ardından kit içerisindeki A ve B solüsyonları 50:1 oranında karıştırılarak 96 kuyucuklu plate'lerin her kuyusuna 200 µl eklendi.

Kuyucuklara dağıtılan solüsyon karışımlarının üzerine her örnek ve standarttan 25 µl eklenip karıştırıldıktan sonra plate, 37 °C'de 30 dk inkübe edildi.

İnkübasyonun tamamlanmasının ardından, 562 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü.

3.2.3.3. Protein konsantrasyonlarının eşitlenmesi ve protein denatürasyonu

Protein ölçümleri belirlendikten sonra her proteinin konsantrasyonu 20 µg ve jele yüklenecek toplam hacim 20 µl olacak şekilde ayarlamalar yapıldı. Protein örneklerinin hacmi ayrı ayrı hesaplamalarla 15 µl'ye tamamlanarak, 20 µg olmaları sağlandı.

Yükleme tamponu olarak 2x Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad, Kaliforniya, ABD. Cat. No. 1610737) kullanıldı ve her örnekle 5 µl karıştırılarak yükleme yapılacak proteinler, 95 °C'de 5 dk Labcycler thermal cycler cihazında (SensoQuest, Göttingen, Almanya) denatüre edildi.

3.2.3.4. Proteinlerin jele yüklenmesi ve elektroforezi

Proteinlerin yüklenmesi ve yürütülmesi için, çalışmada protein ifade düzeylerinin saptanması hedeflenen Sinaptofizin ve β -Tubulin proteinlerinin moleküler ağırlıklarına göre 10% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast (Bio-Rad, Kaliforniya, ABD. Cat. No. 4561033) hazır jeller seçildi.

SDS-Page jel elektroforezi için kullanılan Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, Kaliforniya, ABD. Cat. No. 1658004) tankına, yürütme tamponu olarak kullanılan 10X Tris-Glycine SDS Running Buffer (Cell Signaling Technology, Massachusetts, ABD. Cat. No. 4050) stok çözeltisinden distile su ile seyreltilerek elde edilen 1X konsantrasyonda çözelti dolduruldu.

1X yürütme tamponu ile doldurulmuş tankın içerisine yerleştirilen jellere, 95°C ve 5 dk'da denatüre edilen örnekler Color-coded Prestained protein marker (Cell Signaling Technology, Massachusetts, ABD. Cat. No. 14208) ile birlikte yüklendi.

Yüklemenin tamamlanmasının ardından tankın kapağı kapatılarak, 100 V'da 2 saat yürütme gerçekleştirildi.

3.2.3.5. Proteinlerin membrana transferi

1. PVDF membran (Thermo Scientific, Waltham, ABD. Cat. No. LC2005) jelin boyutunda kesilip, 1 dk metanolde bekletilip aktif hale getirildi.
2. Metanol ile aktif hale getirilen membran, ardından 10X Tris-Glycine Transfer Buffer (Cell Signaling Technology, Massachusetts, ABD. Cat. No. 12539) stok çözeltisinden distile su ile seyreltilerek elde edilen 1X Transfer Buffer ile yıkandı.
3. Sandviç oluşturulacak olan tüm süngerler ve filtre kağıtları 1X Transfer Buffer ile ıslatılarak muamele edildi.
4. Sandviç yöntemiyle, membran ve jel üst üste getirilip, alt ve üstte birer filtre kağıdı ve süngerlerle kapatılarak transfer kaseti hazır hale getirildi.
5. Hazırlanan kaset, Mini PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, Kaliforniya, ABD. Cat. No. 1658004) tankına yerleştirilerek, üzeri 1X Transfer Buffer ile dolduruldu.
6. 25 V ve 4°C'de, yaklaşık 16 saat, gece boyunca ıslak transfer yöntemi ile transfer işlemi gerçekleştirildi.

3.2.3.6. Membranın bloklanması

Transfer işleminin tamamlanmasının ardından membran, %5'lik yağsız süt tozu (Cell Signaling Technology, Massachusetts, ABD. Cat. No. 9999) içeren bloklama çözeltisine alınarak, 1 saat boyunca oda sıcaklığında, orbital çalkalayıcı (ISOLAB, Bavyera, Almanya) üzerinde bloklandı.

%5'lik yağsız süt tozu içeren bloklama çözeltisi için;

1. 10X Tris Buffered Saline (TBS) (Cell Signaling Technology, Massachusetts, ABD. Cat. No. 12539) stok çözeltisinden distile su ile seyreltilerek 1X TBS çözeltisi elde edildi.
2. Elde edilen 1X TBS çözeltisinden 1 litre, 1 ml TWEEN® 20 (Merck, Hessen, ABD. Cat. No. P1379) solüsyonu ile karıştırılarak 1X TBST solüsyonu hazırlandı.
3. Elde edilen 1X TBST stok solüsyonundan, 100 ml'ye 5 gram yağsız süt tozu (Cell Signaling Technology, Massachusetts, ABD. Cat. No. 9999) eklenerek bloklama tamponu hazır hale getirildi.

Bloklama işleminin tamamlanmasının ardından membran, TBST solüsyonu ile 3 defa, 5 dakika süreyle yıkandı.

3.2.3.7. Birincil antikor ile işaretleme

SYP protein ifadesinin analizi için birincil antikor Synaptophysin (D35E4) Rabbit (Cell Signaling Technology, Massachusetts, ABD. Cat. No. 5461) ve yükleme kontrolü için birincil antikor β -Tubulin Rabbit (Cell Signaling Technology, Massachusetts, ABD. Cat. No. 2146) bloklama tamponu içerisinde ayrı ayrı 1:1000 oranında dilüe edilerek hazırlandı. Membranlar, hazırlanan primer antikor çözeltilerine alınarak gece boyunca 4°C'de orbital çalkalayıcı (Stuart, Staffordshire, İngiltere) üzerinde çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon sonrası membranlar, antikor çözeltilerinden uzaklaştırılıp, TBST çözeltisi ile 3 defa, 5 dakika süreyle yıkandı.

3.2.3.8. İkincil antikor ile işaretleme

Primer antikorlarla işaretleme ve yıkama işlemlerinin tamamlanmasının ardından, sekonder antikor Anti-rabbit IgG, HRP-linked (Cell Signaling Technology, Massachusetts, ABD. Cat. No. 7074) bloklama tamponu içerisinde 1:1000 oranında dilüe edilerek hazırlandı. Membranlar, hazırlanan sekonder antikor çözeltileriyle oda

sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası membranlar, antikor çözeltilerinden uzaklaştırılıp, TBST çözeltisi ile 3 defa, 5 dakika süreyle yıkandı.

3.2.3.9. Görüntüleme ve analiz

Protein bantları, SignalFire™ ECL Reagent (Cell Signaling Technology, Massachusetts, ABD. Cat. No. 6883) kemilüminesans kiti kullanılarak görüntülendi. Kit içerisindeki SignalFire™ ECL Reagent A ve SignalFire™ ECL Reagent B solüyonları 1:1 oranında karıştırılıp, membran üzerine dağıtıldı. Membran, oda sıcaklığında ve karanlıkta 3 dakika inkübe edildi. Ardından, Fusion FX kemilüminesans görüntüleme cihazı ile (Vilber Lourmat, Collégien, Fransa) görüntüler kaydedildi.

Kaydedilen protein bant görüntülerinin, ImageJ sürüm 1.53f programı ile dansitometrik ölçümleri gerçekleştirilerek, α -Tubulin protein seviyeleri ile normalizasyonu sağlandı.

3.2.4 İstatistiksel analizler

Hayvan deneyleri istatistiksel analizlerinde IBM Statistics SPSS sürüm 24.0 programı kullanıldı. Verilerin analizleri yapılırken grupların verilerine bakılıp normal dağılım gösterip göstermedikleri analiz edildi ve bunun sonucunda grupların karşılaştırılmasında Mann-Whitney U veya Kruskal-Wallis testleri uygulandı. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma (ort $\pm$ std) şeklinde özetlendi. İstatistiksel analizlerde $p < 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

Gen ifade analizlerinin değerlendirilmesi; Analizlerde, GAPDH geni house keeping olarak kullanılmıştır. Analizler;

<https://dataanalysis.qiagen.com/mirna/arrayanalysis.php?target=upload> sitesi üzerinden yapılmıştır. Analiz yönteminde program; ham veri sonuçlarının (Ct değerlerinin) analizlerini $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta Ct = \text{Hedef gen} - \text{Housekeeping gen}$) yöntemi ile hesaplamaktadır, bu değerler hesaplandıktan sonra gruplar arası karşılaştırmaları yapmak için (p değerlerinin hesaplanması) Basic student t test yöntemini kullanmaktadır.

Protein ifade analizlerinin değerlendirilmesinde ise ImageJ sürüm 1.53f programı ile bant yoğunlukları analiz edilerek elde edilen verilere, ikili karşılaştırmalarda istatistiksel olarak IBM Statistics SPSS sürüm 24.0 programı kullanılarak Student's t-testi uygulandı.

4. BULGULAR

4.1. Hayvan Deneyleri Sonuçları

4.1.1. Haftalık ağırlık takibi sonuçları

4.1.1.1. Obezite tedavisi öncesi ortalama ağırlık değerleri

Çalışmada, ilk 8 haftada deney protokolüne göre obezitenin oluşturulması amaçlanmıştır. İlk 8 haftanın sonunda yüksek yağlı diyetle beslenmeye bağlı olarak 18 tane hayvan Lee indeksine göre obezite tanısı almıştır. Kontrol grubu ve obez grubu arasındaki istatistiksel fark obezitenin oluştuğunu göstermektedir. Tablo 4.1 ve Şekil 4.1’de çalışmadaki tüm deney hayvanlarında ilk sekiz haftanın sonunda, vücut ağırlığındaki değişim süreci sunulmaktadır.

Tablo 4.1. Obezite tedavisi öncesi ortalama ağırlık değerleri

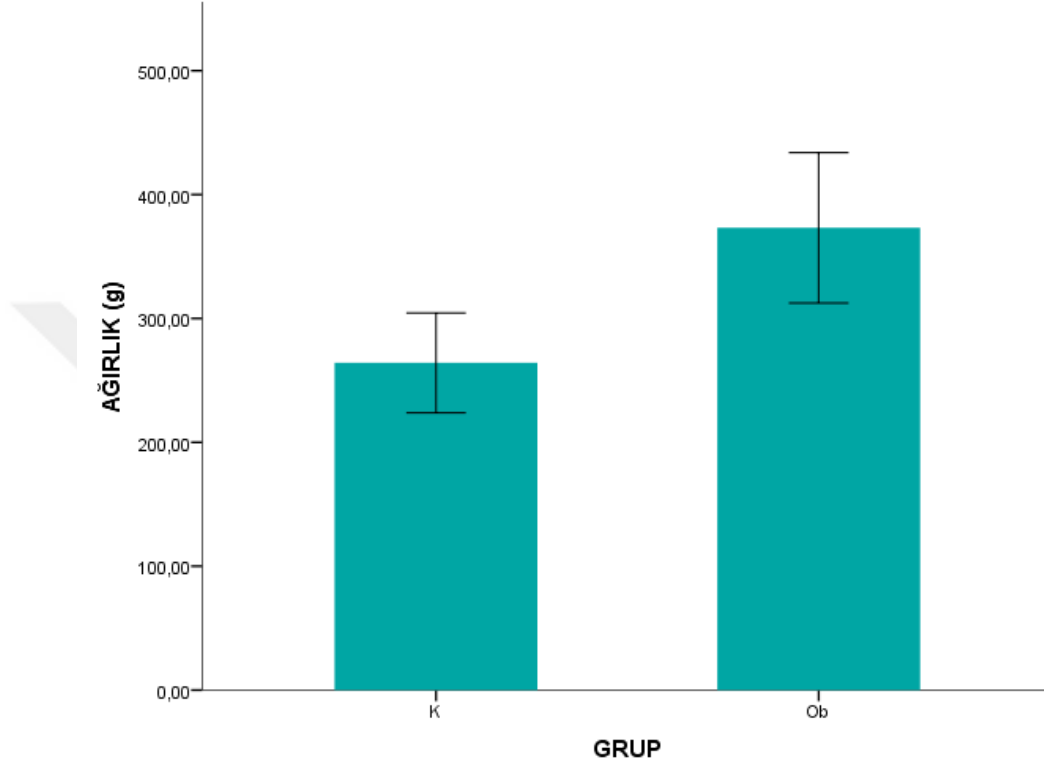
Grup	Ağırlık (g)	P değeri
K	264,1834 ±40,36445	
Ob	373,1333 ±60,69023*	0.001

*K ile istatistiksel anlamlılık sonucunu göstermektedir.

K kontrol grubu, Ob obez grubu temsil etmektedir.

İstatistiksel analiz olarak K ve Ob gruplarının kıyaslanmasında Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

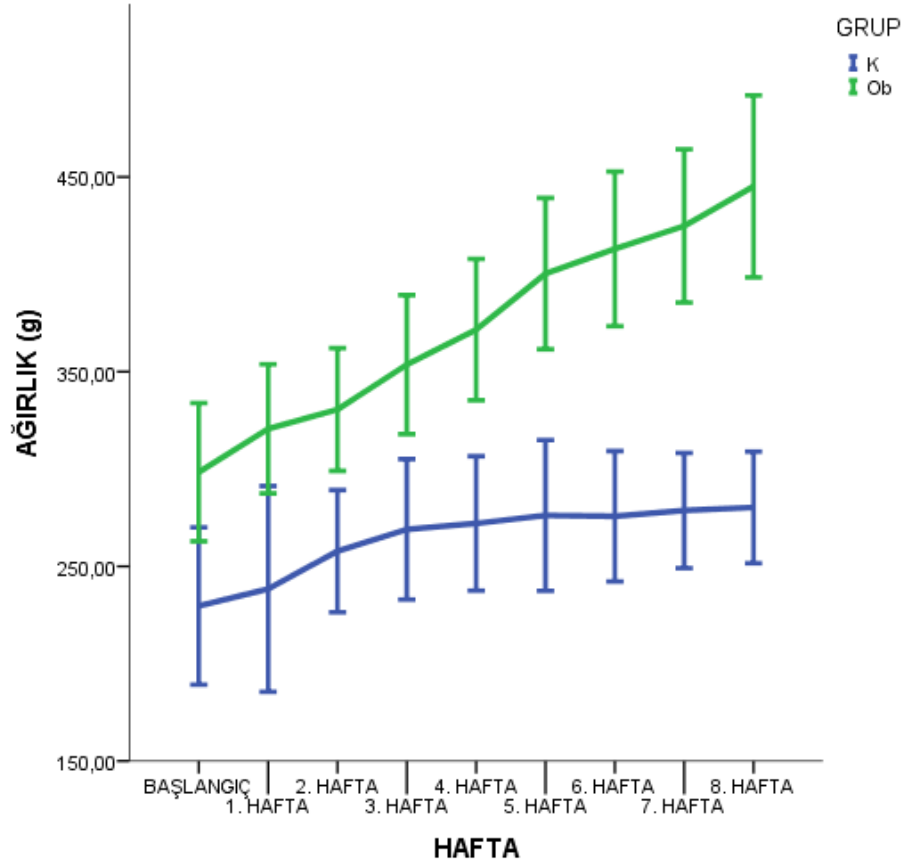
Kontrol grubu ve obez grubu arasındaki istatistiksel farkla obezitenin oluştuğunun tespit edilmesini takiben hayvanlar, çalışma protokolünde belirlendiği gibi ilgili tedavi ve kontrol gruplarına göre 7 gruba rastgele dağıtılmış ve 9. Haftadan itibaren tedavi protokollerine başlanmıştır.



şekil 4.1. Obezite tedavisi öncesi ortalama ağırlık sonuçları grafiği

K kontrol grubu, Ob obez grubu temsil etmektedir.

Çalışmadaki tüm deney hayvanlarında obezite tanısı konmadan ve tedavi protokollerine başlanmadan önceki sekiz hafta boyunca, vücut ağırlıklarındaki değişim süreci Şekil 4.2’de sunulmaktadır.



Şekil 4.2. Obezite tedavisi öncesi haftalık ortalama ağırlık sonuçları grafiği

K kontrol grubu, Ob obez grubu temsil etmektedir.

4.1.1.2. Obezite tedavisi sürecindeki ortalama ağırlık değerleri

İlk 8 haftanın sonunda yüksek yağlı diyetle beslenmeye bağlı olarak Lee indeksine göre 18 tane hayvanın obezite tanısı almasının ardından, geriye kalan 24 tane kontrol grubu hayvanı ile, önceden planlanmış deney gruplarına rastgele dağıtılmıştır (n=6). Tablo 4.2 ve Şekil 4.3’de çalışmadaki tüm deney hayvanlarında on altı haftanın sonunda, vücut ağırlığındaki değişim süreci sunulmaktadır.

Tablo 4.2. Obezite tedavisi sürecinde grupların ortalama ağırlık değerleri

Grup	Ağırlık (g)
K	330,3437 ±52,91029
K+NaCl	334,3344 ±60,39709 ^d
Ob	489,2614 ±63,71587 ^{ab}
K+DPP4i	244,7604 ±20,18584 ^{abc}
Ob+DPP4i	420,2500 ±37,1887 ^{abcd}
K+Eg	269,1389 ±25,05504 ^{abcde}
Ob+Eg	432,8281 ±36,60452 ^{abcdf}

Veriler ortalama ± standart sapma olarak özetlenmiştir.

^aK ile istatistiksel anlamlılık sonucunu göstermektedir. (P=0,001).

^bK+NaCl ile istatistiksel anlamlılık sonucunu göstermektedir. (P=0,001).

^cOb ile istatistiksel anlamlılık sonucunu göstermektedir. (P=0,001).

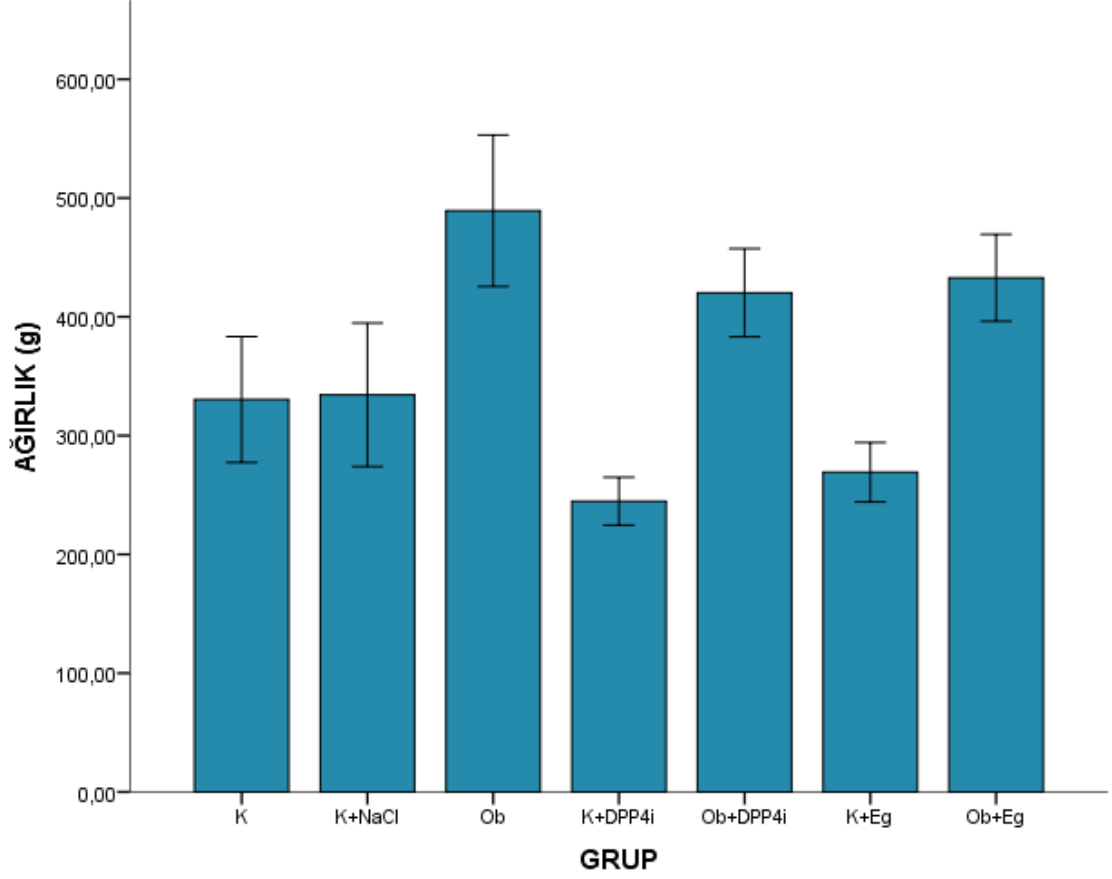
^dK+DPP4i ile istatistiksel anlamlılık sonucunu göstermektedir. (P=0,001).

^eOb+DPP4i ile istatistiksel anlamlılık sonucunu göstermektedir. (P=0,001).

^fK+Eg ile istatistiksel anlamlılık sonucunu göstermektedir. (P=0,001).

K kontrol grubu, K+NaCl serum fizyolojik verilen kontrol grubu, Ob obez grubu, K+DPP4i DPP4i inhibitörü verilen kontrol grubu, Ob+DPP4i DPP4i inhibitörü verilen obez grubu, K+Eg egzersiz uygulanan kontrol grubu, Ob+Eg egzersiz uygulanan obez grubu temsil etmektedir.

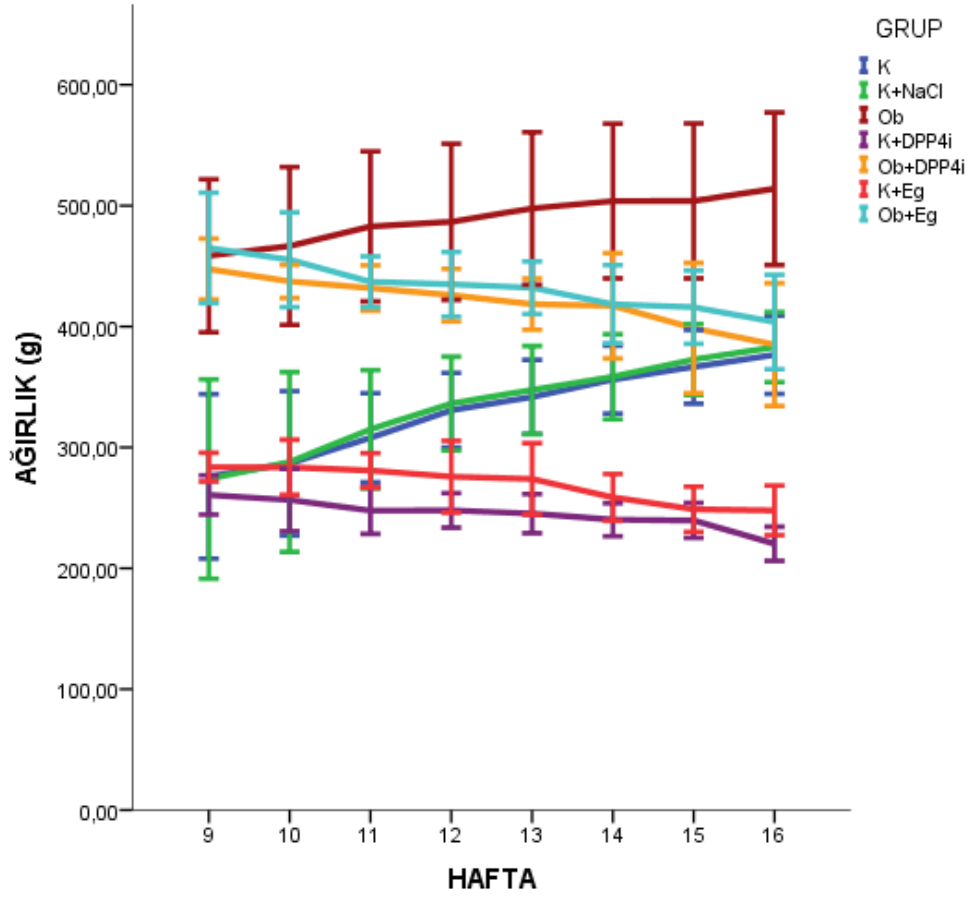
İstatistiksel analiz olarak K ve Ob gruplarının kıyaslanmasında Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır.



Şekil 4.3. Obezite tedavisi sürecinde grupların ortalama ağırlık sonuçları grafiği

K kontrol grubu, K+NaCl serum fizyolojik verilen kontrol grubu, Ob obez grubu, K+DPP4i DPP4i inhibitörü verilen kontrol grubu, Ob+DPP4i DPP4i inhibitörü verilen obez grubu, K+Eg egzersiz uygulanan kontrol grubu, Ob+Eg egzersiz uygulanan obez grubu temsil etmektedir.

Çalışmadaki tüm deney hayvanlarında, obezite tanısı sonrası, tedavi uygulamaları sürecindeki ikinci sekiz hafta boyunca, vücut ağırlıklarındaki değişim süreci Şekil 4.4’de sunulmaktadır.



Şekil 4.4. Obezite tedavisi sürecinde grupların haftalık ortalama ağırlık sonuçları grafiği

K kontrol grubu, K+NaCl serum fizyolojik verilen kontrol grubu, Ob obez grubu, K+DPP4i DPP4i inhibitörü verilen kontrol grubu, Ob+DPP4i DPP4i inhibitörü verilen obez grubu, K+Eg egzersiz uygulanan kontrol grubu, Ob+Eg egzersiz uygulanan obez grubu temsil etmektedir.

4.1.2. Haftalık kan glikoz değerleri takibi sonuçları

Çalışmanın bu aşamasında tüm gruplara ait haftalık kan glikoz seviyeleri düzenli olarak ölçüldü. Elde edilen tedavi öncesi ve sürecindeki kan glikoz değerleri karşılaştırıldı. Deneysel verilerin analizinde kontrol ve obez gruplarının karşılaştırılması sağlanmıştır. Analiz sonuçları Tablo 4.3 ve Tablo 4.4’de sunulmaktadır. Şekil 4.5’de tedavi öncesi kan glikoz bulguları, Şekil 4.6’da tedavi sürecindeki kan glikoz bulguları, Şekil 4.7’de ise obezite tanısı sonrası ayrılmış ve tedavi uygulanmış grupların haftalık kan glikoz verilerinin grafikleri sunulmuştur.

4.1.2.1. Obezite tedavisi öncesi ortalama kan glikoz değerleri

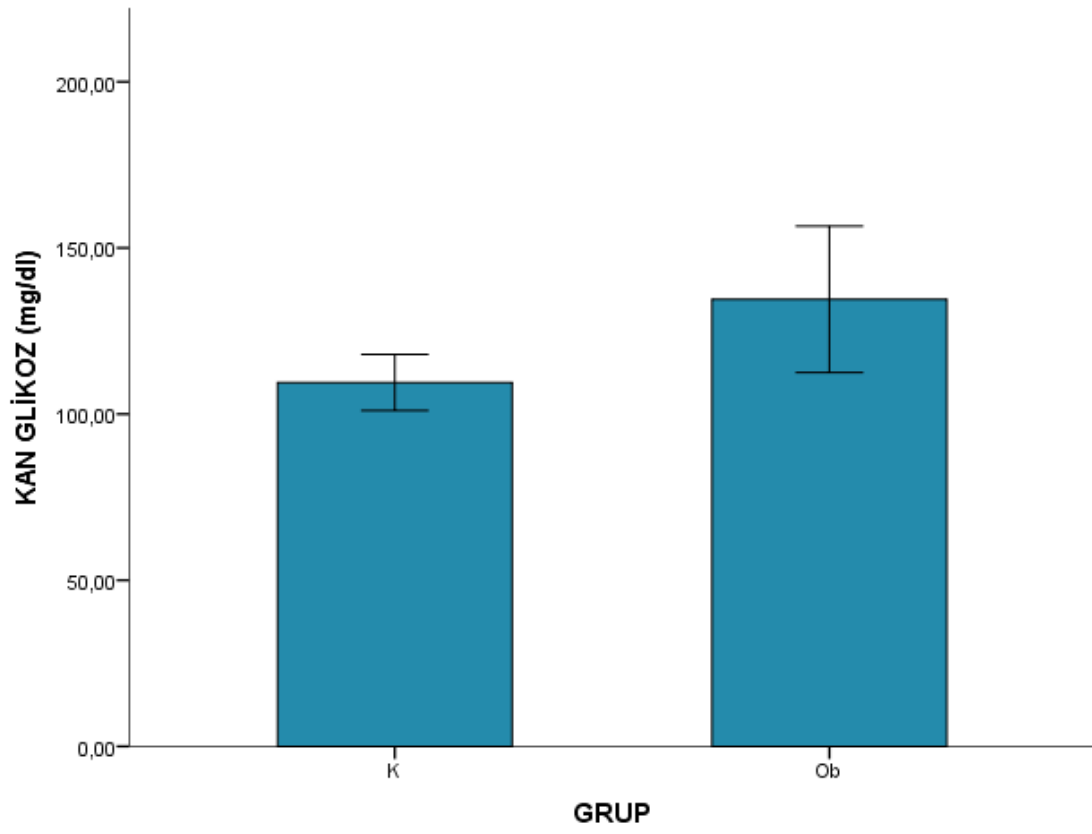
Tablo 4.3. Obezite tedavisi öncesi ortalama kan glikoz değerleri

Grup	Kan Glikozu (mg/dl)		P değeri
K	109,5000	±8,45154	
Ob	134,5556	±22,0142*	0.001

*K grubu ile istatistiksel anlamlılık sonucunu göstermektedir.

K kontrol grubu, Ob obez grubu temsil etmektedir.

İstatistiksel analiz olarak K ve Ob gruplarının kıyaslanmasında Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.



Şekil 4.5. Obezite tedavisi öncesi ortalama kan glikoz sonuçları grafiği

K kontrol grubu, Ob obez grubu temsil etmektedir.

4.1.2.2. Obezite tedavisi sürecinde ortalama kan glikoz değerleri sonuçları

Tablo 4.4. Obezite tedavisi sürecinde grupların ortalama kan glikoz değerleri

Grup	Kan glikozu (mg/dl)	
K	106,1875	±7,22402
K+NaCl	113,8906	±11,09142 ^{be}
Ob	154,3068	±20,62715 ^{adfg}
K+DPP4i	112,4063	±10,82257 ^c
Ob+DPP4i	121,5417	±17,21820 ^{ad}
K+Eg	111,4861	±12,73123
Ob+Eg	107,8750	±30,10010

Veriler ortalama ± standart sapma olarak özetlenmiştir.

^aOb+Eg ile istatistiksel anlamlılık sonucunu göstermektedir. ($P=0.001$).

^bOb+Eg ile istatistiksel anlamlılık sonucunu göstermektedir. ($P=0.033$).

^cOb+Eg ile istatistiksel anlamlılık sonucunu göstermektedir. ($P=0.004$).

^dK ile istatistiksel anlamlılık sonucunu göstermektedir. ($P=0.001$).

^eK ile istatistiksel anlamlılık sonucunu göstermektedir. ($P=0.037$).

^fK+DPP4i ile istatistiksel anlamlılık sonucunu göstermektedir. ($P=0.001$).

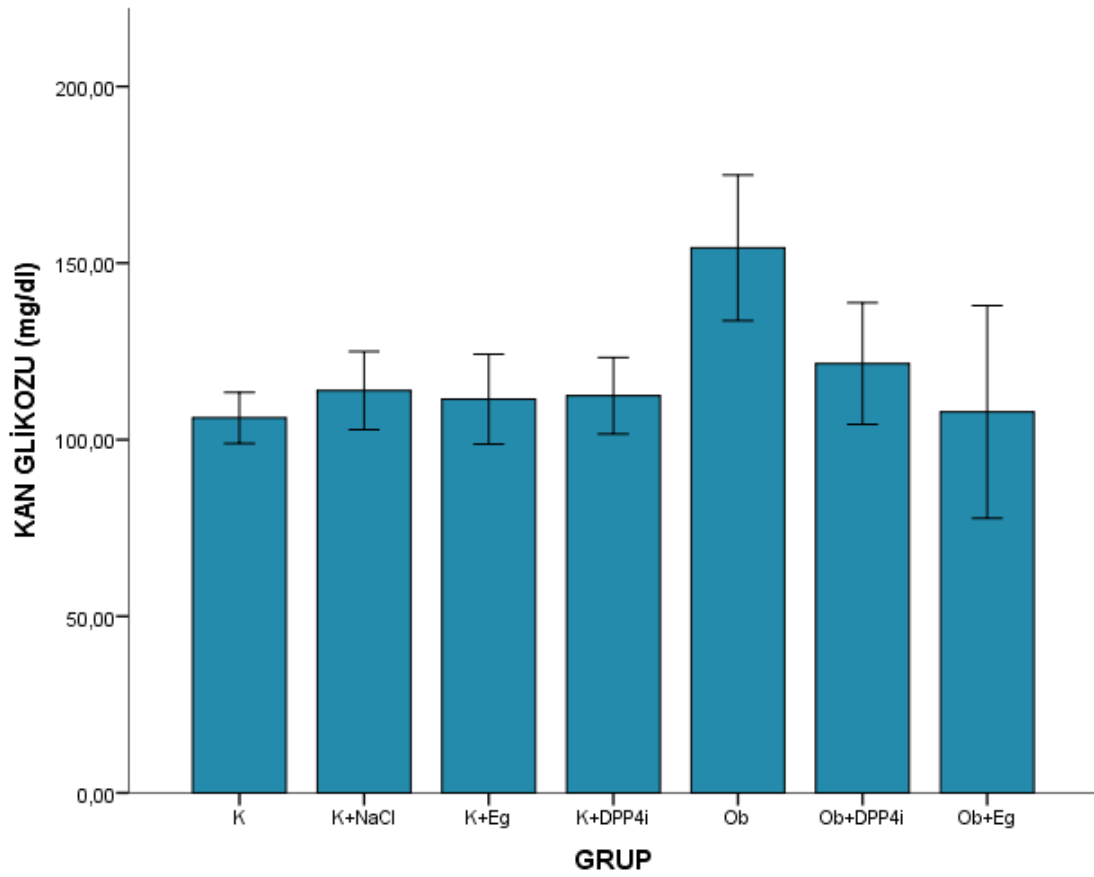
^gK+Eg ile istatistiksel anlamlılık sonucunu göstermektedir. ($P=0.001$).

^hK+NaCl ile istatistiksel anlamlılık sonucunu göstermektedir. ($P=0.001$).

ⁱOb+DPP4i ile istatistiksel anlamlılık sonucunu göstermektedir. ($P=0.001$).

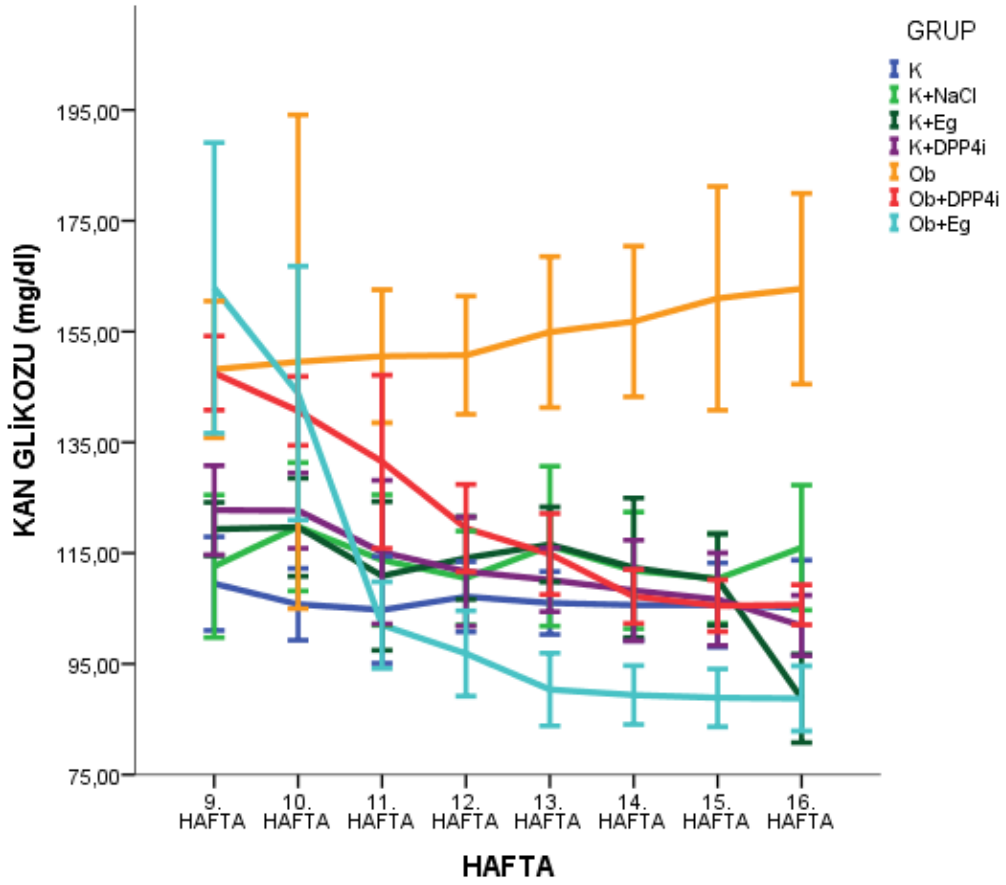
K kontrol grubu, K+NaCl serum fizyolojik verilen kontrol grubu, Ob obez grubu, K+DPP4i DPP4i inhibitörü verilen kontrol grubu, Ob+DPP4i DPP4i inhibitörü verilen obez grubu, K+Eg egzersiz uygulanan kontrol grubu, Ob+Eg egzersiz uygulanan obez grubu temsil etmektedir.

İstatistiksel analiz olarak grupların kıyaslanmasında Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır.



Şekil 4.6. Obezite tedavisi sürecinde grupların ortalama kan glikoz sonuçları grafiği

K kontrol grubu, K+NaCl serum fizyolojik verilen kontrol grubu, Ob obez grubu, K+DPP4i DPP4i inhibitörü verilen kontrol grubu, Ob+DPP4i DPP4i inhibitörü verilen obez grubu, K+Eg egzersiz uygulanan kontrol grubu, Ob+Eg egzersiz uygulanan obez grubu temsil etmektedir.



Şekil 4.7. Obezite tedavisi sürecinde grupların haftalık ortalama kan glikoz sonuçları grafiği

K kontrol grubu, K+NaCl serum fizyolojik verilen kontrol grubu, Ob obez grubu, K+DPP4i DPP4i inhibitörü verilen kontrol grubu, Ob+DPP4i DPP4i inhibitörü verilen obez grubu, K+Eg egzersiz uygulanan kontrol grubu, Ob+Eg egzersiz uygulanan obez grubu temsil etmektedir.

4.1.3. Morris su tankı öğrenme deneyi sonuçları

Tüm deney gruplarındaki hayvanların öğrenme ve bellek performansları Morris su tankı ile test edildi. Bellek performanslarının değerlendirilmesi için grupların ortalama platforma kaçış süreleri istatistiksel olarak değerlendirildi ve tablo 4.5’de verildiği gibi özetlendi.

Tablo 4.5. Grupların ortalama platforma kaçış süreleri

Grup	Kaçış süresi (s)	
K	39,7500	$\pm 6,92305^d$
K+NaCl	39,1250	$\pm 5,56616^c$
Ob	54,5455	$\pm 5,39191^{abehj}$
K+DPP4i	36,0000	$\pm 5,83095^{ci}$
Ob+DPP4i	44,1667	$\pm 3,43026^{dfj}$
K+Eg	31,3333	$\pm 2,34521^{cg}$
Ob+Eg	38,3750	$\pm 6,09303^c$

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak özetlenmiştir.

^aK ile istatistiksel anlamlılık sonucunu göstermektedir. ($P=0,005$).

^bK+NaCl ile istatistiksel anlamlılık sonucunu göstermektedir. ($P=0,001$).

^cOb ile istatistiksel anlamlılık sonucunu göstermektedir. ($P=0,001$).

^dOb ile istatistiksel anlamlılık sonucunu göstermektedir. ($P=0,005$).

^eK+DPP4i ile istatistiksel anlamlılık sonucunu göstermektedir. ($P=0,001$).

^fK+DPP4i ile istatistiksel anlamlılık sonucunu göstermektedir. ($P=0,040$).

^gOb+DPP4i ile istatistiksel anlamlılık sonucunu göstermektedir. ($P=0,001$).

^hOb+DPP4i ile istatistiksel anlamlılık sonucunu göstermektedir. ($P=0,005$).

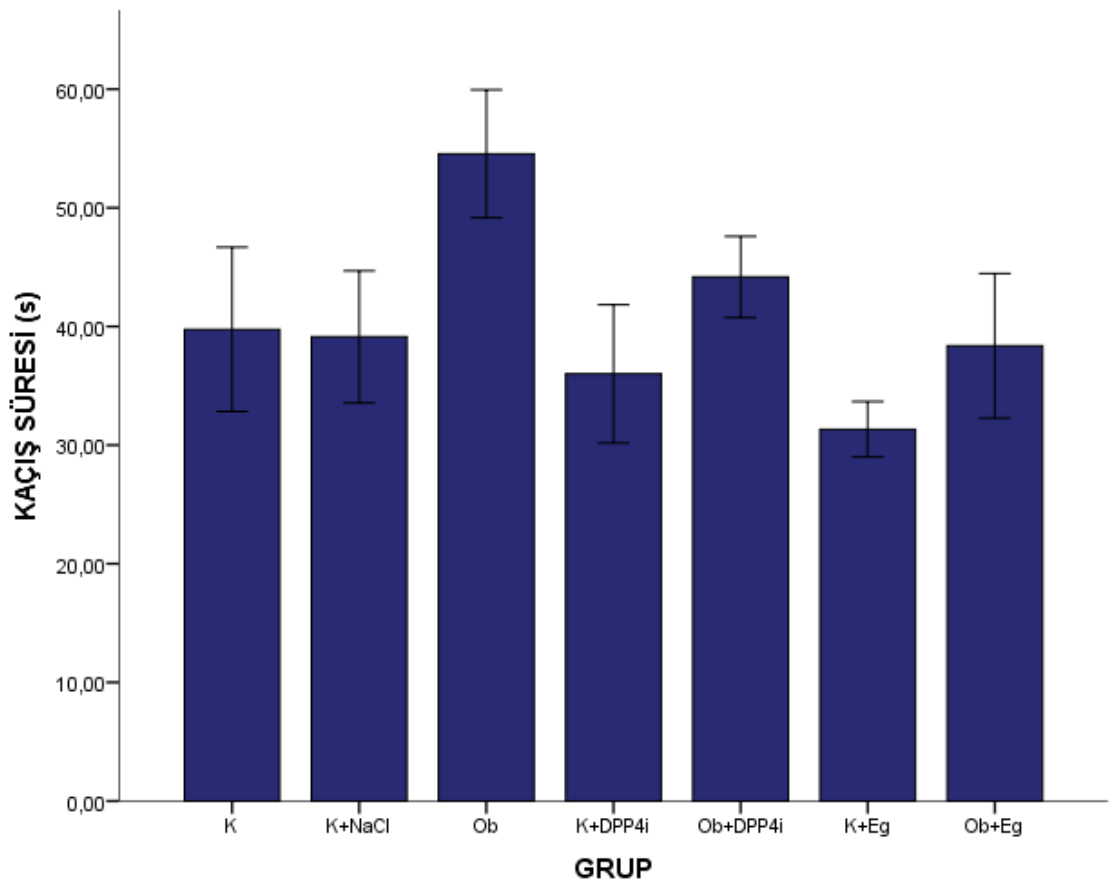
ⁱOb+DPP4i ile istatistiksel anlamlılık sonucunu göstermektedir. ($P=0,040$).

^jK+Eg ile istatistiksel anlamlılık sonucunu göstermektedir. ($P=0,001$).

K kontrol grubu, K+NaCl serum fizyolojik verilen kontrol grubu, Ob obez grubu, K+DPP4i DPP4i inhibitörü verilen kontrol grubu, Ob+DPP4i DPP4i inhibitörü verilen obez grubu, K+Eg egzersiz uygulanan kontrol grubu, Ob+Eg egzersiz uygulanan obez grubu temsil etmektedir.

İstatistiksel analiz olarak grupların kıyaslanmasında Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır.

Bellek performanslarının değerlendirildiği, grupların ortalama platforma kaçış sürelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesinin grafiği şekil 4.8’de verildiği gibidir.

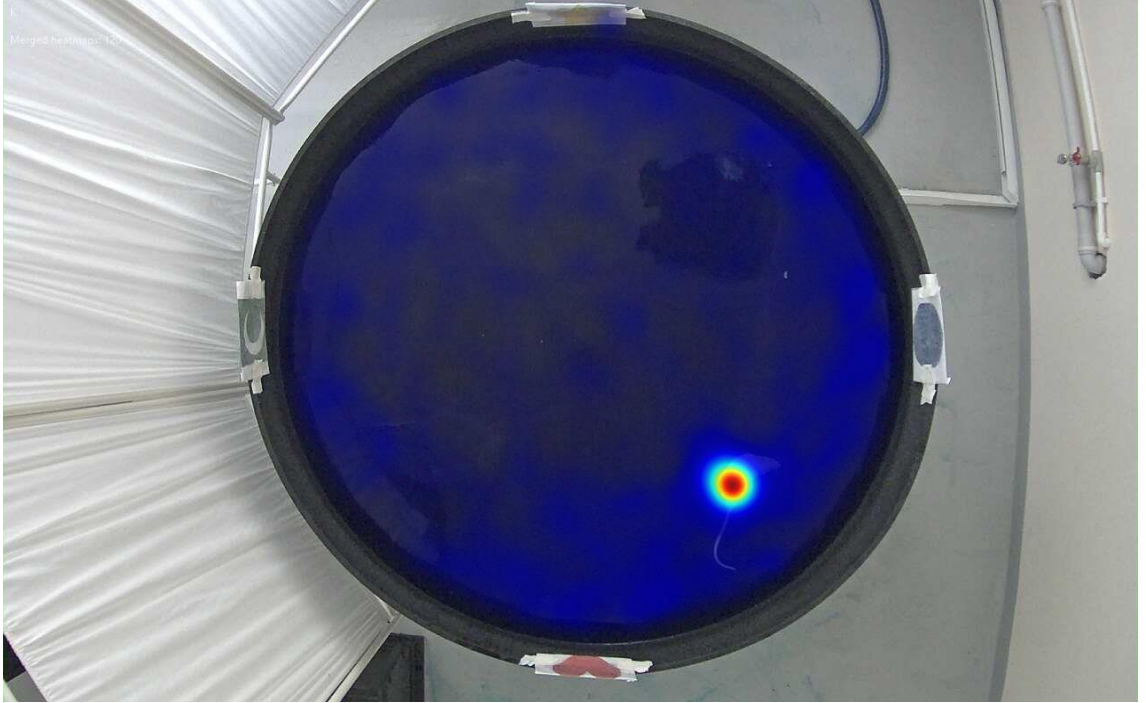


Şekil 4.8. Grupların ortalama platforma kaçış süreleri sonuçları grafiği

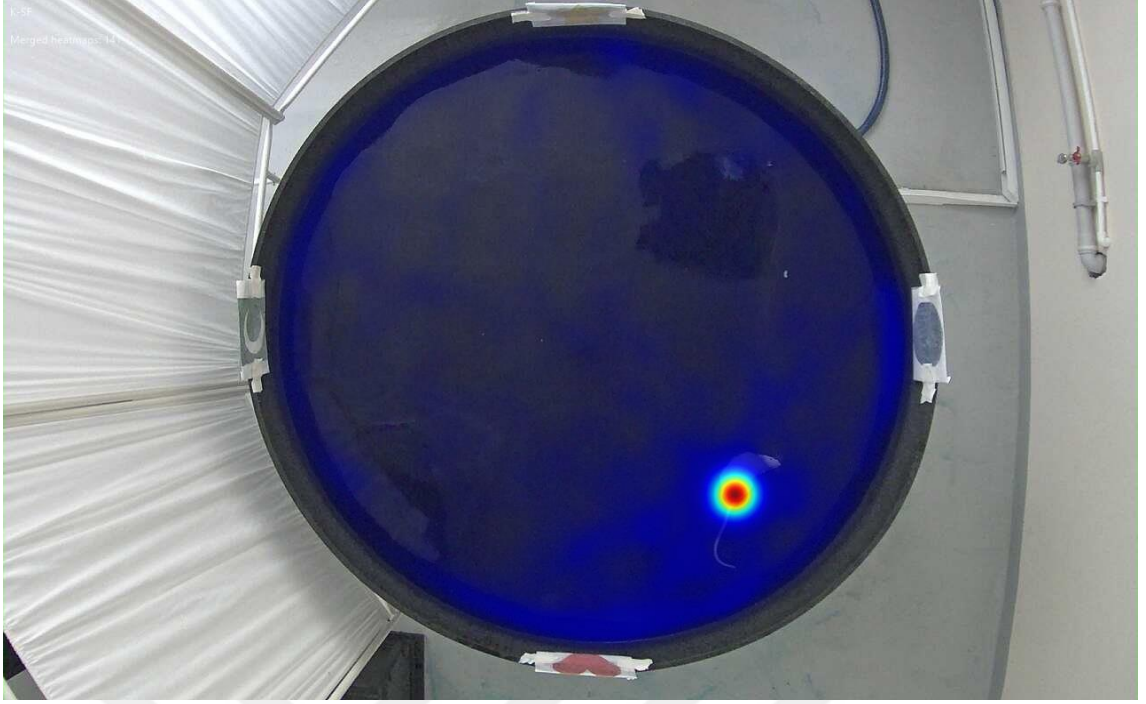
K kontrol grubu, K+NaCl serum fizyolojik verilen kontrol grubu, Ob obez grubu, K+DPP4i DPP4i inhibitörü verilen kontrol grubu, Ob+DPP4i DPP4i inhibitörü verilen obez grubu, K+Eg egzersiz uygulanan kontrol grubu, Ob+Eg egzersiz uygulanan obez grubu temsil etmektedir.

4.1.3.1. Öğrenme deneyleri sıcaklık haritası sonuçları

Morris su tankında Öğrenme bellek testlerine tabi tutulan sıçanların platform arayış esnasındaki izledikleri yol ve bu esnada harcadıkları sürelerle ilgili olarak termal kamera ve EthoVision programı yardımıyla sıcaklık haritaları (heatmap) elde edilmiştir. Öğrenme deneyleri boyunca ilk 5 gün platform sabit tutularak sıçanların izledikleri yol ve süreler takip edilmiştir. Sıcaklık haritaları her gruptaki hayvanların ayrı ayrı atış deneyleri üst üste bindirilip eşleştirilerek elde edilmiştir. Gruplara ait elde edilmiş sıcaklık haritaları Şekil 4.9 – 4.14 arası sunulduğu gibidir. Elde edilmiş olan bu görüntüler platforma kaçış süresi analiz sonuçları ve çalışma hipotezini desteklemektedir.



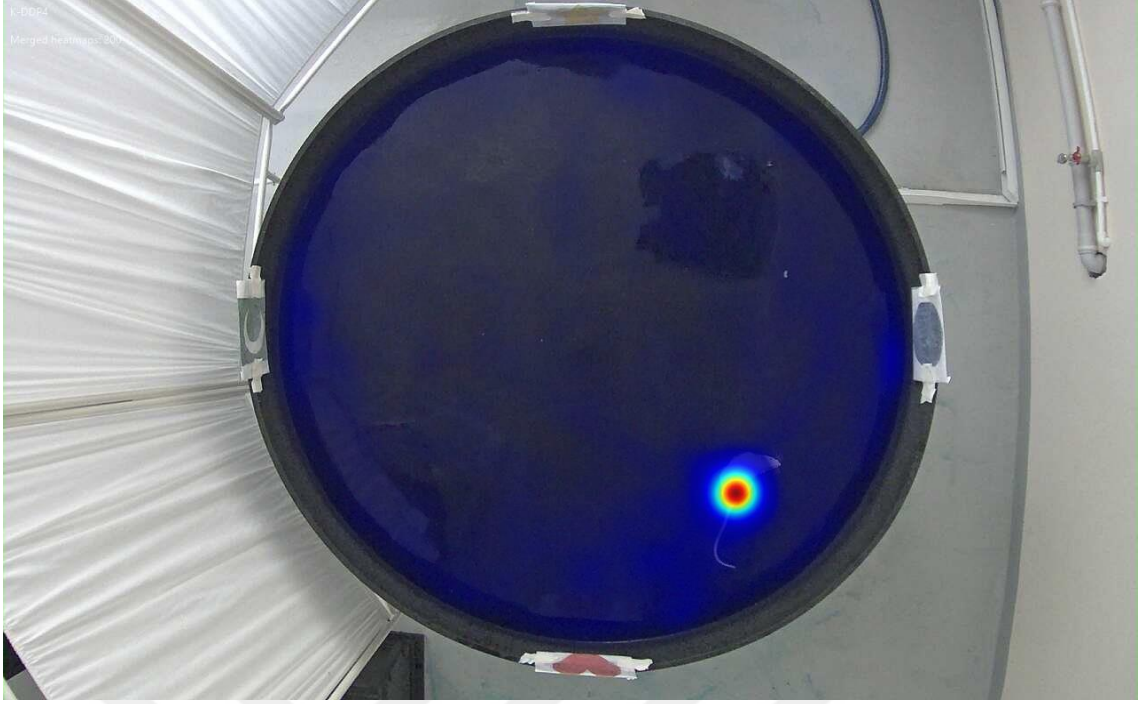
Şekil 4.9. Morris su tankında Kontrol Grubu ısı haritası



Şekil 4.10. Morris su tankında Kontrol+NaCl Grubu ısı haritası



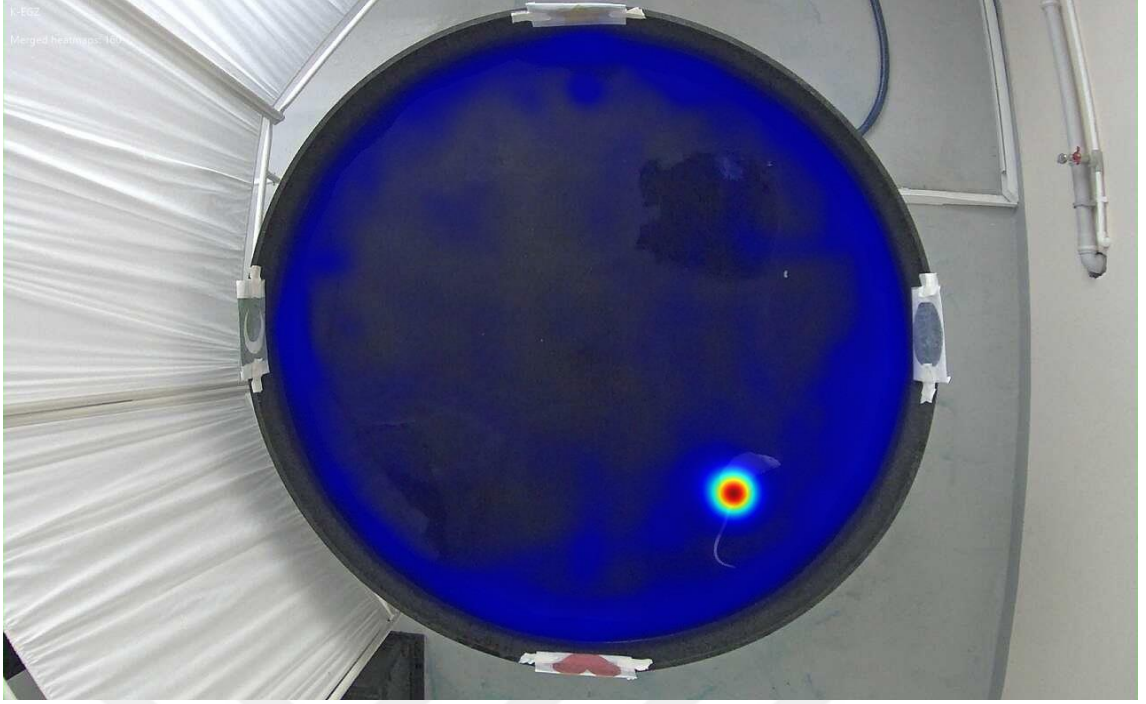
Şekil 4.11. Morris su tankında Obez Grubu ısı haritası



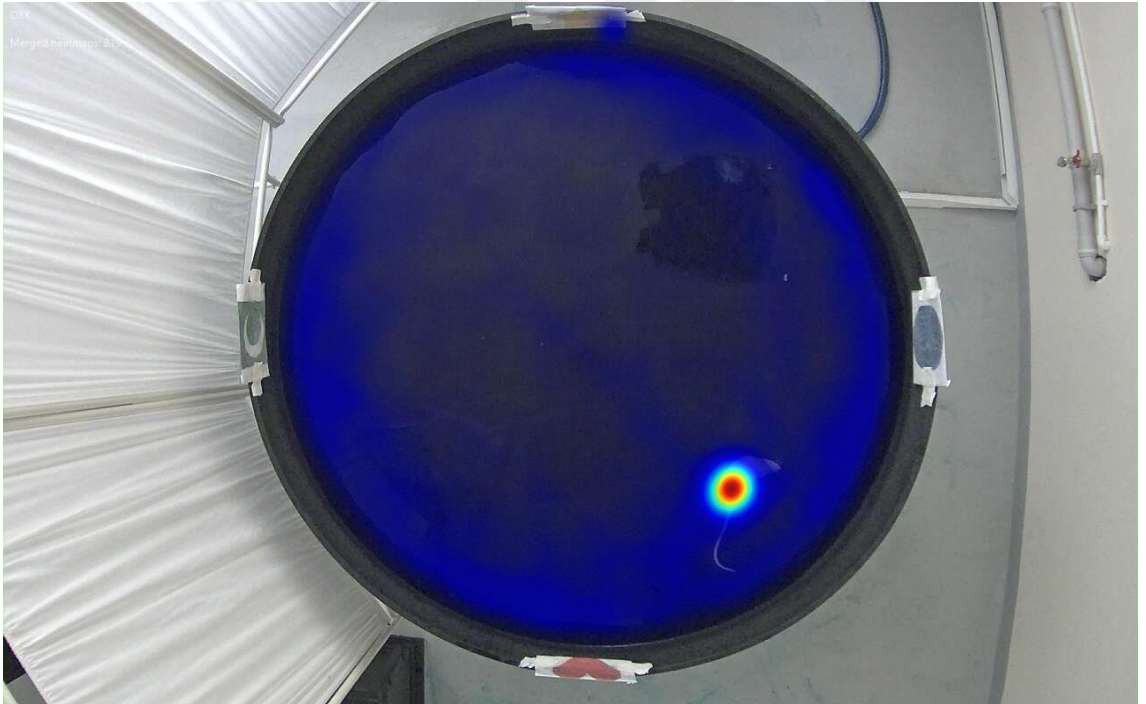
Şekil 4.12. Morris su tankında Kontrol+DPP4i Grubu ısı haritası



Şekil 4.13. Morris su tankında Obez+DPP4i Grubu ısı haritası



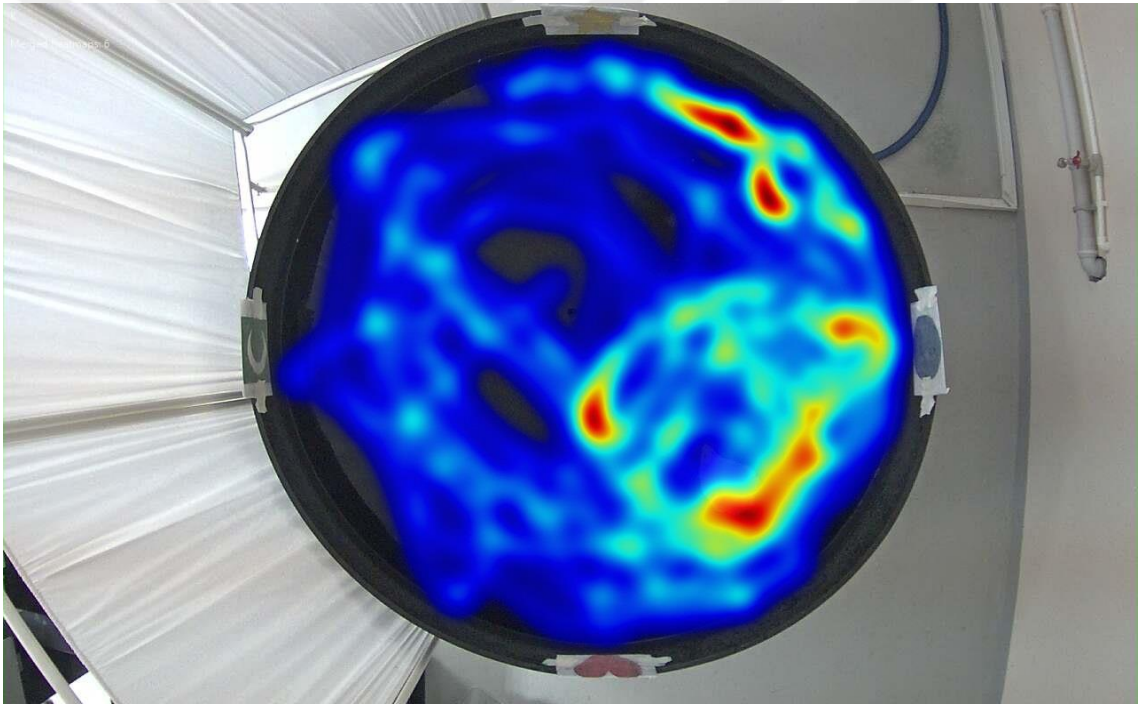
Şekil 4.14. Morris su tankında Kontrol+Egzersiz Grubu ısı haritası



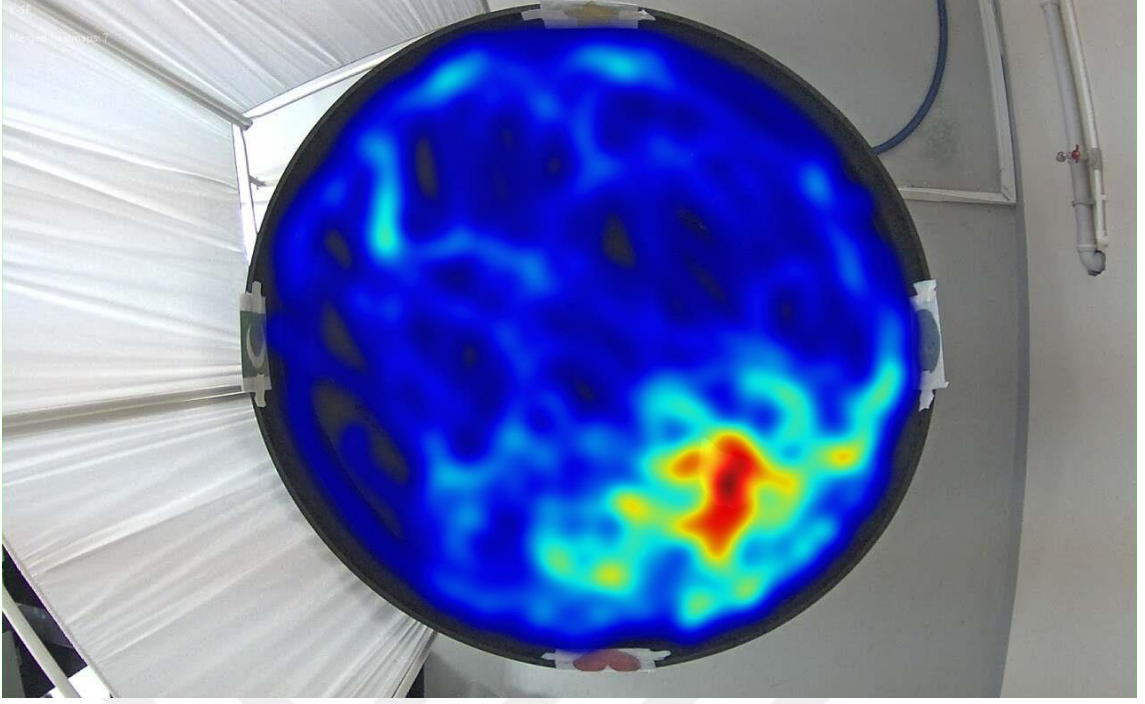
Şekil 4.15. Morris su tankında Obez+Egzersiz Grubu ısı haritası

4.1.3.2. Probe denemeleri sıcaklık haritası sonuçları

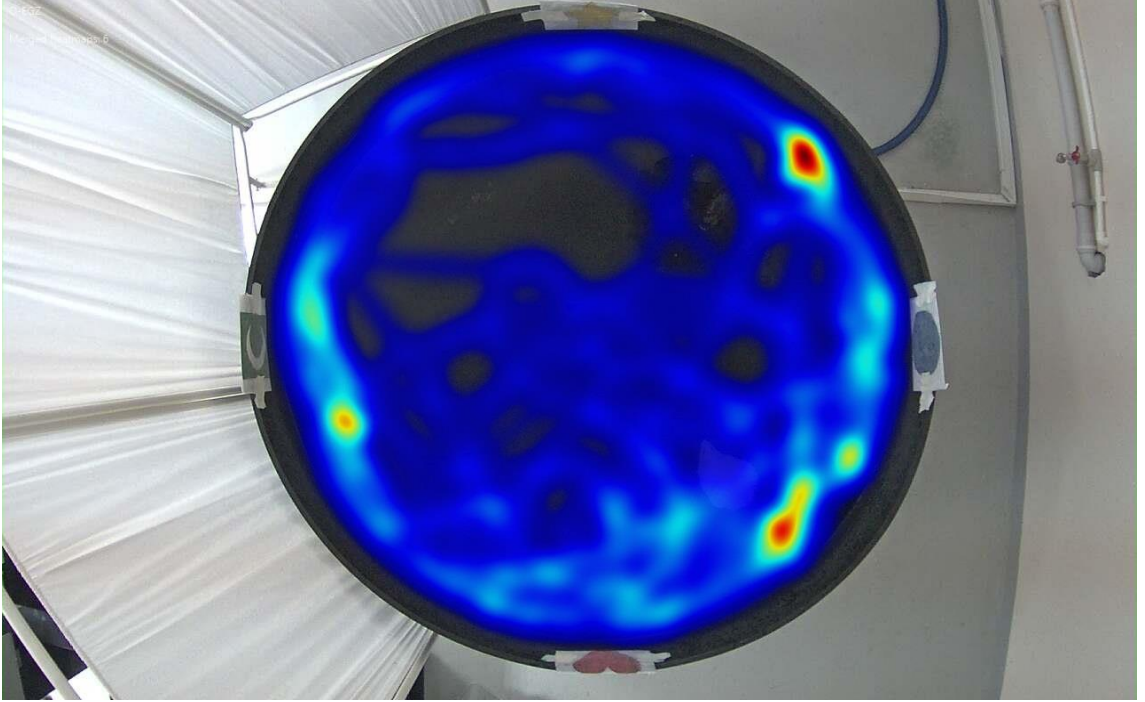
Probe denemelerinde, Öğrenme deneylerinin tamamlandığı ilk 5 günü takiben, 6. gün platform bulunduğu yerden çıkarılarak, sıçanların platformu bulabilmek için izledikleri yol ve süreler takip edilmiştir. Sıcaklık haritaları (heatmap) termal kamera ve EthoVision programı yardımıyla her gruptaki hayvanların ayrı ayrı probe denemesi için atışları üst üste bindirilip eşleştirilerek elde edilmiştir. Gruplara ait elde edilmiş probe sıcaklık haritaları Şekil 4.16 – 4.22 arası sunulduğu gibidir. Elde edilmiş olan bu görüntüler çalışma hipotezini ve platforma kaçış süresi analiz sonuçlarını desteklemektedir.



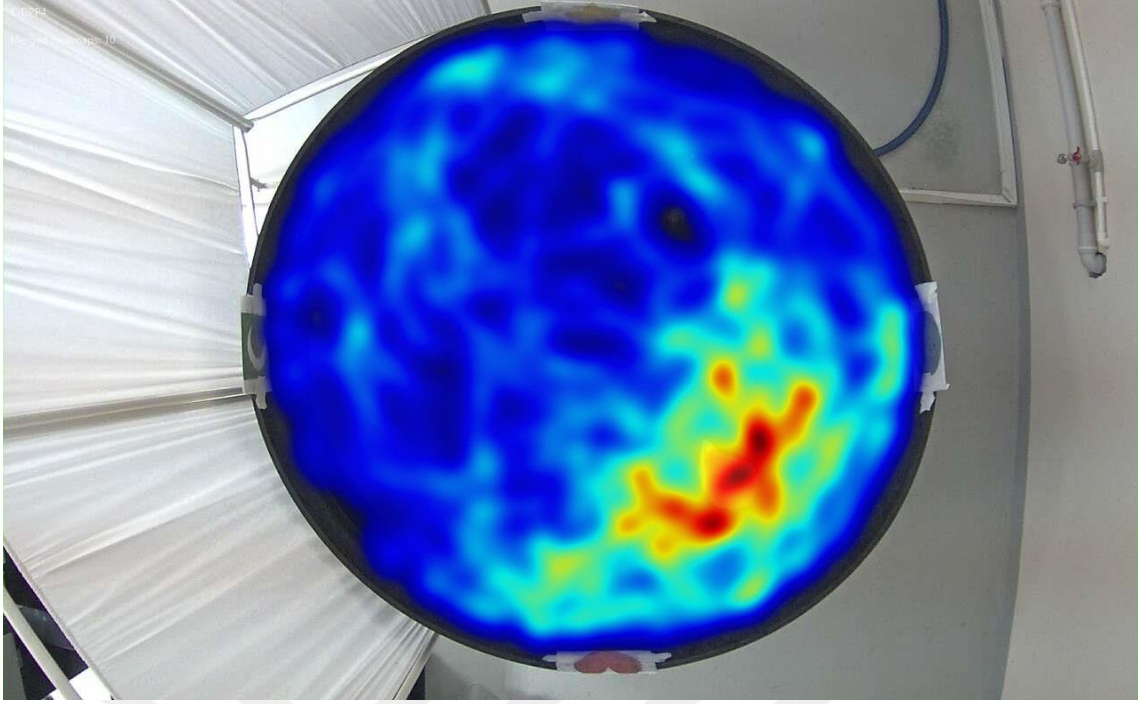
Şekil 4.16. Morris su tankında Kontrol Grubu probe deneme ısı haritası



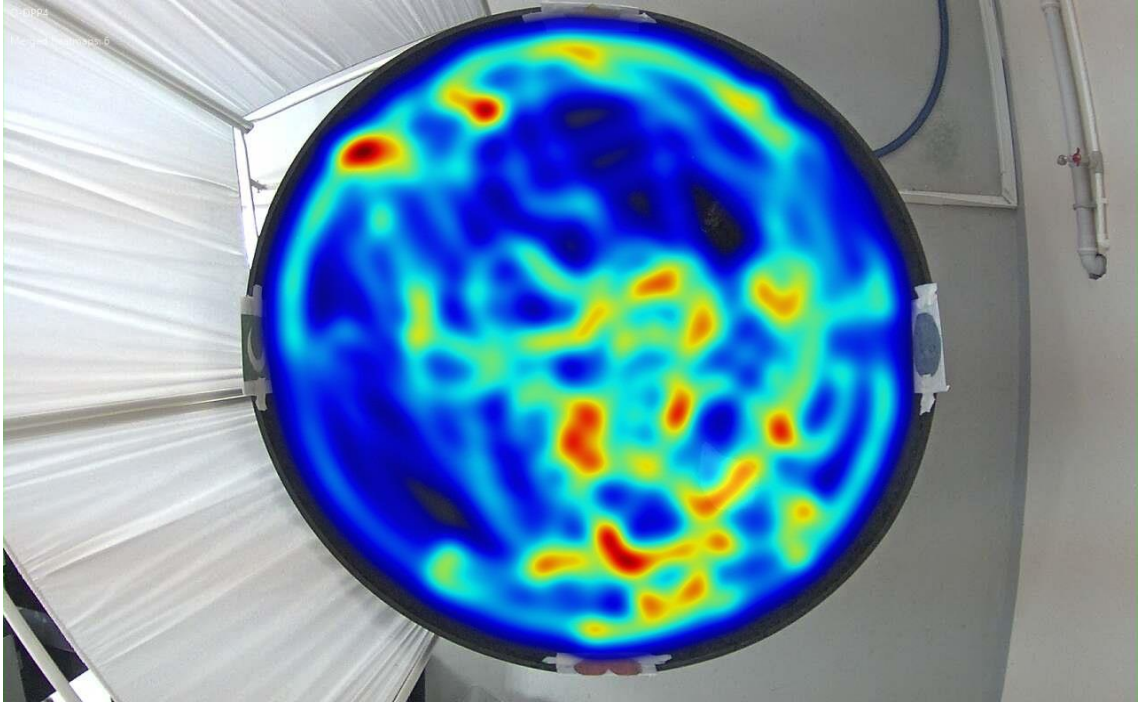
Şekil 4.17. Morris su tankında Kontrol+NaCl Grubu probe deneme ısı haritası



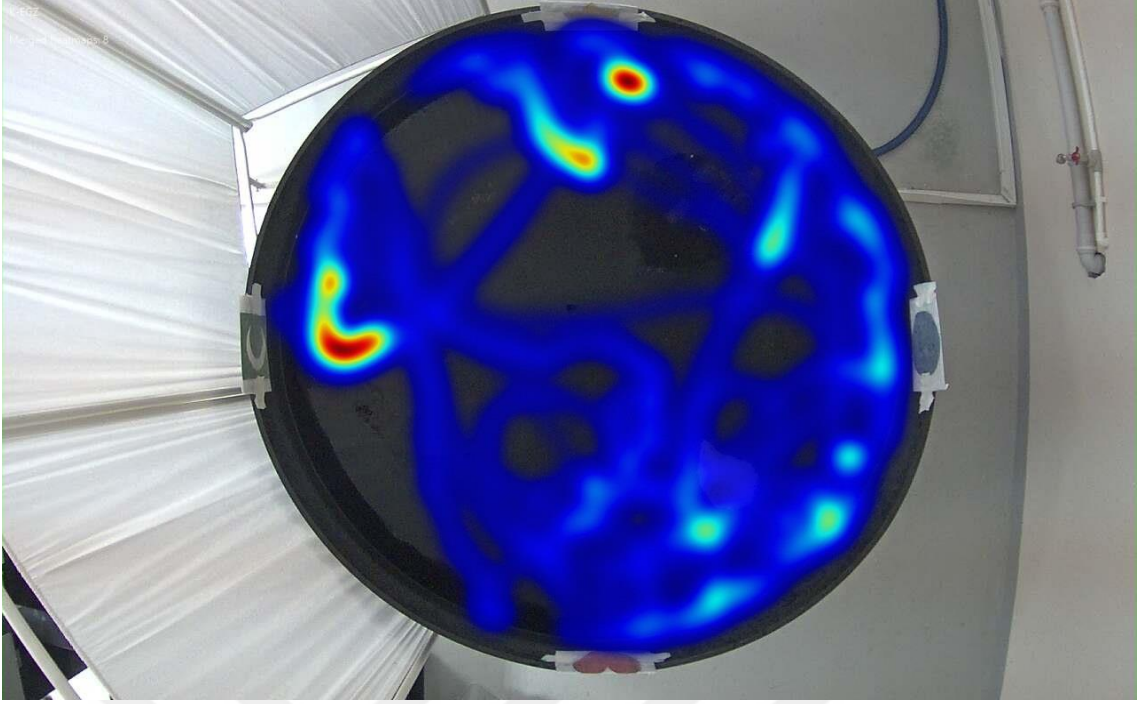
Şekil 4.18. Morris su tankında Obez Grubu probe deneme ısı haritası



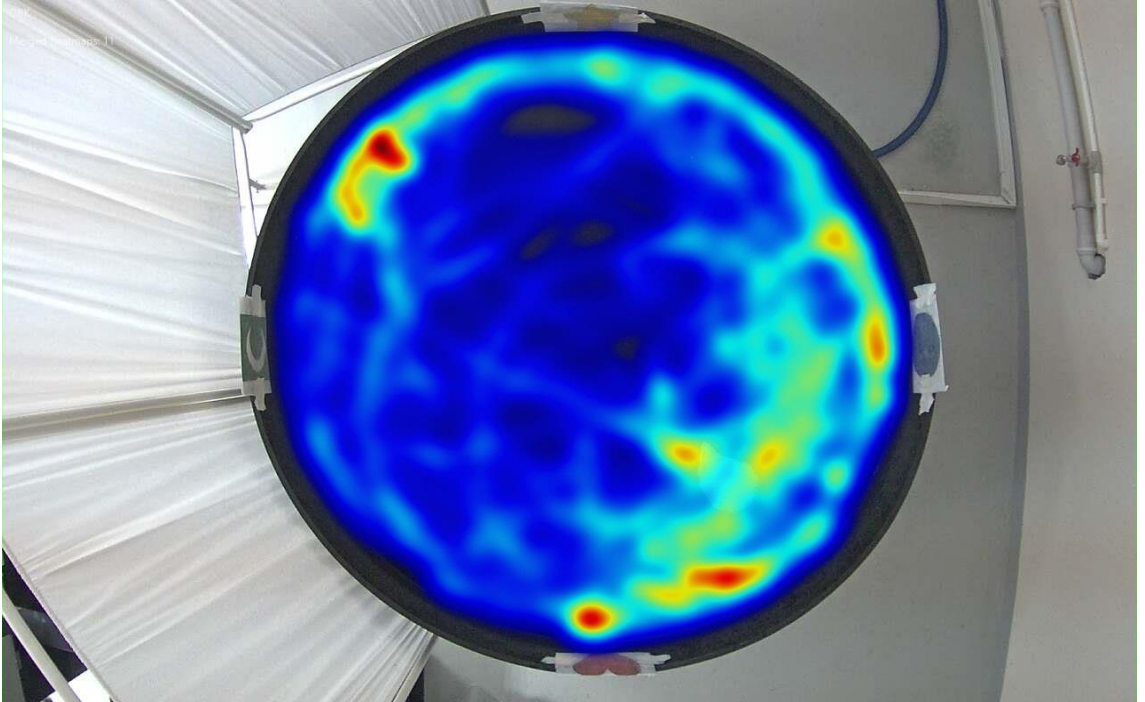
Şekil 4.19. Morris su tankında Kontrol+DPP4i Grubu probe deneme ısı haritası



Şekil 4.20. Morris su tankında Obez+DPP4i Grubu probe deneme ısı haritası



Şekil 4.21. Morris su tankında Kontrol+Egzersiz Grubu probe deneme ısı haritası



Şekil 4.22. Morris su tankında Obez+Egzersiz Grubu probe deneme ısı haritası

4.2. Moleküler Genetik Analiz Sonuçları

4.2.1. Hipokampus dokularında Syp gen ifade analizi sonuçları

Hayvan deneyleri çalışmaların son haftasında, anestezi altında çıkarılmış olan hipokampus dokularından total RNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen RNA'ların miktar tayinleri yapılarak 200 ng/μl' ye eşitlenip, ardından cDNA eldeleri gerçekleştirilmiştir. Sentez edilmiş olan cDNA'lardan qRT-PCR yöntemiyle gen ifadeleri tespit edilmiştir. Elde edilmiş sonuçlar, kat değişim oranları ve p değerleri dikkate alınarak, Qiagen veri analiz sistemi kullanılarak ve student t testi baz alınarak analiz edilmiştir.

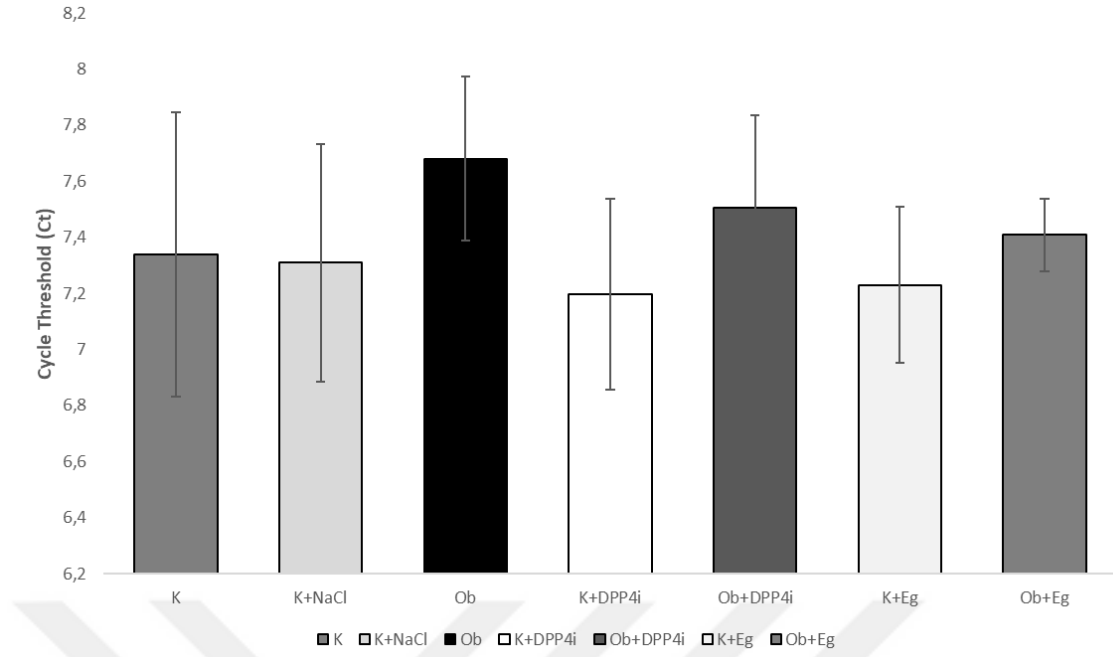
Tablo 4.6. Hipokampus dokusunda gruptaki Syp genine ait kat değişimleri

	Kat Değişimi	p Değeri
K+NaCl	0,9201	0,4672
Ob	0,8504	0,3620
K+DPP4i	1,1226	0,8249
Ob+DPP4i	0,8647	0,2358
K+Eg	1,1138	0,9262
Ob+Eg	1,0927	0,9032

Normalizasyon için Housekeeping gen olarak GAPDH kullanılmıştır.

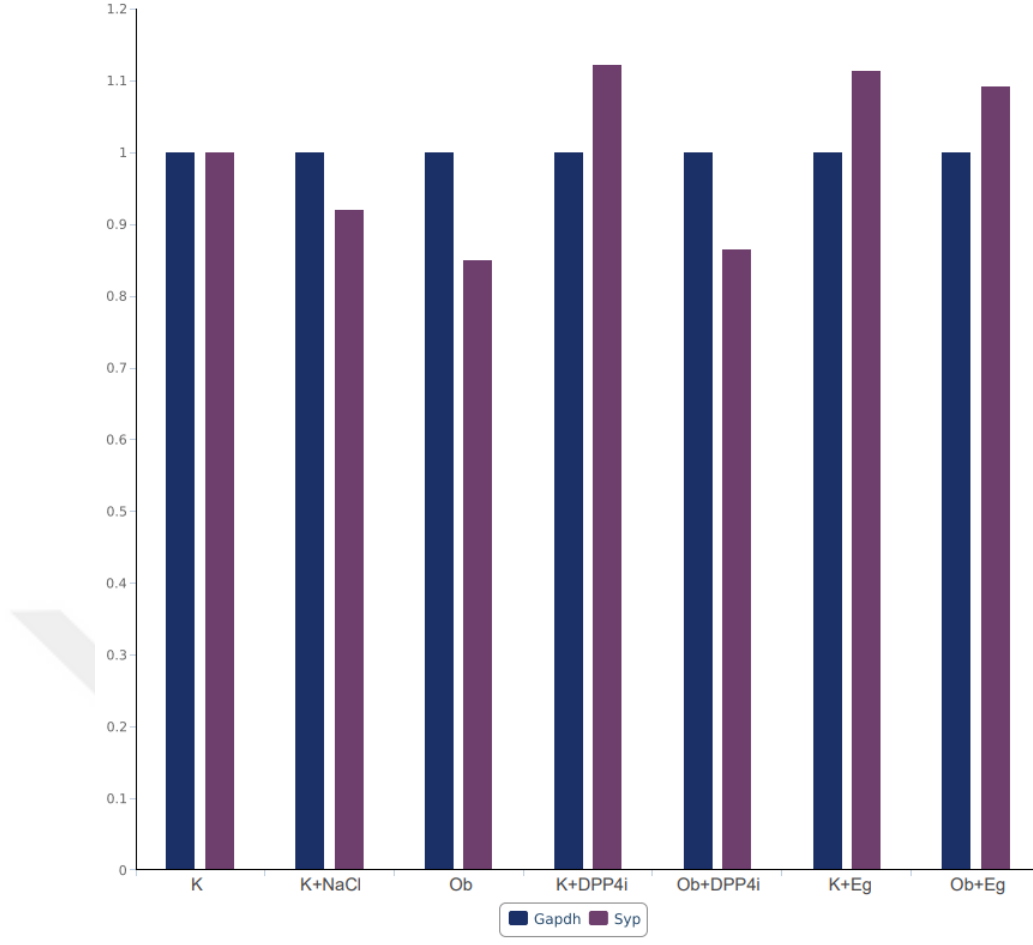
K+NaCl serum fizyolojik verilen kontrol grubu, Ob obez grubu, K+DPP4i DPP4i inhibitörü verilen kontrol grubu, Ob+DPP4i DPP4i inhibitörü verilen obez grubu, K+Eg egzersiz uygulanan kontrol grubu, Ob+Eg egzersiz uygulanan obez grubu temsil etmektedir.

Kontrol grubuna kıyasla K+NaCl, Ob, K+DPP4i, Ob+DPP4i, K+Eg ve Ob+Eg gruplarında, istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır ($p>0,05$).



Şekil 4.23. Gruplara ait Syp geni ortalama delta CT değerleri grafiği

K kontrol grubu, K+NaCl serum fizyolojik verilen kontrol grubu, Ob obez grubu, K+DPP4i DPP4i inhibitörü verilen kontrol grubu, Ob+DPP4i DPP4i inhibitörü verilen obez grubu, K+Eg egzersiz uygulanan kontrol grubu, Ob+Eg egzersiz uygulanan obez grubu temsil etmektedir.

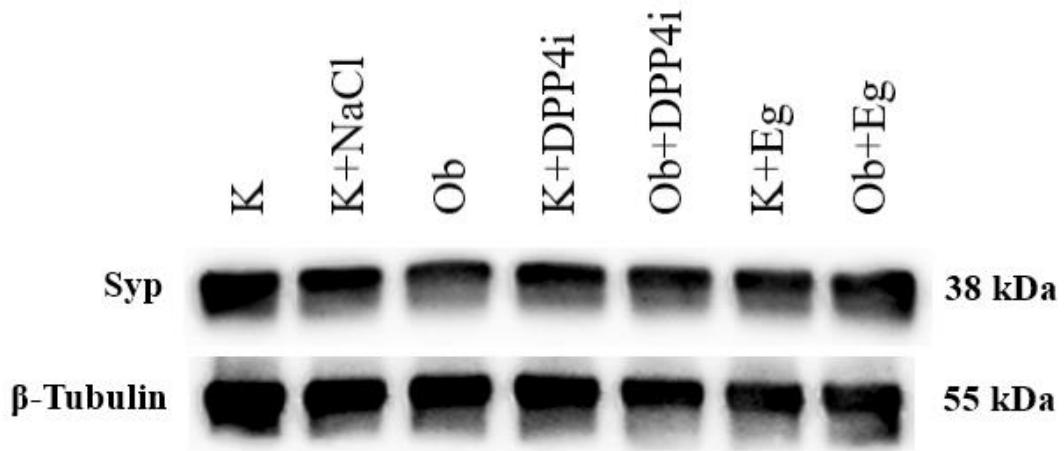


Şekil 4.24. Gruplara ait Syp geni ortalama kat değişim değerleri grafiği

K kontrol grubu, K+NaCl serum fizyolojik verilen kontrol grubu, Ob obez grubu, K+DPP4i DPP4i inhibitörü verilen kontrol grubu, Ob+DPP4i DPP4i inhibitörü verilen obez grubu, K+Eg egzersiz uygulanan kontrol grubu, Ob+Eg egzersiz uygulanan obez grubu temsil etmektedir.

4.2.2. Hipokampus dokularında Syp protein ifade analizi sonuçları

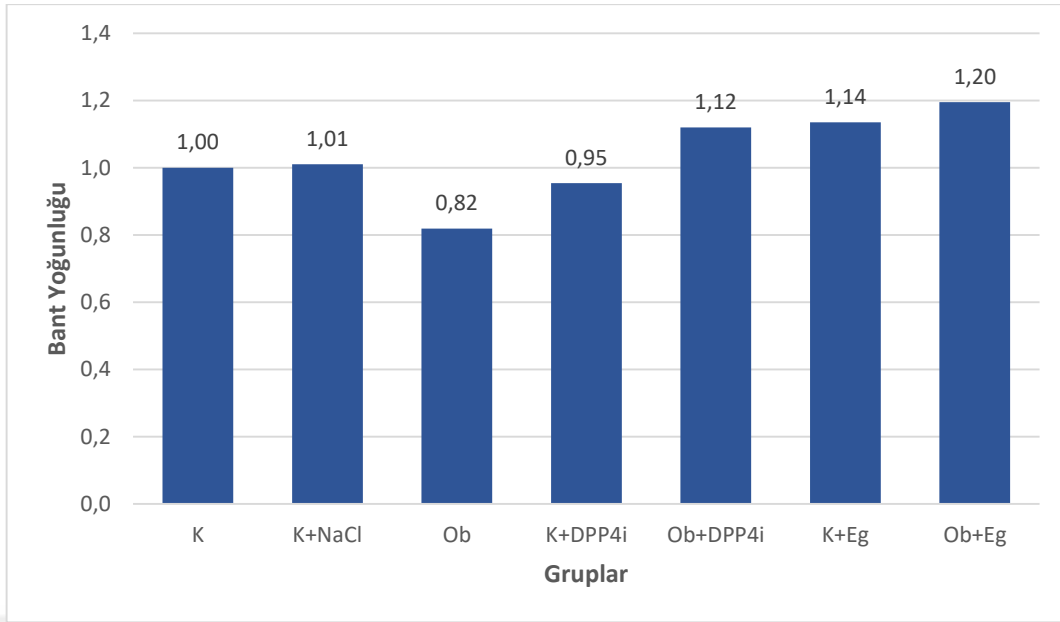
Western Blot yöntemi ile bant görüntüleri elde edilmiş olan Syp protein düzeyinde, Kontrol grubuna kıyasla Obez grupta belirgin bir azalma gözlenmiştir. Obez tedavi gruplarında, obez gruba kıyasla artış gözlenmiştir. Çalışmanın hipotezine uygun olarak, öğrenme bellek performansı gerilediği görülen obez grupta, kontrol grubuna kıyasla sinaptofizin protein düzeylerinde azalmalar saptanmıştır (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. Gruplara ait Syp protein düzeylerinin western blot görüntüleri

Yükleme kontrolü için Housekeeping protein olarak β -Tubulin kullanılmıştır.

K kontrol grubu, K+NaCl serum fizyolojik verilen kontrol grubu, Ob obez grubu, K+DPP4i DPP4i inhibitörü verilen kontrol grubu, Ob+DPP4i DPP4i inhibitörü verilen obez grubu, K+Eg egzersiz uygulanan kontrol grubu, Ob+Eg egzersiz uygulanan obez grubu temsil etmektedir.



Şekil 4.26. Gruplara ait Syp protein düzeylerinin dansitometrik analizi sonrası ortalama bant yoğunluğu grafiği

Normalizasyon için Housekeeping protein olarak β -Tubulin kullanılmıştır.

K kontrol grubu, K+NaCl serum fizyolojik verilen kontrol grubu, Ob obez grubu, K+DPP4i DPP4i inhibitörü verilen kontrol grubu, Ob+DPP4i DPP4i inhibitörü verilen obez grubu, K+Eg egzersiz uygulanan kontrol grubu, Ob+Eg egzersiz uygulanan obez grubu temsil etmektedir.

Image J yazılımı ile dansitometrik ölçümleri gerçekleştirilen Syp protein düzeyinde, Kontrol grubuna kıyasla Obez grupta belirgin bir azalma gözlenmiştir (Şekil 4.26). Obez tedavi gruplarında, obez gruba kıyasla artış gözlenmiştir. Kontrol tedavi gruplarında ise grupların dansitometrik analizleri ortalamalarına göre, Kontrol grubuna kıyasla artışlar tespit edilmiştir. Çalışmanın hipotezine uygun olarak, öğrenme bellek performansı gerilediği görülen obez grupta, kontrol grubuna kıyasla sinaptofizin protein düzeylerinde azalmalar saptanmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı bir değişim saptanmamıştır ($p=0,274$).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Obezite, enerji homeostazının merkezi düzensizliğine bağlı çok faktörlü bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (223). Obezite, bir bireyin kanser, felç, metabolik hastalık, kalp yetmezliği ve diğer kardiyovasküler rahatsızlık riskini artırmasıyla ön plana çıkmakla beraber, insidansının ve prevalansının azaltılması gerekliliği de önem arz etmektedir (224).

Obez bireylerin beyin sinir mimarisinde önemli yapısal değişiklikler rapor edilmiştir. Örneğin, yüksek VKİ, yaş ve morbiditeden bağımsız olarak beyin hacminin azalmasıyla bağlantılıdır. Artmış VKİ'nin ayrıca temporal, frontal ve oksipital kortekslerde, hipokampusta, talamusta ve orta beyinde gri madde atrofisi ve beyindeki beyaz maddelerin bütünlüğünün azalması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (225). Obezite ve bilişsel sağlık arasındaki ilişki giderek daha fazla kabul ve ilgi görmektedir. Yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular, erken ile orta yetişkin obezitenin, bilişsel performans üzerinde direk ve oldukça zararlı bir etkisi olabileceğini düşündürmektedir (225).

Bu çalışmada; DPP4 inhibitörleri ve egzersizin obezite tedavisindeki etkileri ile obezitede gerilediği bilinen bilişsel fonksiyonlar ve bu fonksiyonları etkilediği düşünülen sinaptofizin molekülü obez sıçan modelinde analiz edilmiştir. Araştırmada obezitede bilişsel fonksiyonlardaki değişimlerin bir veziküler protein olan sinaptofizin molekülü ile olan ilişkisinin aydınlatılması ve obezitede DPP4 inhibitörü ve egzersiz tedavilerinin etkilerinin karşılaştırmalı olarak ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Literatürde böyle bir çalışma bulunmamakla birlikte buradaki asıl amaç, tüm bu veriler ve karşılaştırmalı analizlerden yola çıkılarak, obezite tedavisinde yeni ve etkin bir tedavi yöntemi sunabilmek, aynı zamanda obezitenin, non-farmakolojik ve farmakolojik obezite tedavisinin öğrenme üzerindeki etkileri ve bu öğrenme düzeyleriyle sinaptofizin molekülünün ilişkilendirilip, bu molekülün obez bireylerde bilişsel fonksiyonlardaki değişimlerin bir belirteci olarak kullanılabilmesini hedeflemektedir. Bu doğrultulardan hareketle, kontrol, kontrol + NaCl, obez, kontrol + DPP4i, obez + DPP4i, kontrol + egzersiz, obez + egzersiz gruplarında ağırlık ve kan glikoz seviyeleri ölçümleri düzenli olarak tespit edilip, uzamsal bellek ve öğrenme performansına dayalı bilişsel fonksiyonlar Morris su tankı öğrenme modeli kullanılarak değerlendirilmiştir. Bütün gruplarda izole edilen hipokampus dokularında Syp geninin mRNA ve protein ifade düzeyleri ile DPP4

inhibitörlerinin ve egzersizin etkileri, karşılaştırmalı olarak öğrenme düzeyleri ile ilişkilendirilmiştir.

Çalışmamıza ilk haftadan itibaren 42 adet Wistar albino sıçan dahil edilmiş, rastgele 24 sıçan kontrol grupları olarak ayrılmış ve normal yem ile beslenmiş, geriye kalan 18 sıçan ise %60'ı yağ kalorili HFD ile beslenmiştir. İlk 8 hafta boyunca bu şekilde beslenmeye devam etmiş ve sekizinci haftanın sonunda alınan ağırlık ölçümleri sonucu, Lee indeksine göre yapılan hesaplamalar doğrultusunda 0,3 değerinin üzerine obez olması planlanmış olan tüm hayvanların çıktığı görülmüştür. Normal yem ile beslenen hayvanlar ise 0,3 değerinin altında tespit edilmiştir. Hayvanlarda sekizinci hafta obezite modelinin oluşturulmasın ardından obez gruplara ait 18 sıçan; obez, obez + DPP4i, obez + egzersiz grupları olmak üzere 3 gruba eşit sayıda dağıtılarak ayrı ayrı kafeslere alınmıştır (n=6). Kontrol gruplarına ait 24 sıçan ise; kontrol, kontrol + NaCl, kontrol + DPP4i, kontrol + egzersiz grupları olmak üzere 4 gruba eşit sayıda dağıtılarak ayrı kafeslere alınmıştır (n=6).

HFD ile yapılan çalışmalara göz atıldığında, yağın kalorisi farketmeksizin, 5 ila 16 hafta süren HFD uygulamaları göze çarpmaktadır (219, 226). HFD'nin uygulanma süresi ile vücut ağırlığı arasında doğru orantı olduğu ortaya konmuştur (219).

Obeziteyi tedavi etme amacıyla kontrol + egzersiz ve obez + egzersiz grubundaki hayvanlara, obezite teşhisi konulmasını takip eden çalışmanın 9. haftasından itibaren, hayvan çalışmasının tamamlanacağı 16. Haftanın sonuna kadar, günlük 60 dakika yüzme egzersizi uygulandı. Yine aynı amaçla, kontrol + DPP4i ve obez + DPP4i grubundaki hayvanlara obezite teşhisi konulmasının ardından, ikinci sekiz hafta boyunca günlük hayvan başına 50 mg/kg sitagliptin tedavisi uygulandı. Obez grup ve obez + DPP4i grupları kıyaslandığında, çalışma sonunda obez + DPP4i grubunda kilo artışının daha az olduğu belirlendi. Benzer şekilde kontrol, kontrol + NaCl ve kontrol + DPP4i grupları kıyaslanarak incelendiğinde DPP4 inhibitörü uygulanmış kontrol grubunda, kilo artışının yavaşladığı saptandı. Obez grup ve obez + egzersiz grupları kıyaslandığında, çalışma sonunda obez + egzersiz grubunun ağırlık artışının obez gruba göre daha az olduğu belirlendi. Yine kontrol grubuna kıyasla, kontrol + egzersiz grubundaki ağırlık artışı seviyesinin daha düşük olduğu saptandı. Çalışmamıza benzer olarak, Baek ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, hayvanlara 6 hafta süreyle koşu bandı yöntemi ile egzersiz uygulanmış, bunun sonucunda obez gruptaki ağırlık artışının, obez + egzersiz grubundaki

hayvanların ağırlık artışından fazla olduğu gösterilmiştir (227). Yine çalışmamıza benzer olarak, Touati ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, deney hayvanları bu kez 12 hafta egzersiz uygulamasına tabi tutulmuş, bunun sonucunda HFD ile beslenmiş olan gruptaki ağırlık artışının, HFD ile beslenmiş ve egzersiz uygulanmış grubun ağırlık artışına kıyasla daha yüksek seviyelerde olduğu gösterilmiştir (228). Bizim çalışma sonuçlarımız da bu verileri destekler niteliktedir.

Çalışmamızın hayvan deneyleri kısmının, on altıncı ve son haftası olan bitiş periyodunda, tüm gruplara MWM ile uzamsal bellek testi uygulandı. Bu öğrenme ve bellek testinin sonuçlarına göre, HFD ile oluşturulmuş obez grup ile kıyaslandığında, DPP4 inhibitörü sitagliptin ile tedavi edilmiş olan obez + DPP4i grubunun ortalama platforma kaçış sürelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış saptanmıştır. Yine alternatif tedavi yöntemi olarak yüzme egzersizi uygulanmayan obez grubu ile egzersiz uygulanmış obez + egzersiz grubu arasında istatistiksel anlamlı bir fark tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre kognitif performans üzerine DPP4 inhibitörü, obeziteyi tedavi edici yönü kabul edilmiş olan egzersiz kadar olumlu sonuçlar göstermiştir. Çalışma sonuçlarımıza benzer olarak, Pintana ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, araştırmaya dahil edilen sıçanlara normal diyet ve HFD ile 12 hafta boyunca verilir, 21 gün boyunca da DPP4 inhibitörleri sitagliptin ve vildagliptin tedavisi uygulanmıştır. Çalışmanın öğrenme ve bellek performansları MWM ile tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre, hem sitagliptin hem de vildagliptinin HFD ile oluşturulmuş gruplardaki sıçanlarda, öğrenme ve bellek sonuçlarını birbirine yakın derecede iyileştirdiğini ortaya koyarak, bilişsel performansa olumlu katkılarını ve bunların yanından mitokondriyal fonksiyonu da tamamen eski haline getirdiğini göstermiştir (7). Sa-nguanmoo ve arkadaşlarının yakın zamanda yapmış olduğu çalışmada, sıçanlar 16 hafta boyunca normal diyet ve HFD ile beslenmiştir. Çalışmanın 13. Haftasından itibaren, adipositlerde glikoz alımının güçlü bir metabolik düzenleyicisi olan fibroblast büyüme faktörü 21 (FGF21) ve DPP4 inhibitörü vildagliptin ile ayrı gruplarda tedavi protokolleri uygulanmış ve bilişsel performansa etkileri MWM ile test edilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre FGF21 ve vildagliptinin, periferik insülin direncini iyileştirmede, oksidatif stresi azaltmada, beyin mitokondriyal disfonksiyonu ile beyin hücresi apoptozunu azaltmada ve çalışmamızla da ortak noktalarından bilişsel gerilemenin önlenmesinde benzer sonuçlara ulaşılmıştır (229). Lee ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmada, HFD ile 8 hafta süreyle beslenen hayvanların kognitif performansları MWM ile test edilmiştir. Çalışmada kontrol, egzersiz

ve HFD grubu olarak üç grupta çalışılan sıçanların ortalama platforma kaçış sürelerinin, kontrol grubuna kıyasla, HFD grubunda daha uzun olduğu gösterilmiştir (230). Yine Pathan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, sıçanlar normal yem ve HFD grubu şeklinde iki gruba ayrılarak, HFD ile 5 hafta beslenmiş, ardından MWM ile uzamsal bellek testi uygulanmıştır. HFD ile beslenen grupta ortalama platforma kaçış süreleri, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı biçimde daha yavaş olarak tespit edilmiştir (231). Molteni ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada, deney hayvanları normal yem ve HFD ile dört hafta süreyle beslenmiş, aynı zamanda her iki gruba da koşu egzersizi uygulanmıştır. Çalışma sonucunda egzersizin ortalama platforma kaçış sürelerini azalttığı, HFD'nin ise bu süreleri arttırdığı gösterilmiştir (232). Ek olarak Woo ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise, deney hayvanlarına 13 hafta süreyle HFD uygulanarak obezite oluşturulmuş, koşu bandı egzersizi ise obeziteyi tedavi etmek amacıyla haftada beş gün, ilk dört hafta 40 dakika, ikinci dört hafta ise 60 dakika süreyle uygulanmıştır. Tedavi uygulamalarının ardından çalışma sonunda, bellek testi uygulanmıştır. Bellek performansları sonucunda, HFD ile oluşturulmuş obez grupta ortalama platforma kaçış süresi, normal diyet ve HFD egzersiz gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla bulunmuştur (233). Literatürdeki benzer çalışma sonuçları incelendiğinde, çalışma sonuçlarımızla uyumlu olarak, obezitenin kognitif performansı olumsuz yönde etkilediği, DPP4 inhibitörleri ve egzersiz tedavilerinin kognitif performansa olumlu yönde katkı sağladığı ortaya konulmuştur.

Obeziteye bağlı olarak gelişen bilişsel performans değişikliklerinin, DPP4 inhibitörü sitagliptin ve egzersiz tedavileri etkisiyle bilişsel performansa etkilerinin moleküler düzeyde daha iyi ortaya çıkarılabilmesi amacıyla, çalışmada yer alan deney gruplarındaki hayvanların tamamına ait hipokampus dokuları izole edildi. Elde edilen bu hipokampus dokularından, öğrenme ve bellek performansının moleküler düzeyde Syp geninin mRNA ve protein düzeylerinde tespit edilmesi sağlanmıştır. Öğrenme ve bellek ile bağlantılı anahtar genlerden biri sayılabilecek Syp ifadesine etki edebilecek temel mekanizmalar incelendi. Syp, nörotransmitterlerin verimli depolanmasında yer alan önemli bir sinaptik vezikül proteindir (221). Çalışmamızdaki Syp geni mRNA ifadesi sonuçlarına bakıldığında, Kontrol gruba kıyasla HFD ile oluşturulmuş obez grubunda bir azalma görülmüştür. Yine kontrol grubuna kıyasla, kontrol + DPP4i grubu Syp mRNA ifadesinde bir artış gözlenmiştir. Obez + DPP4i grubunda ise Syp düzeylerinde azalma saptanmıştır. Her iki egzersiz grubunda ise kontrol gruba kıyasla, bu genin mRNA düzeylerinde artışlar

göze çarpmaktadır. Sonuç itibariyle çalışmamızdaki qRT-PCR sonuçları, Syp geni mRNA ifade düzeyinde en fazla azalmanın obez grubunda olduğunu göstermiştir. Çalışma sonuçlarımıza benzer olarak, Gault ve arkadaşlarının çalışmasında fareler, HFD, HFD + sitagliptin ve kontrol + NaCl gruplarına ayrılmış, 21 gün boyunca beslenmiş ve ilaç tedavisine maruz bırakılmıştır. 21 günün sonunda hayvanların hipokampus dokuları elde edilerek Syp mRNA ifade düzeyleri incelenmiştir. Bunun sonucunda sitagliptinin, Syp'nin hipokampal gen ekspresyonunu önemli ölçüde arttırdığı gözlemlenmiş, bu proteinin ekspresyonunun ve biyolojik fonksiyonunun sitagliptin tarafından indüklenen bilişsel performansın iyileştirilmesinde önemli bir faktör olabileceği düşünülmüştür (221).

Syp protein ifadesi sonuçlarına bakıldığında, mRNA sonuçlarına benzer şekilde, kontrol grubuna kıyasla obez gruptaki protein yoğunluklarında azalma meydana gelmiştir. Yine mRNA sonuçlarına benzer olarak, egzersiz uygulamasını içeren kontrol + egzersiz ve obez + egzersiz gruplarındaki Syp protein ifade düzeylerinde, kontrol grup ile kıyaslandığında artışlar meydana geldiği görülmüştür. mRNA düzeyindeki ifade analizi sonuçlarından farklı olarak obez + DPP4i grubunda Syp protein düzeylerinde artış meydana gelmiştir. Benzer şekilde obez + egzersiz grubundaki Syp protein ifadesindeki artış göze çarpmaktadır. HFD ile oluşturulmuş her iki obez tedavi grubundaki bu artış dikkat çekmektedir. Bu sonuçlar obez sıçanlarda, 8 haftalık tedavi uygulamaları sonrası Syp proteini düzeyinde artışlar meydana geldiğini ortaya koymuştur. Çalışma hipotezimizi tam olarak karşılar nitelikte literatürde çalışma bulunmamasıyla birlikte, Zhang ve arkadaşlarının yakın zamanda yapmış oldukları çalışmada, erkek Sprague-Dawley sıçanlarda iskemik inme modelinin bilişsel bozulmalara olan etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada bellek gibi bilişsel performans bozukluklarının değerlendirilmesinde MWM kullanılmış, hipokampal dokuda Syp protein düzeyleri, çalışmamızdan farklı olarak mRNA düzeyleri incelenmeden, sadece western blot yöntemi ile tespit edilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre iskemik inme sonrası azaldığı gösterilen bilişsel performans bulgularının yanı sıra, bellek kaybına uğradığı gösterilen bu deney gruplarında Syp proteini ifadesinin önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (234). Bu çalışmanın sonuçları da bizim çalışmamızın ilgili bulgularına benzer nitelik taşımaktadır.

Bu tez çalışmasının sonucunda,

- Öğrenme, bellek performansı sonuçlarından hareketle HFD ile oluşturulmuş obezitede uzamsal bellek gibi bilişsel performanslarda bozulmaların ortaya çıktığı tespit edilmiştir.
- Obeziteyi ve obeziteye bağlı hastalıkları tedavi etme amacıyla uygulanan DPP4 inhibitörü sitagliptin ve egzersiz tedavilerinin, kilo alımını yavaşlatması veya geriletmesinin yanısıra, bu tedavilerin bilişsel performans üzerinde olumlu etkileri olduğu saptanmıştır.
- DPP4 inhibitörü ve egzersiz uygulanmış olan gruplarda, öğrenme bellek testleri sonuçlarında ve bu sonuçlara paralel olarak Syp geninde mRNA ve protein ifade düzeylerinde artışlar meydana geldiği ortaya konmuştur.

Çalışma sonuçlarımız, dünyada sağlık problemlerinin en önemli sebeplerinin merkezinde olmaya giderek yaklaşan obezitenin, düşük maliyetli ve invaziv olmayan alternatif yöntemlerle tedavi edilebilmesi ve obezitenin yol açtığı bilişsel performans bozukluklarının moleküler düzeyde aydınlatılabilmesi açısından önem arz etmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Ghosh S, Sinha JK, Raghunath M. 'Obesageing': Linking obesity & ageing. The Indian journal of medical research. 2019;149(5):610.
2. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. Nature. 2000;404(6778):635-43.
3. Chooi YC, Ding C, Magkos F. The epidemiology of obesity. Metabolism. 2019;92:6-10.
4. Nimptsch K, Konigorski S, Pischon T. Diagnosis of obesity and use of obesity biomarkers in science and clinical medicine. Metabolism. 2019;92:61-70.
5. Burcelin R, Gourdy P. Harnessing glucagon-like peptide-1 receptor agonists for the pharmacological treatment of overweight and obesity. Obesity Reviews. 2017;18(1):86-98.
6. Herman GA, Bergman A, Liu F, Stevens C, Wang AQ, Zeng W, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamic effects of the oral DPP-4 inhibitor sitagliptin in middle-aged obese subjects. The Journal of Clinical Pharmacology. 2006;46(8):876-86.
7. Pintana H, Apaijai N, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. DPP-4 inhibitors improve cognition and brain mitochondrial function of insulin-resistant rats. J Endocrinol. 2013;218(1):1-11.
8. Dishman RK, Berthoud HR, Booth FW, Cotman CW, Edgerton VR, Fleshner MR, et al. Neurobiology of exercise. Obesity. 2006;14(3):345-56.
9. Daly C, Sugimori M, Moreira JE, Ziff EB, Llinás R. Synaptophysin regulates clathrin-independent endocytosis of synaptic vesicles. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2000;97(11):6120-5.
10. Leube RE, Kaiser P, Seiter A, Zimbelmann R, Franke WW, Rehm H, et al. Synaptophysin: molecular organization and mRNA expression as determined from cloned cDNA. The EMBO Journal. 1987;6(11):3261-8.
11. Thiele C, Hannah MJ, Fahrenholz F, Huttner WB. Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. Nature cell biology. 2000;2(1):42-9.
12. Nimptsch K, Pischon T. Body fatness, related biomarkers and cancer risk: an epidemiological perspective. Hormone molecular biology and clinical investigation. 2015;22(2):39-51.

13. Collaboration PS. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *The Lancet*. 2009;373(9669):1083-96.
14. Haslam DW, James WP. Obesity. *Lancet* (London, England). 2005;366(9492):1197-209.
15. Poulain M, Doucet M, Major GC, Drapeau V, Sériès F, Boulet L-P, et al. The effect of obesity on chronic respiratory diseases: pathophysiology and therapeutic strategies. *Cmaj*. 2006;174(9):1293-9.
16. Pischon T. Use of obesity biomarkers in cardiovascular epidemiology. *Disease markers*. 2009;26(5, 6):247-63.
17. Organization WH. Obesity: preventing and managing the global epidemic: World Health Organization; 2000.
18. Williams EP, Mesidor M, Winters K, Dubbert PM, Wyatt SB. Overweight and obesity: prevalence, consequences, and causes of a growing public health problem. *Current obesity reports*. 2015;4(3):363-70.
19. Jensen MD, Ryan DH, Apovian CM, Ard JD, Comuzzie AG, Donato KA, et al. 2013 AHA/ACC/TOS guideline for the management of overweight and obesity in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and The Obesity Society. *Journal of the American college of cardiology*. 2014;63(25 Part B):2985-3023.
20. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The lancet*. 2014;384(9945):766-81.
21. Arroyo-Johnson C, Mincey KD. Obesity epidemiology worldwide. *Gastroenterology Clinics*. 2016;45(4):571-9.
22. Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, McPherson K, Finegood DT, Moodie ML, et al. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *The Lancet*. 2011;378(9793):804-14.
23. Ng SW, Popkin BM. Time use and physical activity: a shift away from movement across the globe. *Obesity reviews*. 2012;13(8):659-80.
24. Ladabaum U, Mannalithara A, Myer PA, Singh G. Obesity, abdominal obesity, physical activity, and caloric intake in US adults: 1988 to 2010. *The American journal of medicine*. 2014;127(8):717-27. e12.

25. Bülbül S. Exercise in the treatment of childhood obesity. *Turkish Archives of Pediatrics/Türk Pediatri Arşivi*. 2020;55(1):2.
26. Grundy SM. Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004;89(6):2595-600.
27. Seidell JC. Epidemiology—definition and classification of obesity. *Clinical obesity in adults and children*. 2005:3-11.
28. Dentali F, Squizzato A, Ageno W, editors. *The metabolic syndrome as a risk factor for venous and arterial thrombosis. Seminars in thrombosis and hemostasis*; 2009: © Thieme Medical Publishers.
29. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(7):1793-801.
30. Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology*. 2007;132(6):2169-80.
31. Bray GA. Medical consequences of obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004;89(6):2583-9.
32. Caci G, Albin A, Malerba M, Noonan DM, Pochetti P, Polosa R. COVID-19 and obesity: dangerous liaisons. *Journal of clinical medicine*. 2020;9(8):2511.
33. Stefan N, Birkenfeld AL, Schulze MB, Ludwig DS. Obesity and impaired metabolic health in patients with COVID-19. *Nature Reviews Endocrinology*. 2020:1-2.
34. Prentice AM, Jebb SA. Obesity in Britain: gluttony or sloth? *Bmj*. 1995;311(7002):437-9.
35. Hill JO, Peters JC. Environmental contributions to the obesity epidemic. *Science*. 1998;280(5368):1371-4.
36. Lau DC, Douketis JD, Morrison KM, Hramiak IM, Sharma AM, Ur E. 2006 Canadian clinical practice guidelines on the management and prevention of obesity in adults and children [summary]. *Cmaj*. 2007;176(8):S1-S13.
37. Bleich SN, Cutler D, Murray C, Adams A. Why is the developed world obese? *Annual review of public health*. 2008;29.
38. James W. The fundamental drivers of the obesity epidemic. *Obesity reviews*. 2008;9:6-13.
39. Nestle M, Jacobson MF. Halting the obesity epidemic: a public health policy approach. *Public health reports*. 2000;115(1):12.
40. Drewnowski A, Specter SE. Poverty and obesity: the role of energy density and energy costs. *The American journal of clinical nutrition*. 2004;79(1):6-16.

41. Keith SW, Redden DT, Katzmarzyk PT, Boggiano MM, Hanlon EC, Benca RM, et al. Putative contributors to the secular increase in obesity: exploring the roads less traveled. *International journal of obesity*. 2006;30(11):1585-94.
42. Schwartz MW, Seeley RJ, Zeltser LM, Drewnowski A, Ravussin E, Redman LM, et al. Obesity pathogenesis: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine reviews*. 2017;38(4):267-96.
43. Allison DB, Fontaine KR, Manson JE, Stevens J, VanItallie TB. Annual deaths attributable to obesity in the United States. *Jama*. 1999;282(16):1530-8.
44. Barness LA, Opitz JM, Gilbert-Barness E. Obesity: genetic, molecular, and environmental aspects. *American journal of medical genetics part A*. 2007;143(24):3016-34.
45. Arnett DK, Blumenthal RS, Albert MA, Buroker AB, Goldberger ZD, Hahn EJ, et al. 2019 ACC/AHA guideline on the primary prevention of cardiovascular disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Journal of the American College of Cardiology*. 2019;74(10):e177-e232.
46. Tate DF, Jeffery RW, Sherwood NE, Wing RR. Long-term weight losses associated with prescription of higher physical activity goals. Are higher levels of physical activity protective against weight regain? *The American journal of clinical nutrition*. 2007;85(4):954-9.
47. Strychar I. Diet in the management of weight loss. *Cmaj*. 2006;174(1):56-63.
48. Yannakoulia M, Poulimeneas D, Mamalaki E, Anastasiou CA. Dietary modifications for weight loss and weight loss maintenance. *Metabolism*. 2019;92:153-62.
49. Heymsfield SB, Wadden TA. Mechanisms, pathophysiology, and management of obesity. *New England Journal of Medicine*. 2017;376(3):254-66.
50. Wolfe SM. When EMA and FDA decisions conflict: differences in patients or in regulation? *BMJ*. 2013;347:f5140.
51. Aschenbrenner DS. FDA Requests Withdrawal of Weight-Loss Drug From Market. *The Leading Voice of Nursing Since 1900| AJN*. 2020;120(5):22.
52. Wood S. Diet drug orlistat linked to kidney, pancreas injuries. *Medscape* Medscape News Retrieved. 2011;26.
53. Rucker D, Padwal R, Li SK, Curioni C, Lau DC. Long term pharmacotherapy for obesity and overweight: updated meta-analysis. *Bmj*. 2007;335(7631):1194-9.

54. Yanovski SZ, Yanovski JA. Long-term drug treatment for obesity: a systematic and clinical review. *Jama*. 2014;311(1):74-86.
55. Colquitt JL, Pickett K, Loveman E, Frampton GK. Surgery for weight loss in adults. *Cochrane database of systematic reviews*. 2014(8).
56. You A. Dietary Guidelines for Americans. US Department of Health and Human Services and US Department of Agriculture; 2015.
57. Obezite Tanı ve Tedavi Kılavuzu © Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği. 2019. ISBN: 978-605-4011-31-5 8. Baskı: Nisan 2019.
58. Yoshino M, Kayser BD, Yoshino J, Stein RI, Reeds D, Eagon JC, et al. Effects of diet versus gastric bypass on metabolic function in diabetes. *New England Journal of Medicine*. 2020;383(8):721-32.
59. Chang S-H, Stoll CR, Song J, Varela JE, Eagon CJ, Colditz GA. The effectiveness and risks of bariatric surgery: an updated systematic review and meta-analysis, 2003-2012. *JAMA surgery*. 2014;149(3):275-87.
60. Sjöström L, Narbro K, Sjöström CD, Karason K, Larsson B, Wedel H, et al. Effects of bariatric surgery on mortality in Swedish obese subjects. *New England journal of medicine*. 2007;357(8):741-52.
61. Peters A, Palay S, Webster H. *The Fine Structure of the Nervous System: The Cells and Their Processes*. New York: Oxford University Press; 1991.
62. Jahn R, Südhof TC. Synaptic vesicle traffic: rush hour in the nerve terminal. *Journal of neurochemistry*. 1993;61(1):12-21.
63. Brady S, Siegel G, Albers RW, Price D. *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*: Elsevier; 2005.
64. Abad-Rodríguez J, Díez-Revuelta N. Axon glycoprotein routing in nerve polarity, function, and repair. *Trends in biochemical sciences*. 2015;40(7):385-96.
65. Wiedenmann B, Franke WW. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell*. 1985;41(3):1017-28.
66. Tannenberg RK, Scott HL, Tannenberg AE, Dodd PR. Selective loss of synaptic proteins in Alzheimer's disease: Evidence for an increased severity with APOE ε4. *Neurochemistry international*. 2006;49(7):631-9.
67. Masliah E, Terry RD, Alford M, DeTeresa R. Quantitative immunohistochemistry of synaptophysin in human neocortex: an alternative method to estimate density of

presynaptic terminals in paraffin sections. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1990;38(6):837-44.

68. Schlaf G, Salje C, Poethke R, Felgenhauer K, Mader M. A novel enzyme-linked immunosorbent assay for determination of synaptophysin as compared with other quantification procedures. *Journal of neuroimmunology*. 1996;67(1):59-65.

69. Johnston P, Südhof T. The multisubunit structure of synaptophysin. Relationship between disulfide bonding and homo-oligomerization. *Journal of Biological Chemistry*. 1990;265(15):8869-73.

70. Hamos JE, DeGennaro LJ, Drachman DA. Synaptic loss in Alzheimer's disease and other dementias. *Neurology*. 1989;39(3):355-.

71. Masliah E, Terry RD, DeTeresa RM, Hansen LA. Immunohistochemical quantification of the synapse-related protein synaptophysin in Alzheimer disease. *Neuroscience letters*. 1989;103(2):234-9.

72. Honer WG, Dickson DW, Gleeson J, Davies P. Regional synaptic pathology in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*. 1992;13(3):375-82.

73. Lassmann H, Weiler R, Fischer P, Bancher C, Jellinger K, Floor E, et al. Synaptic pathology in Alzheimer's disease: immunological data for markers of synaptic and large dense-core vesicles. *Neuroscience*. 1992;46(1):1-8.

74. Reddy PH, Mani G, Park BS, Jacques J, Murdoch G, Whetsell Jr W, et al. Differential loss of synaptic proteins in Alzheimer's disease: implications for synaptic dysfunction. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2005;7(2):103-17.

75. Wheeler TC, Chin L-S, Li Y, Roudabush FL, Li L. Regulation of synaptophysin degradation by mammalian homologues of seven in absentia. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(12):10273-82.

76. Südhof T, Lottspeich F, Greengard P, Mehl E, Jahn R. The cDNA and derived amino acid sequences for rat and human synaptophysin. *Nucleic acids research*. 1987;15(22):9607.

77. SYP Geninin X Kromozomu Üzerindeki Lokasyonu, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SYP>, Erişim Tarihi: 15.12.2020.

78. SYP Geninin NCBI Veritabanında Gösterimi, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=6855>, Erişim Tarihi: 24.11.2020.

79. SYP Geninin Etkileşimde Olduğu Proteinler, <https://version11.string-db.org/cgi/network.pl?taskId=JV7M4gThBgxf>, Erişim Tarihi: 24.11.2020.

80. Calhoun ME, Jucker M, Martin LJ, Thinakaran G, Price DL, Mouton PR. Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses. *Journal of neurocytology*. 1996;25(1):821-8.
81. McMahon HT, Bolshakov VY, Janz R, Hammer RE, Siegelbaum SA, Südhof TC. Synaptophysin, a major synaptic vesicle protein, is not essential for neurotransmitter release. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996;93(10):4760-4.
82. Schmitt U, Tanimoto N, Seeliger M, Schaeffel F, Leube R. Detection of behavioral alterations and learning deficits in mice lacking synaptophysin. *Neuroscience*. 2009;162(2):234-43.
83. Tarpey PS, Smith R, Pleasance E, Whibley A, Edkins S, Hardy C, et al. A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation. *Nature genetics*. 2009;41(5):535-43.
84. Leong AS, Cooper K, Leong FJW. *Manual of diagnostic antibodies for immunohistology*: Cambridge University Press; 2003.
85. Kokotos AC, Harper CB, Marland JR, Smillie KJ, Cousin MA, Gordon SL. Synaptophysin sustains presynaptic performance by preserving vesicular synaptobrevin-II levels. *Journal of neurochemistry*. 2019;151(1):28-37.
86. Rajappa R, Gauthier-Kemper A, Böning D, Hüve J, Klingauf J. Synaptophysin 1 clears synaptobrevin 2 from the presynaptic active zone to prevent short-term depression. *Cell reports*. 2016;14(6):1369-81.
87. Lavian H, Korngreen A. Short-term depression shapes information transmission in a constitutively active GABAergic synapse. *Scientific reports*. 2019;9(1):1-15.
88. Wiedenmann B, Kuhn C, Schwechheimer K, Waldherr R, Raue F, Brandeis WE, et al. Synaptophysin identified in metastases of neuroendocrine tumors by immunocytochemistry and immunoblotting. *American journal of clinical pathology*. 1987;88(5):560-9.
89. Thomas L, Hartung K, Langosch D, Rehm H, Bamberg E, Franke WW, et al. Identification of synaptophysin as a hexameric channel protein of the synaptic vesicle membrane. *Science*. 1988;242(4881):1050-3.
90. Elrick H, Stimmler L, Hlad Jr C, Arai Y. Plasma insulin response to oral and intravenous glucose administration. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1964;24(10):1076-82.
91. Drucker DJ. The biology of incretin hormones. *Cell metabolism*. 2006;3(3):153-65.

92. Nauck M, Stöckmann F, Ebert R, Creutzfeldt W. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia*. 1986;29(1):46-52.
93. Vilsbøll T, Holst JJ. Incretins, insulin secretion and type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2004;47(3):357-66.
94. Holst JJ, Gromada J. Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*. 2004;287(2):E199-E206.
95. Deacon CF. What do we know about the secretion and degradation of incretin hormones? *Regulatory peptides*. 2005;128(2):117-24.
96. Deacon CF. Circulation and degradation of GIP and GLP-1. *Hormone and metabolic research*. 2004;36(11/12):761-5.
97. Holz G. New insights concerning the glucose-dependent insulin secretagogue action of glucagon-like peptide-1 in pancreatic β -cells. *Hormone and metabolic research= Hormon-und Stoffwechselforschung= Hormones et métabolisme*. 2004;36(11-12):787.
98. Meier J, Gallwitz B, Siepmann N, Holst JJ, Deacon CF, Schmidt W, et al. Gastric inhibitory polypeptide (GIP) dose-dependently stimulates glucagon secretion in healthy human subjects at euglycaemia. *Diabetologia*. 2003;46(6):798-801.
99. Nauck M, Kleine N, Ørskov C, Holst JJ, Willms B, Creutzfeldt W. Normalization of fasting hyperglycaemia by exogenous glucagon-like peptide 1 (7-36 amide) in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia*. 1993;36(8):741-4.
100. Nakabayashi H, Nishizawa M, Nakagawa A, Takeda R, Nijima A. Vagal hepatopancreatic reflex effect evoked by intraportal appearance of tGLP-1. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*. 1996;271(5):E808-E13.
101. Nikolaidis LA, Mankad S, Sokos GG, Miske G, Shah A, Elahi D, et al. Effects of glucagon-like peptide-1 in patients with acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction after successful reperfusion. *Circulation*. 2004;109(8):962-5.
102. Nystrom T, Gutniak MK, Zhang Q, Zhang F, Holst JJ, Åhrén B, et al. Effects of glucagon-like peptide-1 on endothelial function in type 2 diabetes patients with stable coronary artery disease. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2004;287(6):E1209-E15.
103. Tibaldi JM. Incorporating incretin-based therapies into clinical practice for patients with type 2 diabetes. *Advances in therapy*. 2014;31(3):289-317.
104. Åhrén B. Exenatide: a novel treatment of type 2 diabetes. *Therapy*. 2005;2(2):207-22.

105. Drucker DJ. Biologic actions and therapeutic potential of the proglucagon-derived peptides. *Nature clinical practice endocrinology & metabolism*. 2005;1(1):22-31.
106. Holst JJ. Glucagon-like peptide-1: from extract to agent. The Claude Bernard Lecture, 2005. *Diabetologia*. 2006;49(2):253-60.
107. Åhrén B. Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4)-a novel approach to treat type 2 diabetes. *Current Enzyme Inhibition*. 2005;1(1):65-73.
108. Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *The Lancet*. 2006;368(9548):1696-705.
109. Barnett A. DPP-4 inhibitors and their potential role in the management of type 2 diabetes. *International journal of clinical practice*. 2006;60(11):1454-70.
110. Meier J, Nauck M. GIP as a potential therapeutic agent? *Hormone and metabolic research*. 2004;36(11/12):859-66.
111. Mentlein R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-role in the inactivation of regulatory peptides. *Regulatory peptides*. 1999;85(1):9-24.
112. Lambeir A-M, Durinx C, Scharpé S, De Meester I. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 2003;40(3):209-94.
113. Marguet D, Baggio L, Kobayashi T, Bernard A-M, Pierres M, Nielsen PF, et al. Enhanced insulin secretion and improved glucose tolerance in mice lacking CD26. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(12):6874-9.
114. Holst JJ, Deacon CF. Inhibition of the activity of dipeptidyl-peptidase IV as a treatment for type 2 diabetes. *Diabetes*. 1998;47(11):1663-70.
115. Deacon CF, Hughes TE, Holst JJ. Dipeptidyl peptidase IV inhibition potentiates the insulinotropic effect of glucagon-like peptide 1 in the anesthetized pig. *Diabetes*. 1998;47(5):764-9.
116. Åhrén B, Holst JJ, Mårtensson H, Balkan B. Improved glucose tolerance and insulin secretion by inhibition of dipeptidyl peptidase IV in mice. *European journal of pharmacology*. 2000;404(1-2):239-45.
117. Åhrén B, Landin-Olsson M, Jansson P-A, Svensson M, Holmes D, Schweizer A. Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 reduces glycemia, sustains insulin levels, and reduces glucagon levels in type 2 diabetes. *The journal of clinical endocrinology & metabolism*. 2004;89(5):2078-84.

118. Villhauer EB, Brinkman JA, Naderi GB, Burkey BF, Dunning BE, Prasad K, et al. 1-[[[(3-hydroxy-1-adamantyl) amino] acetyl]-2-cyano-(S)-pyrrolidine: a potent, selective, and orally bioavailable dipeptidyl peptidase IV inhibitor with antihyperglycemic properties. *Journal of medicinal chemistry*. 2003;46(13):2774-89.
119. Kim D, Wang L, Beconi M, Eiermann GJ, Fisher MH, He H, et al. (2 R)-4-Oxo-4-[3-(trifluoromethyl)-5, 6-dihydro [1, 2, 4] triazolo [4, 3-a] pyrazin-7 (8 H)-yl]-1-(2, 4, 5-trifluorophenyl) butan-2-amine: a potent, orally active dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *Journal of medicinal chemistry*. 2005;48(1):141-51.
120. He Y, Balch A, Campestrini J, Rivere G, Serra D, Prasad P, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the DPP-4 inhibitor, LAF237, in patients with type 2 diabetes. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2005;77(2):P56-P.
121. Herman GA, Stevens C, Van Dyck K, Bergman A, Yi B, De Smet M, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of sitagliptin, an inhibitor of dipeptidyl peptidase IV, in healthy subjects: results from two randomized, double-blind, placebo-controlled studies with single oral doses. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2005;78(6):675-88.
122. Bergman A, Cote J, Yi B, Wang A, Zeng W, Chen L, et al. PIII-60: Effect of renal insufficiency on the pharmacokinetics of MK-0431 (sitagliptin), a selective dipeptidyl-peptidase-IV (DPP-IV) inhibitor. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2006;79(2):P75-P.
123. Herman GA, Bergman A, Stevens C, Kotey P, Yi B, Zhao P, et al. Effect of single oral doses of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, on incretin and plasma glucose levels after an oral glucose tolerance test in patients with type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2006;91(11):4612-9.
124. Burkey BF, Li X, Bolognese L, Balkan B, Mone M, Russell M, et al. Acute and chronic effects of the incretin enhancer vildagliptin in insulin-resistant rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2005;315(2):688-95.
125. Winzell MS, Ahrén B. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes*. 2004;53(suppl 3):S215-S9.
126. Mu J, Woods J, Zhou Y-P, Roy RS, Li Z, Zycband E, et al. Chronic inhibition of dipeptidyl peptidase-4 with a sitagliptin analog preserves pancreatic β -cell mass and function in a rodent model of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2006;55(6):1695-704.

127. Sakr H. Effect of sitagliptin on the working memory and reference memory in type 2 diabetic Sprague-Dawley rats: possible role of adiponectin receptors 1. *J Physiol Pharmacol.* 2013;64(5):613-23.
128. Pintana H, Pongkan W, Pratchayasakul W, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. Dipeptidyl peptidase 4 inhibitor improves brain insulin sensitivity, but fails to prevent cognitive impairment in orchietomy obese rats. *Journal of Endocrinology.* 2015;226(2):M1-M11.
129. James BD, Jones AV, Trethewey RE, Evans RA. Obesity and metabolic syndrome in COPD: Is exercise the answer? *Chronic respiratory disease.* 2018;15(2):173-81.
130. Chan JS, Yan JH, Payne VG. The impact of obesity and exercise on cognitive aging. *Frontiers in aging neuroscience.* 2013;5:97.
131. Geva-Sagiv M, Las L, Yovel Y, Ulanovsky N. Spatial cognition in bats and rats: from sensory acquisition to multiscale maps and navigation. *Nature Reviews Neuroscience.* 2015;16(2):94-108.
132. Felix-Ortiz AC, Beyeler A, Seo C, Leppla CA, Wildes CP, Tye KM. BLA to vHPC inputs modulate anxiety-related behaviors. *Neuron.* 2013;79(4):658-64.
133. Buzsáki G, Moser EI. Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nature neuroscience.* 2013;16(2):130-8.
134. Goosens KA. Hippocampal regulation of aversive memories. *Current opinion in neurobiology.* 2011;21(3):460-6.
135. Fenton AA, Lytton WW, Barry JM, Lenck-Santini P-P, Zinyuk LE, Kubík Š, et al. Attention-like modulation of hippocampus place cell discharge. *Journal of Neuroscience.* 2010;30(13):4613-25.
136. Bannerman D, Rawlins J, McHugh S, Deacon R, Yee B, Bast T, et al. Regional dissociations within the hippocampus—memory and anxiety. *Neuroscience & biobehavioral reviews.* 2004;28(3):273-83.
137. Knierim JJ, Neunuebel JP. Tracking the flow of hippocampal computation: Pattern separation, pattern completion, and attractor dynamics. *Neurobiology of learning and memory.* 2016;129:38-49.
138. Treves A, Rolls ET. Computational analysis of the role of the hippocampus in memory. *Hippocampus.* 1994;4(3):374-91.
139. Kishi T, Tsumori T, Yokota S, Yasui Y. Topographical projection from the hippocampal formation to the amygdala: a combined anterograde and retrograde tracing study in the rat. *Journal of Comparative Neurology.* 2006;496(3):349-68.

140. Cenquizca LA, Swanson LW. Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain research reviews*. 2007;56(1):1-26.
141. Friedman DP, Aggleton JP, Saunders RC. Comparison of hippocampal, amygdala, and perirhinal projections to the nucleus accumbens: combined anterograde and retrograde tracing study in the Macaque brain. *Journal of Comparative Neurology*. 2002;450(4):345-65.
142. Jay TM, Witter MP. Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *Journal of Comparative Neurology*. 1991;313(4):574-86.
143. Yang Y, Wang Z-H, Jin S, Gao D, Liu N, Chen S-P, et al. Opposite monosynaptic scaling of BLP-vCA1 inputs governs hopefulness-and helplessness-modulated spatial learning and memory. *Nature communications*. 2016;7(1):1-14.
144. Spellman T, Rigotti M, Ahmari SE, Fusi S, Gogos JA, Gordon JA. Hippocampal–prefrontal input supports spatial encoding in working memory. *Nature*. 2015;522(7556):309-14.
145. O'Keefe J, Dostrovsky J. The hippocampus as a spatial map: Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain research*. 1971.
146. Cheng J, Ji D. Rigid firing sequences undermine spatial memory codes in a neurodegenerative mouse model. *elife*. 2013;2:e00647.
147. Lisman J, Buzsáki G, Eichenbaum H, Nadel L, Ranganath C, Redish AD. Viewpoints: how the hippocampus contributes to memory, navigation and cognition. *Nature neuroscience*. 2017;20(11):1434-47.
148. Coren S. Sensation and perception. *Handbook of psychology*. 2003:85-108.
149. Anderson JR. Language, memory, and thought: Psychology Press; 2013.
150. Miller GA. The magical number seven, plus or minus two: Some limits on our capacity for processing information. *Psychological review*. 1956;63(2):81.
151. Tulving E. Episodic and semantic memory. *Organization of memory*. 1972;1:381-403.
152. Squire LR, Zola SM. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996;93(24):13515-22.
153. Salmon DP, Butters N. Neurobiology of skill and habit learning. *Current opinion in neurobiology*. 1995;5(2):184-90.

154. Bechara A, Tranel D, Damasio H, Adolphs R, Rockland C, Damasio AR. Double dissociation of conditioning and declarative knowledge relative to the amygdala and hippocampus in humans. *Science*. 1995;269(5227):1115-8.
155. Knowlton BJ, Mangels JA, Squire LR. A neostriatal habit learning system in humans. *Science*. 1996;273(5280):1399-402.
156. Cahill L, Babinsky R, Markowitsch HJ, McGaugh JL. The amygdala and emotional memory. *Nature*. 1995;377(6547).
157. McIntyre JS, Craik FI. Age differences in memory for item and source information. *Canadian Journal of Psychology/Revue canadienne de psychologie*. 1987;41(2):175.
158. Puckett JM, Stockburger DW. Absence of age-related proneness to short-term retroactive interference in the absence of rehearsal. *Psychology and Aging*. 1988;3(4):342.
159. Light LL, LaVoie D, Valencia-Laver D, Albertson Owens SA, Mead G. Direct and indirect measures of memory for modality in young and older adults. *Journal of Experimental Psychology: Learning, Memory, and Cognition*. 1992;18(6):1284.
160. Craik FI, McDowd JM. Age differences in recall and recognition. *Journal of Experimental Psychology: Learning, Memory, and Cognition*. 1987;13(3):474.
161. Einstein GO, McDaniel MA, Richardson SL, Gynn MJ, Cunfer AR. Aging and prospective memory: Examining the influences of self-initiated retrieval processes. *Journal of Experimental Psychology: Learning, Memory, and Cognition*. 1995;21(4):996.
162. Schonfield D, Robertson BA. Memory storage and aging. *Canadian Journal of Psychology/Revue canadienne de psychologie*. 1966;20(2):228.
163. Dobbs AR, Rule BG. Adult age differences in working memory. *Psychology and aging*. 1989;4(4):500.
164. O'keefe J, Nadel L. *The hippocampus as a cognitive map*: Oxford: Clarendon Press; 1978.
165. Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1957;20(1):11.
166. Eichenbaum H. Is the rodent hippocampus just for 'place'? Current opinion in neurobiology. 1996;6(2):187-95.
167. Bird CM, Burgess N. The hippocampus and memory: insights from spatial processing. *Nature Reviews Neuroscience*. 2008;9(3):182-94.

168. Vargha-Khadem F, Gadian DG, Watkins KE, Connelly A, Van Paesschen W, Mishkin M. Differential effects of early hippocampal pathology on episodic and semantic memory. *Science*. 1997;277(5324):376-80.
169. Tulving E, Markowitsch HJ. Episodic and declarative memory: role of the hippocampus. *Hippocampus*. 1998;8(3):198-204.
170. Stefanacci L, Buffalo EA, Schmolck H, Squire LR. Profound amnesia after damage to the medial temporal lobe: A neuroanatomical and neuropsychological profile of patient EP. *Journal of Neuroscience*. 2000;20(18):7024-36.
171. Squire LR. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychological review*. 1992;99(2):195.
172. Smith TD, Calhoun ME, Rapp PR. Circuit and morphological specificity of synaptic change in the aged hippocampal formation. 1999.
173. Gadian DG, Aicardi J, Watkins KE, Porter DA, Mishkin M, Vargha-Khadem F. Developmental amnesia associated with early hypoxic–ischaemic injury. *Brain*. 2000;123(3):499-507.
174. Corkin S, Amaral DG, González RG, Johnson KA, Hyman BT. HM's medial temporal lobe lesion: findings from magnetic resonance imaging. *Journal of Neuroscience*. 1997;17(10):3964-79.
175. Corkin S. What's new with the amnesic patient HM? *Nature reviews neuroscience*. 2002;3(2):153-60.
176. Teng E, Squire LR. Memory for places learned long ago is intact after hippocampal damage. *Nature*. 1999;400(6745):675-7.
177. Rosenbaum RS, Priselac S, Köhler S, Black SE, Gao F, Nadel L, et al. Remote spatial memory in an amnesic person with extensive bilateral hippocampal lesions. *Nature neuroscience*. 2000;3(10):1044-8.
178. Maguire EA, Burke T, Phillips J, Staunton H. Topographical disorientation following unilateral temporal lobe lesions in humans. *Neuropsychologia*. 1996;34(10):993-1001.
179. Feigenbaum JD, Polkey CE, Morris RG. Deficits in spatial working memory after unilateral temporal lobectomy in man. *Neuropsychologia*. 1996;34(3):163-76.
180. Abrahams S, Pickering A, Polkey CE, Morris RG. Spatial memory deficits in patients with unilateral damage to the right hippocampal formation. *Neuropsychologia*. 1997;35(1):11-24.

181. Astur RS, Taylor LB, Mamelak AN, Philpott L, Sutherland RJ. Humans with hippocampus damage display severe spatial memory impairments in a virtual Morris water task. *Behavioural brain research*. 2002;132(1):77-84.
182. Pouzet B, Zhang W-N, Feldon J, Rawlins JNP. Hippocampal lesioned rats are able to learn a spatial position using non-spatial strategies. *Behavioural brain research*. 2002;133(2):279-91.
183. de Bruin JP, Moita MP, de Brabander HM, Joosten RN. Place and response learning of rats in a Morris water maze: differential effects of fimbria fornix and medial prefrontal cortex lesions. *Neurobiology of learning and memory*. 2001;75(2):164-78.
184. Bannerman D, Yee B, Good MA, Heupel M, Iversen S, Rawlins J. Double dissociation of function within the hippocampus: a comparison of dorsal, ventral, and complete hippocampal cytotoxic lesions. *Behavioral neuroscience*. 1999;113(6):1170.
185. Thorp AA, Sinn N, Buckley JD, Coates AM, Howe PR. Soya isoflavone supplementation enhances spatial working memory in men. *British Journal of Nutrition*. 2009;102(9):1348-54.
186. Krikorian R, Nash TA, Shidler MD, Shukitt-Hale B, Joseph JA. Concord grape juice supplementation improves memory function in older adults with mild cognitive impairment. *British journal of nutrition*. 2010;103(5):730-4.
187. Grodstein F, Kang JH, Glynn RJ, Cook NR, Gaziano JM. A randomized trial of beta carotene supplementation and cognitive function in men: the Physicians' Health Study II. *Archives of internal medicine*. 2007;167(20):2184-90.
188. Kotani S, Sakaguchi E, Warashina S, Matsukawa N, Ishikura Y, Kiso Y, et al. Dietary supplementation of arachidonic and docosahexaenoic acids improves cognitive dysfunction. *Neuroscience research*. 2006;56(2):159-64.
189. Duffy KB, Spangler EL, Devan BD, Guo Z, Bowker JL, Janas AM, et al. A blueberry-enriched diet provides cellular protection against oxidative stress and reduces a kainate-induced learning impairment in rats. *Neurobiology of aging*. 2008;29(11):1680-9.
190. Brown ES, Frol AB, Khan DA, Larkin GL, Bret ME. Impact of levetiracetam on mood and cognition during prednisone therapy. *European psychiatry*. 2007;22(7):448-52.
191. Bora E, Veznedaroglu B, Kayahan B. The effect of galantamine added to clozapine on cognition of five patients with schizophrenia. *Clinical neuropharmacology*. 2005;28(3):139-41.

192. Wang R, Tang Y, Feng B, Ye C, Fang L, Zhang L, et al. Changes in hippocampal synapses and learning-memory abilities in age-increasing rats and effects of tetrahydroxystilbene glucoside in aged rats. *Neuroscience*. 2007;149(4):739-46.
193. Yasui F, Matsugo S, Ishibashi M, Kajita T, Ezashi Y, Oomura Y, et al. Effects of chronic acetyl-L-carnitine treatment on brain lipid hydroperoxide level and passive avoidance learning in senescence-accelerated mice. *Neuroscience letters*. 2002;334(3):177-80.
194. Costa M, Botton P, Mioranza S, Souza D, Porciuncula L. Caffeine prevents age-associated recognition memory decline and changes brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor (TrkB) content in mice. *Neuroscience*. 2008;153(4):1071-8.
195. Blecharz-Klin K, Piechal A, Joniec I, Pyrzanowska J, Widy-Tyszkiewicz E. Pharmacological and biochemical effects of Ginkgo biloba extract on learning, memory consolidation and motor activity in old rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2009;69(2):217-31.
196. McDonald SR, Sohal RS, Forster MJ. Concurrent administration of coenzyme Q10 and α -tocopherol improves learning in aged mice. *Free Radical Biology and Medicine*. 2005;38(6):729-36.
197. Magnusson KR, Scruggs B, Zhao X, Hammersmark R. Age-related declines in a two-day reference memory task are associated with changes in NMDA receptor subunits in mice. *BMC neuroscience*. 2007;8(1):43.
198. Dow-Edwards DL, Weedon JC, Hellmann E. Methylphenidate improves performance on the radial arm maze in periadolescent rats. *Neurotoxicology and teratology*. 2008;30(5):419-27.
199. Olton DS, Paras BC. Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychologia*. 1979;17(6):669-82.
200. Holmes A, Wrenn C, Harris A, Thayer K, Crawley J. Behavioral profiles of inbred strains on novel olfactory, spatial and emotional tests for reference memory in mice. *Genes, Brain and Behavior*. 2002;1(1):55-69.
201. Kuc K, Gregersen B, Gannon K, Dodart JC. Holeboard discrimination learning in mice. *Genes, Brain and Behavior*. 2006;5(4):355-63.
202. Koopmans G, Blokland A, van Nieuwenhuijzen P, Prickaerts J. Assessment of spatial learning abilities of mice in a new circular maze. *Physiology & Behavior*. 2003;79(4-5):683-93.

203. Paul C-M, Magda G, Abel S. Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behavioural brain research*. 2009;203(2):151-64.
204. D'Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain research reviews*. 2001;36(1):60-90.
205. Hebb DO. *The organization of behavior: a neuropsychological theory*: J. Wiley; Chapman & Hall; 1949.
206. Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of physiology*. 1973;232(2):331-56.
207. Douglas RM, Goddard GV. Long-term potentiation of the perforant path-granule cell synapse in the rat hippocampus. *Brain research*. 1975;86(2):205-15.
208. Ward MT, Oler JA, Markus EJ. Hippocampal dysfunction during aging I: Deficits in memory consolidation☆. *Neurobiology of aging*. 1999;20(4):363-72.
209. Shankar S, Teyler TJ, Robbins N. Aging differentially alters forms of long-term potentiation in rat hippocampal area CA1. *Journal of neurophysiology*. 1998;79(1):334-41.
210. Gallagher M, Nicolle MM. Animal models of normal aging: relationship between cognitive decline and markers in hippocampal circuitry. *Behavioural brain research*. 1993;57(2):155-62.
211. Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 1993;361(6407):31-9.
212. Sharma S, Rakoczy S, Brown-Borg H. Assessment of spatial memory in mice. *Life sciences*. 2010;87(17-18):521-36.
213. Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annual review of neuroscience*. 2000;23(1):649-711.
214. Power JM, Thompson LT, Moyer Jr JR, Disterhoft JF. Enhanced synaptic transmission in CA1 hippocampus after eyeblink conditioning. *Journal of Neurophysiology*. 1997;78(2):1184-7.
215. Foster T, Fugger H, Cunningham S. Receptor blockade reveals a correspondence between hippocampal-dependent behavior and experience-dependent synaptic enhancement. *Brain research*. 2000;871(1):39-43.

216. Barnes CA. Long-term potentiation and the ageing brain. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*. 2003;358(1432):765-72.
217. Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature protocols*. 2006;1(2):848.
218. Cordner ZA, Tamashiro KL. Effects of high-fat diet exposure on learning & memory. *Physiology & behavior*. 2015;152:363-71.
219. Marques C, Meireles M, Norberto S, Leite J, Freitas J, Pestana D, et al. High-fat diet-induced obesity Rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley Rat. *Adipocyte*. 2016;5(1):11-21.
220. Ittichaicharoen J, Apaijai N, Tanajak P, Sa-Nguanmoo P, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. Impaired mitochondria and intracellular calcium transients in the salivary glands of obese rats. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. 2017;42(4):420-9.
221. Gault V, Lennox R, Flatt P. Sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, improves recognition memory, oxidative stress and hippocampal neurogenesis and upregulates key genes involved in cognitive decline. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2015;17(4):403-13.
222. Lu Y, Li H, Shen S-W, Shen Z-H, Xu M, Yang C-J, et al. Swimming exercise increases serum irisin level and reduces body fat mass in high-fat-diet fed Wistar rats. *Lipids in health and disease*. 2016;15(1):1-8.
223. Dubern B. Genetics and epigenetics of obesity: keys to understand. *La Revue du praticien*. 2019;69(9):1016-9.
224. Niemiro GM, Rewane A, Algotar AM. Exercise and Fitness Effect On Obesity. *StatPearls [Internet]*. 2020.
225. Dye L, Boyle NB, Champ C, Lawton C. The relationship between obesity and cognitive health and decline. *Proceedings of the nutrition society*. 2017;76(4):443-54.
226. Kim JI. High fat diet confers vascular hyper-contractility against angiotensin II through upregulation of MLCK and CPI-17. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*. 2017;21(1):99-106.
227. Baek K-W, Cha H-J, Ock MS, Kim HS, Gim J-A, Park J-J. Effects of regular-moderate exercise on high-fat diet-induced intramyocellular lipid accumulation in the soleus muscle of Sprague-Dawley rats. *Journal of exercise rehabilitation*. 2018;14(1):32.

228. Touati S, Meziri F, Devaux S, Berthelot A, TOUYZ R, Laurant P. Exercise reverses metabolic syndrome in high-fat diet-induced obese rats. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 2011;43(3):398-407.
229. Sa-nguanmoo P, Tanajak P, Kerdphoo S, Jaiwongkam T, Wang X, Liang G, et al. FGF21 and DPP-4 inhibitor equally prevents cognitive decline in obese rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018;97:1663-72.
230. Lee J-M, Park J-M, Song MK, Kim YJ, Kim Y-J. Comparison of the behavioral effects of exercise and high fat diet on cognitive function in adolescent rats. *Journal of exercise rehabilitation*. 2016;12(6):520.
231. Pathan AR, Gaikwad AB, Viswanad B, Ramarao P. Rosiglitazone attenuates the cognitive deficits induced by high fat diet feeding in rats. *European journal of pharmacology*. 2008;589(1-3):176-9.
232. Molteni R, Wu A, Vaynman S, Ying Z, Barnard R, Gomez-Pinilla F. Exercise reverses the harmful effects of consumption of a high-fat diet on synaptic and behavioral plasticity associated to the action of brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience*. 2004;123(2):429-40.
233. Woo J, Shin KO, Park SY, Jang KS, Kang S. Effects of exercise and diet change on cognition function and synaptic plasticity in high fat diet induced obese rats. *Lipids in health and disease*. 2013;12(1):144.
234. Zhang X, Shen X, Dong J, Liu W-C, Song M, Sun Y, et al. Inhibition of Reactive Astrocytes with Fluorocitrate Ameliorates Learning and Memory Impairment Through Upregulating CRTC1 and Synaptophysin in Ischemic Stroke Rats. *Cellular and molecular neurobiology*. 2019;39(8):1151-63.

7. EKLER

Ek 1



T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
UNIVERSITY OF GAZİANTEP
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU BAŞKANLIĞI
LOCAL ETHICS COMMITTEE OF ANIMAL EXPERIMENTS
ARAŞTIRMA BAŞVURU ONAYI
RESEARCH APPLICATION CONSENT



TOPLANTI TARİHİ (Meeting Date)	TOPLANTI SAYISI (Meeting No)	TOPLANTI YERİ (Meeting Place)
24.04.2019	4	Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

BAŞVURU BİLGİLERİ Application Information	Araştırmanın Başlığı Research Title	DPP4 inhibitörü ile tedavi edilen obez sıçanlarda öğrenme ve sinaptofizin ilişkisinin analizi Analysis of the relationship between learning and synaptophysin in obese rats treated with DPP4 inhibitor
	Başvuru Tarihi Application Date	05.04.2019
	Protokol no Protocol no	94

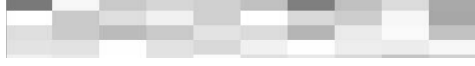
KARAR BİLGİLERİ Decision	Karar No: 2019/15 Decision No:2019/15 ☒ Kabul (Accepted) ☐ Red (Not Accepted) Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI'nın yürütücüsü olduğu ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, başvurunun Gaziantep Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesince "uygun" olduğuna toplantıya katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir.
------------------------------------	--

Yürütücü Coordinator	Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Araştırmacılar Researchers	Prof. Dr. Ersin AKARSU, Doç. Dr. Can DEMİREL, Doktora Öğrencisi Murat KORKMAZ

ETİK KURUL ÜYELERİ			
Ünvanı/Adı/Soyadı	Kurumu	İlişki	Katılım
Prof. Dr. A. Tuncay DEMİRYÜREK (Başkan)	GAÜN Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	H	E
Prof. Dr. Behçet AL (Üye)	GAÜN Tıp Fakültesi Acil Tıp AD.	H	E
Prof. Dr. Tekin KARSLIĞİL (Üye)	GAÜN Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD.	H	E
Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI (Üye)	GAÜN Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD.	E	E
Prof. Dr. Emine Elçin EMRE (Üye)	GAÜN Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü	H	E
Doç. Dr. Can DEMİREL (Üye)	GAÜN Tıp Fakültesi Biyofizik AD	E	E
Dr. Öğr. Üyesi Davut Sinan KAPLAN (Üye)	GAÜN Tıp Fakültesi Fizyoloji AD.	H	E
Dr. Öğr. Üyesi Merve GÖYMEN (Üye)	GAÜN Diş Hekimliği Fakültesi Ortodonti AD.	H	E
Öğr. Gör. Dr. Ahmet Sarper BOZKURT (Üye)	GAÜN Teknik Bilimler MYO Bitkisel ve Hayvansal Üretim	H	E
Veteriner Hekim Celal ÖZSÖYLER (Üye)	Gaziantep Büyükşehir Belediyesi Hayvanat Bahçesi	H	E
Avukat Orhan BEYAZ (Üye)	Serbest, Dernek Üyesi	H	E

E: Evet, H: Hayır

8. ÖZGEÇMİŞ

 ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini burada tamamladı. 2010 yılında Gaziantep Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitime başladı. 2014 yılında buradan mezun oldu. 2014 yılı güz döneminde Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda başladığı yüksek lisans eğitimini 2016 yılında tamamladı. Aynı yıl güz döneminde Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji ve Genetik programında doktora eğitime başladı. 2015 yılından beri aynı anabilim dalına bağlı, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi Moleküler Genetik Tanı Laboratuvarı, Yeni Nesil Dizileme (NGS) biriminde rutin analizlerin yürütülmesinde görev almaktadır.