



T.C.

ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL OBEZİTENİN SEBEP OLDUĞU SİNİR
HASARI ÜZERİNE KAPSAİSİN VE ARALIKLI
AÇLIĞIN ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ

Ayşe ŞEKER

TIBBİ FİZYOLOJİ PROGRAMI

Ankara, 2021

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL OBEZİTENİN SEBEP OLDUĞU SİNİR
HASARI ÜZERİNE KAPSAİSİN VE ARALIKLI
AÇLIĞIN ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ

Ayşe ŞEKER

TIBBİ FİZYOLOJİ PROGRAMI

**Bu araştırma; Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2019-8459 nolu
proje ile desteklenmiştir.**

Ankara, 2021

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Deneyssel Obezitenin Sebep Olduğu Sinir Hasarı Üzerine Kapsaisin ve Aralıklı
Açlığın Etkileri

Ayşe ŞEKER

Doktora Tezi

Tez Savunma Sınav Tarihi

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Mehmet Salih KAYA

İkinci Danışman

Doç. Dr. Ramazan ÜSTÜN

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Fahri BAYIROĞLU

Prof. Dr. Kadir DESDİCİOĞLU

Doç. Dr. Mehmet Salih KAYA

Doç. Dr. Okan ARIHAN

Doç. Dr. Ayhan ÇETİNKAYA

Okuduğumuz ve Savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Doktora derecesi için
gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Prof. Dr. Seyfullah Oktay ARSLAN

Enstitü Müdürü

Bu tezin Doktora derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.
22-12-2021

Ayşe ŞEKER



TEŞEKKÜR

Üzerimde büyük hak sahibi olan anneme ve babama, ayrıca her daim yanımda olan kardeşlerime teşekkür ederim.

Tezimin planlanması ve hazırlanmasında yardımlarını esirgemeyen Danışman hocam Doç. Dr. Mehmet Salih KAYA'ya ve doktora eğitimimde ufuk açıcı katkıları için Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Fahri BAYIROĞLU'na teşekkür ederim. Laboratuvar teknikleri ve mikroskopik görüntüleme konularında bilgi ve beceri kazandıran, tez eserimin yazımında yardımlarını esirgemeyen ikinci Danışman hocam Doç. Dr. Ramazan ÜSTÜN'e, hücre kültürü ve mikroskopik görüntüleme konularındaki destekleri için Doç. Dr. Elif KAVAL OĞUZ'a, istatistiksel analizlerdeki destekleri için Prof. Dr. Sıddık KESKİN'e, laboratuvar ekipmanı noktasındaki destekleri için Prof. Dr. Gökhan OTO'ya, laboratuvar çalışmalarındaki destekleri için Arş. Gör. Rabia Sena TÜRKER'e ve tezimdeki şekillerin çizimlerine yaptıkları katkıları sebebiyle mimar Rümeysa Sena ŞEKER, görsel tasarımcı Metin ŞEKER ve grafiker Ümit OĞUR'a teşekkür ederim.

Çalışmam boyunca manevi desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Seda BAŞAR YILMAZ, Dr. Öğr. Üyesi Hava BEKTAŞ, Öğr. Gör. Zeynep KİŞİ ve ressam Hatice SÖNMEZ'e teşekkür ederim.

Ayrıca, tez projeme destek sağlayan Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne de teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Obezite	5
2.1.1. Obezite Etiyolojisi.....	5
2.1.2. Obezite Fizyopatolojisi.....	5
2.2. Sinir Sistemi	6
2.2.1. Periferik Sinir Sistemi	7
2.2.2. Duysal Liflerin Fizyolojik Sınıflandırılması	10
2.2.3. Duysal Liflerin Patofizyolojisi	10
2.3. Nörotrofik Faktörler	11
2.3.1. Kalori Kısıtlaması ile Nörotrofik Faktörler Arasındaki İlişki..	15
2.4. Periferik Nöropati.....	15
2.5. Aralıklı Açlık.....	16
2.5.1. Aralıklı Açlığın Fizyolojik Etkileri	17
2.5.2. Aralıklı Açlığın Sinir Sistemi Üzerine Etkileri	18
2.6. Kapsaisin	19
2.6.1. Kapsaisinin Fizyolojik Etkileri.....	19
2.6.2. Kapsaisin-TRPV Etkileşim Mekanizması.....	20
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	22
3.1. Materyal.....	22
3.1.1. Deney Hayvanı	22
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler	22
3.2. <i>In Vivo</i> DeneySEL İşlem	24
3.2.1. Deney Grupları ve Çalışma Dizaynı	24
3.2.2. Kapsaisinin Hazırlanması.....	26
3.2.3. Terapötik Etkinin Değerlendirilmesinde Uygulanan Motor ve Duysal Fonksiyon Testleri.....	26
3.2.4. Elektromiyografik Analizler	28

3.2.5. İmmünohistokimyasal Analizler	31
3.3. <i>İn Vitro</i> Deneysel İşlem.....	33
3.3.1. Hücre Kültürü.....	33
3.3.2. Nöronların Canlılıklarının Doğrulanması	34
3.3.3. Aksotomi (akson kesisi) Modelinin Oluşturulması ve Görüntülenmesi	34
3.3.4. Hücre Takibi, Görüntüleme ve Değerlendirme.....	36
3.3.5. Hücre Kültürü Medyumuna Reseptör İnhibitörlerinin Eklenmesi	36
3.4. İstatistiksel Analiz	37
4. BULGULAR.....	38
4.1. <i>İn Vivo</i> Bulgular	38
4.1.1. Canlı Ağırlık Bulguları.....	38
4.1.2. Rotarod Performans Testi Bulguları	40
4.1.3. Hot Plate Testine Ait Bulgular	42
4.1.4. Tail-flick Testine Ait Bulgular	45
4.1.5. Elektromiyografi Bulguları	47
4.1.6. İmmünohistokimya Bulguları	49
4.2. <i>İn Vitro</i> Bulgular	73
4.2.1. DRG Nöron Kültüründe Aksotomi Hasarlı Nöronların Sağ Kalım Oranları	73
5. TARTIŞMA	89
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	94
7. KAYNAKLAR.....	96
8. EKLER.....	110
EK-1. Deney Hayvanları Etik Kurul Sonuç Raporu	110
EK-2. Özgeçmiş	111

ÖZET

Deneysel Obezitenin Sebep Olduğu Sinir Hasarı Üzerine Kapsaisin ve Aralıklı Açlığın Etkileri

Obezite, aşırı yağ birikimi ve kronik inflamasyon ile karakterize metabolik bir bozukluk olup pek çok metabolik ve nörodejeneratif hastalığa yol açmaktadır. Aralıklı açlık günün belirli saatlerinde ya da haftanın belirli günlerinde enerji içeren hiçbir besin maddesinin alınmadığı bir diyet programı olup kilo kontrolü için etkili ve doğal bir stratejidir. Kapsaisin, acı biberin temel aktif bileşenlerinden olup, anti-inflamatuar, antioksidan, antimikrobiyal, antikanser ve antiobezite etkilere sahiptir.

Bu çalışmanın amacı, obez fare modelinde, obezitenin indüklediği periferik sinir hasarı üzerine aralıklı açlık ve kapsaisin tedavisinin etkilerini hücresel, fonksiyonel ve immünohistokimyasal teknikler ile araştırmaktır.

Çalışmada; %45 yüksek yağlı yemle beslenen C57Bl/6 farelerde deneysel obezite modeli geliştirildi. Obezite kaynaklı periferik nöropati gelişimi, duysal-motor fonksiyon testleri ve immünohistokimyasal görüntüleme yöntemleriyle doğrulandı. Ardından Kontrol, Obez, Aralıklı açlık, Kapsaisin ve Aralıklı açlık + Kapsaisin çalışma grupları oluşturuldu. Ayrıca *in vitro* ortamda çalışma gruplarındaki DRG nöron kültürleri hazırlandı. Nöronlarda aksotomi hasarı oluşturularak aksotomiden 24 ve 48 saat sonraki hasarlı nöronların sağ kalım oranları hesaplandı.

Obezitenin ilk 15 haftalık dönemde miyelin kaybına, aksonal filament hasarına ve periferik nöropatiye sebep olduğu tespit edildi. Aralıklı açlık diyeti ile birlikte uygulanan kapsaisin tedavisi, miyelin kılıfta, kas lifinde asetilkolin reseptörlerini rejenere etti. *In vitro* ortamda, obezite ilk 15 haftalık dönemde travma hasarlı periferik duysal nöronların sağ kalım oranlarını azalttı. İkinci 15 haftalık dönemde ise periferik duysal nöronların travma stresi ile başa çıkma kabiliyetini artırarak, sağ kalım oranını yükseltti. TrkA reseptör sinyal yolağının inhibisyonu, aksotomi hasarlı periferik duysal nöronların sağ kalım oranını artırdı.

Anahtar sözcükler: Aksotomi, aralıklı açlık, kapsaisin, obezite, periferik nöropati.

ABSTRACT

Effects of Capsaicin and Intermittent Fasting on Nerve Damage Caused by Experimental Obesity

Obesity is a metabolic disorder characterized by excessive fat accumulation and chronic inflammation and causes many metabolic and neurodegenerative diseases. Intermittent fasting is a diet program in which no energy-containing nutrients are taken at certain times of the day or on certain days of the week and is an effective and natural strategy for weight control. Capsaicin, one of the main active components of hot pepper, has anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial, anticancer and anti-obesity effects.

The aim of this study was to investigate the effects of intermittent fasting and capsaicin treatment on obesity-induced peripheral nerve damage in an obese mouse model by cellular, functional and immunohistochemical techniques.

In the study, an experimental obesity model was developed in C57Bl/6 mice fed a 45% high-fat diet. The development of obesity-induced peripheral neuropathy was confirmed by sensory-motor function tests, immunohistochemical imaging methods. Then Control, Obese, Intermittent fasting, Capsaicin and Intermittent fasting + Capsaicin study groups were formed. In addition, DRG neuron cultures in the study groups were prepared *in vitro*. Axotomy damage was created in neurons, and the survival rates of damaged neurons 24 and 48 hours after axotomy were calculated.

It was determined that obesity causes myelin loss, axonal filament damage and peripheral neuropathy in the first 15 weeks. Capsaicin treatment combined with intermittent fasting diet regenerated acetylcholine receptors in myelin sheath and muscle fiber. *In vitro* conditions, obesity reduced the survival rates of trauma-injured peripheral sensory neurons in the first 15 weeks. In the second 15 weeks, it increased the survival rate by increasing the ability of peripheral sensory neurons to cope with traumatic stress. Inhibition of the TrkA receptor signaling pathway increased the survival rate of peripheral sensory neurons with axotomy damage.

Keywords: Axotomy, capsaicin, intermittent fasting, obesity, peripheral neuropathy.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
PSS	: Periferik Sinir Sistemi
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
BKİ	: Beden Kütle İndeksi
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
DPN	: Diyabetik Periferik Nöropati
TRPV1	: Transient Reseptör Potansiyel Vanilloid 1
IL-6	: İnterlökin 6
MCP-1	: Monosit Kemoatraktan Protein 1
DRG	: Dorsal Kök Gangliyonu
Kap	: Kapsaisin
AA	: Aralıklı Açlık
MetS	: Metabolik Sendrom
HDL	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
UCP1	: Spesifik Ayırıcı Protein 1
Trk	: Tirozin kinaz
NGF	: Sinir Büyüme Faktörü
BDNF	: Beyin Türevli Nörotrofik Faktör
NT3	: Nörotrofin 3
NT4/5	: Nörotrofin 4/5
TrkA	: Tirozin kinaz A
TrkB	: Tirozin kinaz B
TrkC	: Tirozin kinaz C
NMDA	: N-Metil-D-Aspartat Reseptörü
mNT	: Olgun Nörotrofik Faktör
ProNT	: Pro Nörotrofik Faktör
p75 ^{NTR}	: Pan Nörotrofin Reseptörü 75
TF	: Transkripsiyon faktörleri
JNK	: c-Jun N-terminal Kinaz
PLC-γ1	: Fosfolipaz C gama-1
IP3	: İnositol-3-fosfat
Ca ²⁺	: Kalsiyum

PKC	: Protein Kinaz C
CREB	: cAMP bağlayıcı protein
NFkB	: Nükleer Faktör kappa B
PI3k/Akt	: Fosfatidil inositol 3 kinaz-Akt
MAPK/ERK	: Mitojen Aktiviteli Protein Kinaz/Ekstrasellüler Sinyal Düzenleyici Kinaz
Kcal	: Kilo kalori
PKA	: Protein Kinaz A
IGF-1	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
CGRP	: Kalsitonin Gen İlişkili Peptid
GLP-1	: Glukagon Benzeri Peptid-1
POMC	: Proopiomelanokortin
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
AMPK	: Aktive Edilmiş Protein Kinaz
SF	: Serum Fizyolojik
cm	: Santimetre
°C	: Santigrat derece
mg	: Miligram
kg	: Kilogram
EMG	: Elektromiyografi
MSİH	: Motor Sinir İleti Hızı
BKAP	: Bileşik Kas Aksiyon Potansiyeli
mV	: Milivolt
mm	: Milimetre
m	: Metre
sn	: Saniye
FTS	: Fosfat Tampon Solüsyonu
µm	: Mikrometre
NFH	: Nörofilament
βIII-Tub	: βIII-Tubulin
MBP	: Myelin Basic Protein
P0	: Myelin protein zero
S100	: Anti-S100

α -BNG	: Alfa-bungarotoksin
NBA	: Neurobasal Medium
HBSS	: Hanks' Balanced Salt Solution
RCF	: Baęıl Merkezkaç Kuvveti
FCS	: Fetal Bovine Serum
RPM	: Dakikadaki dönüş hızı
K252a	: TrkA inhibitörü
PD98059	: MEK-1 inhibitörü
LY294002	: PI3K inhibitörü
DMSO	: Dimetil sülfoksit
gr	: Gram
PI	: Propidyum İyodür
CAM	: Calsein AM

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Sinir sisteminin sınıflandırılması.	7
Şekil 2.2. Periferik sinir sistemi.	7
Şekil 2.3. Periferik sinirlerin spinal organizasyonu ve dorsal kök gangliyonu.	8
Şekil 2.4. PSS’de Schwann hücrelerinin, MSS’de ise oligodendrosit hücrelerinin rejenerasyondaki rolleri.	9
Şekil 2.5. Duysal liflerin genel sınıflandırılması.	10
Şekil 2.6. Sağlıklı ve hasarlı nöronların yapısal özellikleri.	11
Şekil 2.7. p75 ^{NTR} ve Trk reseptörleri aracılığıyla nörotrofin sinyal mekanizması. ...	13
Şekil 2.8. Kapsaisinin etki mekanizması ve fizyolojik işlevleri.	21
Şekil 3.1. Çalışma şeması..	25
Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan rotarod cihazı.	26
Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan hot plate cihazı.	27
Şekil 3.4. Çalışmada kullanılan tail-flick cihazı.	28
Şekil 3.5. Sinir ileti hızı tespitinde kullanılan cihaz (Nihon Kohden) ve laboratuvar ortamı.....	29
Şekil 3.6. Çalışmada değerlendirilen latans ve BKAP (tepe-tepe Amplitüdü) değerlerinin şematik görünümü.	30
Şekil 3.7. Lazer taramalı konfokal mikroskop sistemi (LSM 510 META-Zeiss).	32
Şekil 3.8. Hücre kültürünün hazırlandığı laboratuvar ortamı.	33
Şekil 3.9. Aksotomi işleminin yapıldığı mikroskop sistemi (PALM Mikrolazer Teknolojisi ve LPMC sistemi).	35
Şekil 3.10. Hücre takip ve görüntülemesinin yapıldığı zaman aralıklı mikroskop sistemi (Axiovert 200M).	36
Şekil 4.1. Kontrol ve obez grubuna ait 0. ve 15. haftalardaki ortalama canlı ağırlık değerleri (gr).	39
Şekil 4.2. Grupların 30. haftadaki ortalama canlı ağırlık değerleri (gr).	39
Şekil 4.3. 30. hafta obez ve tedavi gruplarının ortalama ağırlık değerlerinin 15. hafta obez gruba karşılaştırılması.....	40
Şekil 4.4. Kontrol ve obez grubuna ait 0. ve 15. haftalardaki ortalama rotarod platformunda kalma süreleri (sn).....	41
Şekil 4.5. Grupların 30. haftadaki rotarod platformunda kalma süreleri (sn).....	41

Şekil 4.6. 30. hafta obez ve tedavi gruplarının rotarod platformunda kalma sürelerinin 15. hafta obez grupla karşılaştırılması.....	42
Şekil 4.7. Kontrol ve obez grubuna ait 0. ve 15. haftalardaki termal ağırlı uyarana tepki süreleri (sn).	43
Şekil 4.8. Grupların 30. haftadaki termal ağırlı uyarana tepki süreleri (sn).	44
Şekil 4.9. 30. hafta obez ve tedavi gruplarının termal ağırlı uyarana tepki sürelerinin 15. hafta obez grupla karşılaştırılması.	44
Şekil 4.10. Kontrol ve obez grubuna ait 0. ve 15. haftalardaki ağırlı ışıık-ısııl uyarana tepki süreleri (sn).	46
Şekil 4.11. Grupların 30. haftadaki ağırlı ışıık-ısııl uyarana tepki süreleri (sn).	46
Şekil 4.12. 30. hafta obez ve tedavi gruplarının ağırlı ışıık-ısııl uyarana tepki sürelerinin 15. hafta obez grupla karşılaştırılması.	47
Şekil 4.13. Grupların 30. haftadaki başlangııç latans süreleri (ms).	48
Şekil 4.14. Grupların 30. haftadaki motor sinir ileti hızları (m/sn).	49
Şekil 4.15. Grupların 30. haftadaki supramaksimal stimölasyona verdikleri bileşik kas aksiyon potansiyel yanıtları (mV).	49
Şekil 4.16. Kontrol ve obez grubuna ait 15. haftadaki siyatik sinirde β III-Tubulin piksel yoğunlukları.	50
Şekil 4.17. Grupların 30. haftadaki siyatik sinirde β III-Tubulin piksel yoğunlukları.	51
Şekil 4.18. 30. hafta obez ve tedavi gruplarının siyatik sinirde β III-Tubulin piksel yoğunluklarının 15. hafta obez grupla karşılaştırılması.	51
Şekil 4.19. Kontrol ve obez grubuna ait 15. haftadaki siyatik sinirde S100 piksel yoğunlukları.	52
Şekil 4.20. Grupların 30. haftadaki siyatik sinirde S100 piksel yoğunlukları.	53
Şekil 4.21. 30. hafta obez ve tedavi gruplarının siyatik sinirde S100 piksel yoğunluklarının 15. hafta obez grupla karşılaştırılması.	53
Şekil 4.22. Kontrol ve obez grubuna ait 15. haftadaki siyatik sinirde β III-Tubulin ve S100 immünohistokimya görüntüleri.	54
Şekil 4.23. Grupların 30. haftadaki siyatik sinirde β III-Tubulin ve S100 immünohistokimya görüntüleri.	55
Şekil 4.24. Kontrol ve obez grubuna ait 15. haftadaki siyatik sinirde MBP piksel yoğunlukları.	56
Şekil 4.25. Grupların 30. haftadaki siyatik sinirde MBP piksel yoğunlukları.	57

Şekil 4.26. 30. hafta obez ve tedavi gruplarının siyatik sinirde MBP piksel yoğunluklarının 15. hafta obez grupla karşılaştırılması.	58
Şekil 4.27. Kontrol ve obez grubuna ait 15. haftadaki siyatik sinirde P0 piksel yoğunlukları.	59
Şekil 4.28. Grupların 30. haftadaki siyatik sinirde P0 piksel yoğunlukları.	59
Şekil 4.29. 30. hafta obez ve tedavi gruplarının siyatik sinirde P0 piksel yoğunluklarının 15. hafta obez grupla karşılaştırılması.	60
Şekil 4.30. Kontrol ve obez grubuna ait 15. haftadaki siyatik sinirde MBP ve P0 immünohistokimya görüntüleri.	61
Şekil 4.31. Grupların 30. haftadaki siyatik sinirde MBP ve P0 immünohistokimya görüntüleri.	62
Şekil 4.32. Kontrol ve obez grubuna ait 15. haftadaki siyatik sinirde NFH piksel yoğunlukları.	63
Şekil 4.33. Grupların 30. haftadaki siyatik sinirde NFH piksel yoğunlukları.	64
Şekil 4.34. 30. hafta obez ve tedavi gruplarının siyatik sinirde NFH piksel yoğunluklarının 15. hafta obez grupla karşılaştırılması.	64
Şekil 4.35. Gruplara ait 15. ve 30. haftalardaki siyatik sinirde NFH immünohistokimya görüntüleri.	65
Şekil 4.36. Kontrol ve obez grubuna ait 15. haftadaki gastroknemius kasında NFH piksel yoğunlukları.	66
Şekil 4.37. Grupların 30. haftadaki gastroknemius kasında NFH piksel yoğunlukları.	67
Şekil 4.38. 30. hafta obez ve tedavi gruplarının gastroknemius kasında NFH piksel yoğunluklarının 15. hafta obez grupla karşılaştırılması.	68
Şekil 4.39. Kontrol ve obez grubuna ait 15. haftadaki gastroknemius kasında α -BNG piksel yoğunlukları.	69
Şekil 4.40. Grupların 30. haftadaki gastroknemius kasında α -BNG piksel yoğunlukları.	70
Şekil 4.41. 30. hafta obez ve tedavi gruplarının gastroknemius kasında α -BNG piksel yoğunluklarının 15. hafta obez grupla karşılaştırılması.	70
Şekil 4.42. Kontrol ve obez grubuna ait 15. haftadaki gastroknemius kası NFH ve α -BNG immünohistokimya görüntüleri.	71
Şekil 4.43. Gruplara ait 30. haftadaki gastroknemius kasında NFH ve α -BNG immünohistokimya görüntüleri.	72

Şekil 4.44. Kontrol grubu nöronlarının 15. haftadaki mikroskopik görüntüleri.....	74
Şekil 4.45. Obez grubu nöronlarının 15. haftadaki mikroskopik görüntüleri.....	75
Şekil 4.46. Kontrol ve Obez grubunun 15. haftadaki aksotomi sonrası 24. ve 48. saatlerde nöronal sağ kalım oranları (%).....	76
Şekil 4.47. Kontrol grubuna ait nöronların 30. haftadaki mikroskopik görüntüleri. .	77
Şekil 4.48. Obez grubuna ait nöronların 30. haftadaki mikroskopik görüntüleri.	78
Şekil 4.49. Obez + AA grubuna ait nöronların 30. haftadaki mikroskopik görüntüleri.	79
Şekil 4.50. Obez + Kap grubuna ait nöronların 30. haftadaki mikroskopik görüntüleri.	80
Şekil 4.51. Obez + AA + Kap grubuna ait nöronların 30. haftadaki mikroskopik görüntüleri.	81
Şekil 4.52. Grupların 30. haftadaki aksotomi sonrası 24. ve 48. saatlerde nöronal sağ kalım oranları (%).	82
Şekil 4.53. Kontrol grubunun 30. hafta nöron kültürü medyumlarına inhibitör (TrkA, PI3K ve MEK-1) eklenmesiyle aksotomi sonrası 24. ve 48. saatlerdeki nöronal sağ kalım oranları (%).	84
Şekil 4.54. Obez grubunun 30. hafta nöron kültürü medyumlarına inhibitör (TrkA, PI3K ve MEK-1) eklenmesiyle aksotomi sonrası 24. ve 48. saatlerdeki nöronal sağ kalım oranları (%).	85
Şekil 4.55. Obez + AA grubunun 30. hafta nöron kültürü medyumlarına inhibitör (TrkA, PI3K ve MEK-1) eklenmesiyle aksotomi sonrası 24. ve 48. saatlerdeki nöronal sağ kalım oranları (%).	86
Şekil 4.56. Obez + Kap grubunun 30. hafta nöron kültürü medyumlarına inhibitör (TrkA, PI3K ve MEK-1) eklenmesiyle aksotomi sonrası 24. ve 48. saatlerdeki nöronal sağ kalım oranları (%).	87
Şekil 4.57. Obez + AA + Kap grubunun 30. hafta nöron kültürü medyumlarına inhibitör (TrkA, PI3K ve MEK-1) eklenmesiyle aksotomi sonrası 24. ve 48. saatlerdeki nöronal sağ kalım oranları (%).	88

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. Sarf malzeme listesi.	23
Tablo 4.1. Grupların ortalama canlı ağırlık değerlerinin (gr) haftalara göre tanımlayıcı istatistikleri ve karşılaştırma sonuçları.	38
Tablo 4.2. Farelerin rotarod platformunda kalma sürelerinin (sn) gruplara ve haftalara göre tanımlayıcı istatistikleri ve karşılaştırma sonuçları.	40
Tablo 4.3. Farelerin hot plate testinden elde edilen termal ağırlı uyarana tepki sürelerinin (sn) gruplara ve haftalara göre tanımlayıcı istatistikleri ve karşılaştırma sonuçları.	43
Tablo 4.4. Farelerin tail-flick ağırlı ışık-ısı uyarana tepki sürelerinin (sn) gruplara ve haftalara göre tanımlayıcı istatistikleri ve karşılaştırma sonuçları.	45
Tablo 4.5. Farelerin 30. haftadaki elektromiyografi verilerinin (latans süresi (ms), motor sinir ileti hızı (m/s) ve bileşik kas aksiyon potansiyeli (mV)) gruplara göre tanımlayıcı istatistikleri ve karşılaştırma sonuçları.	48
Tablo 4.6. Siyatik sinirde β III-Tubulin piksel yoğunluk verileri için gruplara ve haftalara göre tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırma sonuçları.	50
Tablo 4.7. Siyatik sinirde S100 piksel yoğunluk verileri için gruplara ve haftalara göre tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırma sonuçları.	52
Tablo 4.8. Siyatik sinirde MBP piksel yoğunluk verileri için gruplara ve haftalara göre tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırma sonuçları.	56
Tablo 4.9. Siyatik sinirde P0 piksel yoğunluk verileri için gruplara ve haftalara göre tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırma sonuçları.	58
Tablo 4.10. Siyatik sinirde NFH piksel yoğunluk verileri için gruplara ve haftalara göre tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırma sonuçları.	63
Tablo 4.11. Gastroknemius kasında NFH piksel yoğunluk verileri için gruplara ve haftalara göre tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırma sonuçları.	66
Tablo 4.12. Gastroknemius kasında α -BNG piksel yoğunluk verileri için gruplara ve haftalara göre tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırma sonuçları.	69
Tablo 4.13. 15. haftada Kontrol ve Obez grubunda aksotomi uygulanan nöronların 24. ve 48. saatlerde sağ kalım oranlarına ait istatistiksel karşılaştırma sonuçları.	76

Tablo 4.14. 30. haftada aksotomi sonrası 24. ve 48. saatlerde nöronal sağ kalım oranlarının gruplara ve saatlere göre istatistiksel karşılaştırma sonuçları.	82
Tablo 4.15. Kontrol grubunun 30. hafta nöron kültürü medyumlarına inhibitör (TrkA, MEK-1 ve PI3K) eklenmesiyle aksotomi sonrası 24. ve 48. saatlerde nöronal sağ kalım için gruplara ve saatlere göre istatistiksel karşılaştırma sonuçları.....	83
Tablo 4.16. Obez grubunun 30. hafta nöron kültürü medyumlarına inhibitör (TrkA, MEK-1 ve PI3K) eklenmesiyle aksotomi sonrası 24. ve 48. saatlerde nöronal sağ kalım için gruplara ve saatlere göre istatistiksel karşılaştırma sonuçları.....	85
Tablo 4.17. Obez + AA grubunun 30. hafta nöron kültürü medyumlarına inhibitör (TrkA, MEK-1 ve PI3K) eklenmesiyle aksotomi sonrası 24. ve 48. saatlerde nöronal sağ kalım için gruplara ve saatlere göre istatistiksel karşılaştırma sonuçları.....	86
Tablo 4.18. Obez + Kap grubunun 30. hafta nöron kültürü medyumlarına inhibitör (TrkA, MEK-1 ve PI3K) eklenmesiyle aksotomi sonrası 24. ve 48. saatlerde nöronal sağ kalım için gruplara ve saatlere göre istatistiksel karşılaştırma sonuçları.....	87
Tablo 4.19. Obez + AA + Kap grubunun 30. hafta nöron kültürü medyumlarına inhibitör (TrkA, MEK-1 ve PI3K) eklenmesiyle aksotomi sonrası 24. ve 48. saatlerdeki nöronal sağ kalım için gruplara ve saatlere göre istatistiksel karşılaştırma sonuçları.....	88

1. GİRİŞ

Periferik sinirler; organlar, bezler ve kaslar ile merkezi sinir sistemi (MSS) arasındaki bilgi iletişiminden sorumludur. Çoğu periferik sinirin hücre gövdesi MSS içerisinde ya da omurilik boyunca seyreden gangliyonların içerisinde yerleşiktir. Deri ve kaslar gibi uzak hedefleri innerve eden, uzunlukları 0,1 mm ile 2 m arasında değişen akson uzantısıdır (1). Uzunlukları değişiklik gösteren aksonlar, miyelin adı verilen çok sayıda glial membran tabakaları tarafından sarılmıştır. Periferik sinir sisteminde (PSS) miyelin kılıfı Schwann hücreleri tarafından oluşturulur. PSS’de miyelin oluşturmeyen Schwann hücreleri de mevcuttur. Bu hücreler nöronlar ve hedef hücreleri arasında iletişim kurma alanları olan presinaptik sinir terminallerini oluştururlar. Schwann hücreleri de dahil olmak üzere PSS hücreleri; kemoterapi, DNA hasarı, oksidatif stres ve inflamasyona karşı hassastır. Periferik aksonların değişiklik gösteren uzunlukları bu hücreleri olağanüstü derecede savunmasız hale getirir (2).

Travmatik ya da metabolik kaynaklı olarak periferik akson iletiminde yaşanan gecikmeler, nöropati olarak adlandırılır. Periferik nöropati; hücre gövdesinden (arka kök gangliyon nöronu veya ön boynuz nöronu) uzayan aksonal projeksiyonlara ve aksonu saran miyelin kılıfına kadar periferik sinirin farklı bileşenlerinin hasarlarını ve kayıplarını ifade eden geniş anlamlı bir terimdir. Periferik nöropati altta yatan sebeplere bağlı olarak motor, duyu ve otonom sinir liflerini içerebilir (3). Periferik sinir hasarları; akson yapısı bozulmadan sadece miyelin yapısının tahrip olması (nöropraksi), epinöryum tabakasının korunup akson yapısının hasar görmesi (aksonotmezis) ya da nöronunun hasar görmesi (nörotmezis) olarak sınıflandırılmaktadır (4).

Obezite, yaşam kalitesi üzerinde sayısız olumsuz yan etkileri olan, artan morbidite ve mortalite sebepleriyle önemli bir halk sağlığı sorunudur (5). Sağlık için risk oluşturan anormal veya aşırı yağ birikimi obezite olarak adlandırılır. Bir kişinin vücut ağırlığının (kilogram olarak) boy uzunluğunun (metre olarak) karesine bölünmesiyle beden kütle indeksi (BKİ) hesaplanır. Obezite, BKİ ile belirlenir. BKİ skoru 30 kg/m² olan ve üzerine çıkan insanlar obez, 25-29 kg/m² arasındakiler ise fazla

kilolu olarak tanımlanır. Obezitenin küresel prevalansı son yıllarda önemli ölçüde artmıştır. 2016 yılında dünya genelinde 18 yaş ve üstü yetişkinlerin %13'ünün obez (erkeklerde %11, kadınlarda %15), %39'unun ise fazla kilolu oldukları rapor edilmiştir (6). Bu bağlamda dünya nüfusunun yarısından fazlası sağlık açısından risk altındadır.

Obezite ve ilgili metabolik bozuklukların, batı ülkelerinin sağlık sorunlarını artırdığı ifade edilmiştir (7). Ayrıca, obezitenin Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklara ve periferik nöropatiye sebep olduğu rapor edilmiştir (8). ABD ve Çin'de yapılan insan çalışmalarında obezite, prediyabet, diyabet ve metabolik bileşenlerin de periferik nöropatiye sebep olduğu ortaya konulmuştur (9). Epidemiyolojik çalışmalar obezitenin diyabetik periferik nöropati (DPN) riskini artırdığını göstermiştir (10, 11). DPN, diyabet hastalığının yaygın, uzun dönemli ve ilerleyici mikrovasküler bir komplikasyonudur (10, 12).

Diyabetik nöropatinin klinik belirtilerinden biri de nöropatik ağrıdır. Nöropatik ağrı, diyabetik nöropatili hastaların yaklaşık yarısını etkiler (3, 13). Nöropatik ağrı, somatoduysal sistemi etkileyen bir lezyonun veya hastalığın doğrudan bir sonucu olarak ortaya çıkar. Periferik nöropatik ağrının klinik özellikleri arasında yanma, bıçaklanma ağrıları, karıncalanma, uyuşukluk, allodini ve hiperaljezi olabilir. Kronik nöropatik ağrı, önemli ölçüde bozulmuş yaşam kalitesi ile ilişkilidir ve genellikle mevcut tedavilere cevap vermez (14). Ayrıca, periferik nöropati duyu kaybına, yürüyüş bozukluklarına, denge kaybına ve sık sık düşmelere yol açar. Bu klinik bozukluklar da kırıklar dahil deri-kas-iskelet sistemi yaralanmaları ile sonuçlanır. DPN aynı zamanda ayak ülserleri ve alt ekstremité amputasyonları için önemli bir risk faktörüdür. Hastaların engelli kalmalarına yol açarak, bireyin yaşam kalitesi üzerinde tahrip edici bir etkiye sahiptir (3, 15).

Fazla kilo ve obezitenin ana sebebi kalori alımı ile kalori tüketimi arasındaki enerji dengesizliğidir. Günümüzde, yüksek enerjili ve yüksek yağlı gıda tüketim alışkanlığı ile sedanter yaşam tarzı küresel ölçekte artmıştır. Sedanter yaşam tarzının artması, taşıma araçlarındaki konfor artışı, kolaylıkların artması, imkanların gelişmesi, şehirleşme oranının yükselmesi fiziksel hareketsizliği artırmıştır (6). Fiziksel hareketsizlik; koroner arter hastalığı, tip 2 diyabet, DPN ve bazı kanser türleri için önemli risk faktörlerindendir (6). Yüksek BKİ (obezite) ile kardiyovasküler

hastalıklar, tip 2 diyabet, DPN, osteoartrit ve bazı kanser türleri arasında güçlü bir korelasyon bulunmaktadır (6, 10). 2015 yılında küresel ölçekte diyabet için yapılan sağlık harcaması toplam sağlık harcamalarının %12'sine eşdeğerdir (3). Bu bağlamda, fazla kilolu ve obeziteye sahip yetişkinlerin sağlıklarını korumak için haftada en az 150 dakika fiziksel aktivite yapmaları, vücut ağırlığını önemli ölçüde azaltmak için ise haftada en az 250 dakika orta şiddette fiziksel aktivite yapmaları gerektiği bildirilmiştir (6).

Obezite ve obezitenin tetiklediği hastalıklar büyük ölçüde önlenabilir ve yönetilebilir niteliktedir. Bunları önlemenin ve yönetmenin en temel yolu sağlıklı yiyecekler tüketmek, fiziksel aktiviteyi artırmak (6) ve gıda kısıtlamasına gitmektir.

Kapsaisin (Kap), acı biberin temel aktif bileşenlerinden olup, ligand kapılı, güçlü, non-selektif katyon kanalı olan Transient Reseptör Potansiyel Vanilloid 1 (TRPV1) agonistidir ve etkisini yüksek derecede seçici olduğu bu kanal üzerinden gösterir. Kap aynı zamanda, nosiseptif sinir liflerinde (özellikle C tipi ve Aδ tipi) yüksek düzeyde eksprese edilir (14). Kap ayrıca antiinflamatuvar, antioksidan, antimikrobiyal, antikanser ve antiobezite gibi etkileri sahiptir (16). Kap, proinflamatuvar medyatörlerin salınımını baskılayarak ayak iltihabını ve artrit gelişimini önler. Ayrıca obezite ile indüklenen adipoz dokudaki makrofaj aktivasyonunu ile makrofaj göçünü önler; IL-6, MCP-1 salınımlarını azaltır ve adiponektin salınımını artırır. Kısaca doğal bir antiinflamatuvar ajan aktivitesi gösterir (16).

TRPV1 merkezi ve periferik sinir sisteminde bulunur. Periferik sinirlerde, TRPV1 başlıca küçük ve orta büyüklükte dorsal kök gangliyon (DRG) hücrelerinde eksprese edilir (17). Bir termal nosiseptör olan TRPV1 kanalı, sıcaklık, asidite ve irrite edici kimyasallar gibi ağırlı uyaranların tanımlanmasında önemli rol oynar (14). TRPV1 kanalları ayrıca kan damarlarından, adipoz ve karaciğer dokusundan da eksprese edilir (18). Kap, iskemi kaynaklı retina hasarında endojen somatostatin yoluyla antiinflamatuvar ve nöroprotektif etkiler gösterir (17). Kap diyabetik nöropatili hastalarda ağrıyı hafifletir, uyku kalitesini artırır (14). Yine kemoterapi kaynaklı, periferik nöropati ağrısından muzdarip kanser hastalarında belirgin ağrı kesici etki sağlar (19). Bu yüzden, Kap'ın obezitenin indüklediği inflamasyonu ve obezite ilişkili

patolojileri hafifletebileceği (16), hasarlı periferik duysal sinir liflerinin rejenerasyon ve restorasyonunu artırabileceği belirtilmiştir (19).

Aralıklı açlık (AA) kilo kontrolü için etkili ve doğal bir stratejidir. Ancak, etkinliğinin mekanizması yeterince aydınlatılamamıştır. AA rejimi, beyaz yağ dokusunu uyarır ve esmerleşmesini aktive ederek, obeziteyi, insülin direncini ve karaciğer yağlanmasını belirgin şekilde iyileştirir (7). AA beslenme döngülerinin, organizma üzerinde hafif bir stres oluşturduğu ve organizmanın koruyucu mekanizmalarının aktivitesini artırdığı bilinmektedir (2). Genetik risk faktörlerinin ve normal yaşlanmanın sebep olduğu periferik demiyelinizasyon, rodent modellerde AA veya kalori kısıtlaması uygulanarak azaltılmıştır (2). AA, Charcot-Marie-Tooth hastalığının fare modelinde (20) ve spinal kord yaralanmasının fare modelinde (21) fonksiyonel iyileşme sağlamıştır. Nöropatik farelerin motor fonksiyonlarında gözlenen faydalı etkiler, sinir morfolojisi, aksonal bütünlük ve miyelin proteinlerinde genel bir iyileşmeye bağlanmıştır (20). AA'nın, bir mutant miyelin proteini ekspresyonundan kaynaklanan dejeneratif olayları yavaşlattığı, aksonal ve nöromusküler fonksiyon kaybını azalttığı bildirilmiştir (2).

Bu çalışmada; obez fare modelinde obezite kaynaklı periferik nöropatinin gelişimi izlenmiş, kapsaisin ve aralıklı açlığın periferik nöropati üzerindeki rejeneratif ve restoratif etkileri değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Obezite

Obezite BKİ'nin 30 kg/m²'nin üzerine çıkması olarak tanımlanır (22). Yaşam kalitesi üzerine çok sayıda olumsuz yan etkileri olan obezitenin, morbidite ve mortalite oranları da çok yüksektir. Küresel ölçekte obezite oranı 1980'den beri iki kattan fazla artmış, 2017 yılı itibarıyla 650 milyon yetişkin obez sınıfına girmiştir (23). Fazla kilodan her yıl dünya genelinde 4 milyon insan hayatını kaybederken, bunun 1,5 milyonunu obez olmayan kilolu insanlar oluşturmaktadır (24).

2.1.1. Obezite Etiyolojisi

Obezitenin etiyolojisinde, genetik polimorfizm; açlık, tokluk ve iştah duyularını düzenleyen hipotalamik sinyallerde işlevsel bozukluk; adipokinler tarafından tetiklenen proinflamatuvar salınımdaki artış, tuz ve doymuş yağlarca zengin yoğun gıda alımı kaynaklı enerji fazlalığı vardır (25).

2.1.2. Obezite Fizyopatolojisi

Obezite, aşırı yağ birikimi ve kronik inflamatuvar bir durum ile karakterize edilen; insülin direnci, tip 2 diyabet, hiperlipidemi, hiperkolesterolemi, arteriyel hipertansiyon, kardiyovasküler hastalık, obstrüktif uyku apne sendromu, kas-iskelet bozuklukları ve çeşitli kanser türleri gibi diğer hastalıkların gelişimine de katkıda bulunan metabolik bir bozukluktur (25-27).

Hem aşırı yağ (obezite) hem de yağ yoksunluğu (lipodistrofi); diyabet, metabolik sendrom (MetS) ve kardiyovasküler hastalık riskini artırmaktadır (28). Mitokondriyal fonksiyon bozukluğu hem obezite hem de lipodistrofinin sebep olduğu adipoz doku fonksiyon bozukluğuyla ilişkilidir (28).

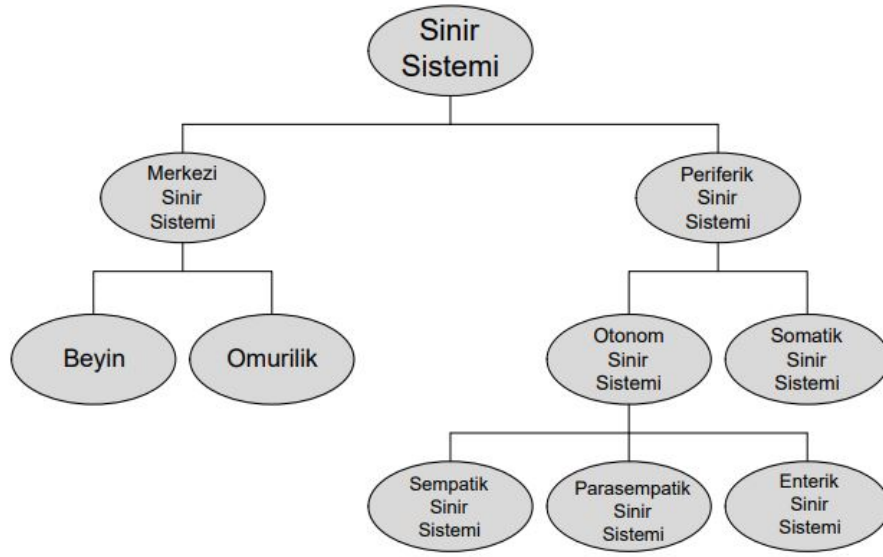
Metabolik sendrom kriterleri; diyabet (açlık kan glikozu ≥ 126 ya da iki saatlik glikozun ≥ 200), prediyabet (açlık kan glikozu ≥ 100 ya da iki saatlik glikozun ≥ 140), BKİ ≥ 30 , sistolik kan basıncı ≥ 130 ya da diyastolik kan basıncı ≥ 85 , trigliserit ≥ 150 mg/dl, yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) erkeklerde < 40 mg/dl ve kadınlarda < 50 mg/dl olduğu durumlar olarak tanımlanmaktadır (9).

Memelilerde iki tip adipoz doku (kahverengi ve beyaz) mevcut olup mitokondriyal içerik ve fonksiyon bakımından farklıdırlar. Kahverengi adipoz doku, mitokondri bakımından zengin olup hem glikoz hem de yağ asidinin oksidasyonunu gerçekleştirir. Kahverengi adipoz doku mitokondrisinde, iç zar boyunca proton sızıntısına izin veren ve termogenez yoluyla yüksek düzeyde enerji harcamasına sebep olan (UCP1) eksprese edilir (28). Beyaz yağ doku daha az mitokondri içermesine rağmen, adipojenik farklılaşmayı gerçekleştirmekte ve adipokin sekresyonunu artırmaktadır (28). Adipoz dokudaki mitokondriyal fonksiyon bozukluğu obezite, tip 2 diyabet ve MetS ile ilişkilidir (28).

Aşırı yağlanma ve aşırı beslenme, farklı kanser türleri riskini (endometrium, safra kesesi, böbrek, rektum, menopoiz sonrası meme, pankreas, tiroit, kolon ve özefagus, lösemi; multipil myeloma; Non Hodgkin lenfoma; ve habis melanom) arttırır (29). Obezite, Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklara ve periferik nöropatiye sebep olur (8, 30). Obezite, prediyabet ve diyabet periferik nöropatiye yakından ilişkilidir (9). Deneysel bir çalışmada, obezite ve diyabetin (tip 1 ve tip 2), glikoz klirensini bozduğunu, deride motor sinir ileti hızını, duysal sinir ileti hızını, termal duyarlılığı, mekanik duyarlılığı ve intraepidermal sinir lifi yoğunluğunu azalttığı ortaya konmuştur (31).

2.2. Sinir Sistemi

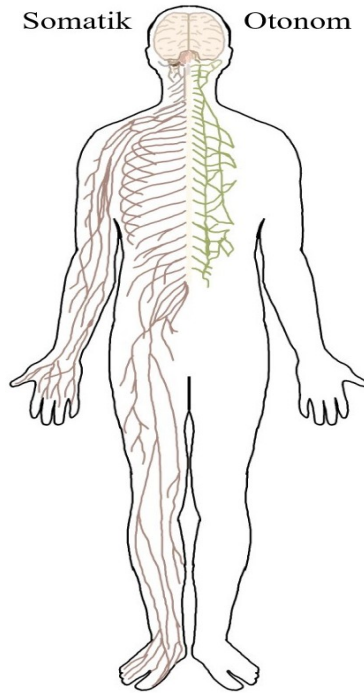
Omurgalı sinir sistemi, MSS ve PSS olmak üzere iki ana birimden oluşur. İşlevsel olarak özelleşmiş nöronlar ve glial hücre tipleri ile karakterizedir (32). MSS'deki nöron topluluklarına nükleus, akson topluluklarına traktus denirken; PSS'deki nöron topluluklarına gangliyon, akson topluluklarına ise sinir denmektedir. Sinir sisteminde bulunan glia hücreleri; MSS'de astrositler, oligodendrositler, ependim hücreleri ve mikrogia; PSS'de ise Schwann hücreleri ve satellit hücreleridir. MSS beyin ve omuriliği kapsarken; PSS somatik, otonom ve enterik sinir sistemi ile ilişkili sinirleri ve gangliyonları kapsar (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Sinir sisteminin sınıflandırılması.

2.2.1. Periferik Sinir Sistemi

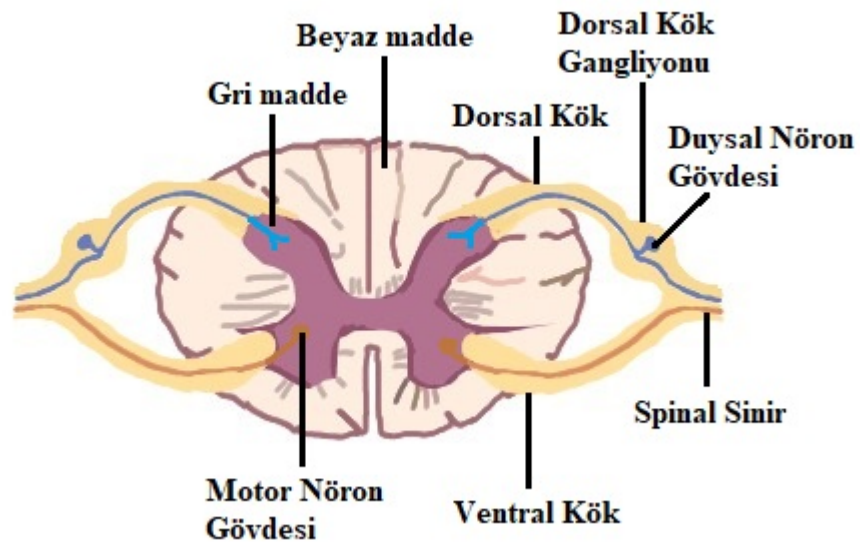
PSS organlar ve beyin arasındaki sinyal iletiminden sorumlu olup, temel olarak fizyolojik fonksiyonları ve davranışları düzenler (32) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Periferik sinir sistemi.

Somatik sinir sistemi duyu ve motor sinirleri içerir, motor sinirler istemli hareketlerden sorumludur. Otonom sinir sistemi istem dışı fizyolojik fonksiyonları kontrol ederken, enterik sinir sistemi ise sindirim sistemi işlevlerini düzenler (33, 34). Anatomik olarak PSS kranial sinirleri, spinal sinirleri ve organların etrafındaki lokal nöral ağları kapsamaktadır (34).

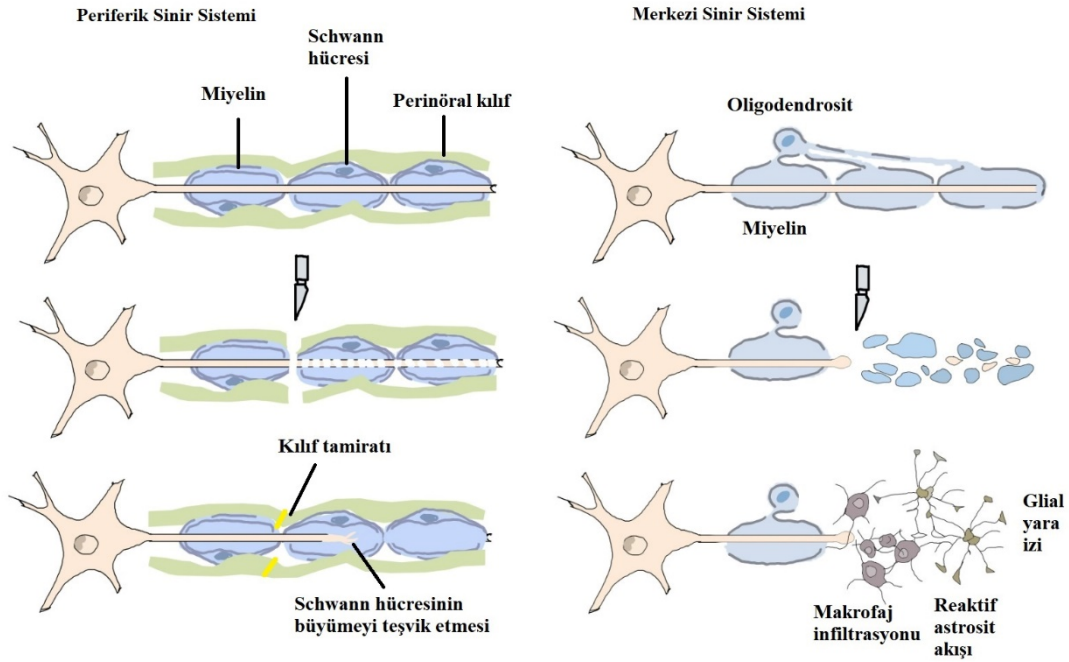
Somatik periferik sinirlerde her bir spinal sinir iki kökün füzyonuyla oluşmuştur. Dorsalde duyu nöron gövdeleri bulunurken, ventralde ise motor nöron gövdeleri bulunmaktadır (Şekil 2.3). Bu iki kök spinal siniri oluşturur. Sekiz çift servikal, on iki çift torakal, beş çift lumbal, beş çift sakral ve bir çift koksigeal sinir mevcuttur. Spinal sinirler spinal korda vertebralar arasındaki arka kökten girer, ventral kökten çıkarlar. Her bir vertebradan çıkan duyu ve motor sinirler anatomik seviyede benzer bölgelerden bilgi alır ve benzer bölgelere komutları ulaştırır. Servikal omurilik seviyesi boyun ve üst ekstremitelere, torasik omurilik seviyesi torakal organlara ve göğse ayrılmıştır. Lomber omurilik seviyesi, karın organlarına, alt uzuvlara (kısmen) ve karına, sakral pleksus ise pelvik organlara ve alt uzuvlara ayrılmıştır. Bu, omuriliğin “metamerik” olarak adlandırılan organizasyonunu temsil eder. Her bir spinal sinir binlerce duyu ve motor lifleri içeren sıkı bir bağ doku içerisindeki fasiküllerden oluşmaktadır. Bu da dışardan gelebilecek baskı ve tahrifata karşı ciddi bir koruma sağlar (34).



Şekil 2.3. Periferik sinirlerin spinal organizasyonu ve dorsal kök gangliyonu.

Periferik sinirlerdeki ileti hızı Schwann hücrelerinin oluşturduğu miyelin miktarıyla ilişkilidir. Schwann hücreleri miyelin kılıf üretimi rolünün yanı sıra hem miyelinli hem de miyelinsiz sinirlerin beslenmesinden de sorumludur. Sempatik ve parasempatik sistem solunum, kardiyovasküler, sindirim ve endokrin gibi visseral sistemlerin işlevlerinin düzenlenmesinden sorumludur. Hipotalamus ve limbik sistem gibi daha üst merkezler ise otonom sinir sistemini koordine eder (34).

Somatik motor nöronlar, otonom sinir sisteminin pregangliyonik nöronları ve bazı duyu nöronları Schwann hücreleri tarafından oluşturulan miyelinle sarılırlar. Schwann hücreleri, aksonun etrafını sıkıca birkaç kat halinde birbirlerine komşu segmentler oluşturarak sarar. Bu miyelin segmentler arasına ranvier nodları olarak adlandırılan kısımlarda çok sayıda voltaj kapılı sodyum kanalları mevcuttur. Ranvier nodları akson membranı boyunca iletinin sıçrayıcı bir şekilde daha hızlı ilerlemesine izin veren özelleşmiş yapılardır. Post gangliyonik otonom sinir sistemindeki duyu nöronları miyelinsiz olup bir tek katman halinde Schwann hücreleri tarafından sarılmışlardır (34). Schwann hücreleri aynı zamanda travmalara karşı rejenerasyonu teşvik edici özelliğe de sahiptir, bu özellik oligodendrositlerde mevcut değildir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. PSS'de Schwann hücrelerinin, MSS'de ise oligodendrosit hücrelerinin rejenerasyondaki rolleri.

2.2.2. Duysal Liflerin Fizyolojik Sınıflandırılması

A lifleri:

- Kalın miyelinli liflerdir.
- Alfa, Beta, Gama, Delta alt tipleri vardır.
- Sinyal iletim hızları 120 m/sn'ye kadar çıkar (Şekil 2.5)(35).

C lifleri:

- İnce, miyelinsiz liflerdir.
- Sinyallerin iletim hızları düşüktür.
- En ince lifler sinyalleri 0.5 m/sn hızla iletir (Şekil 2.5)(35).

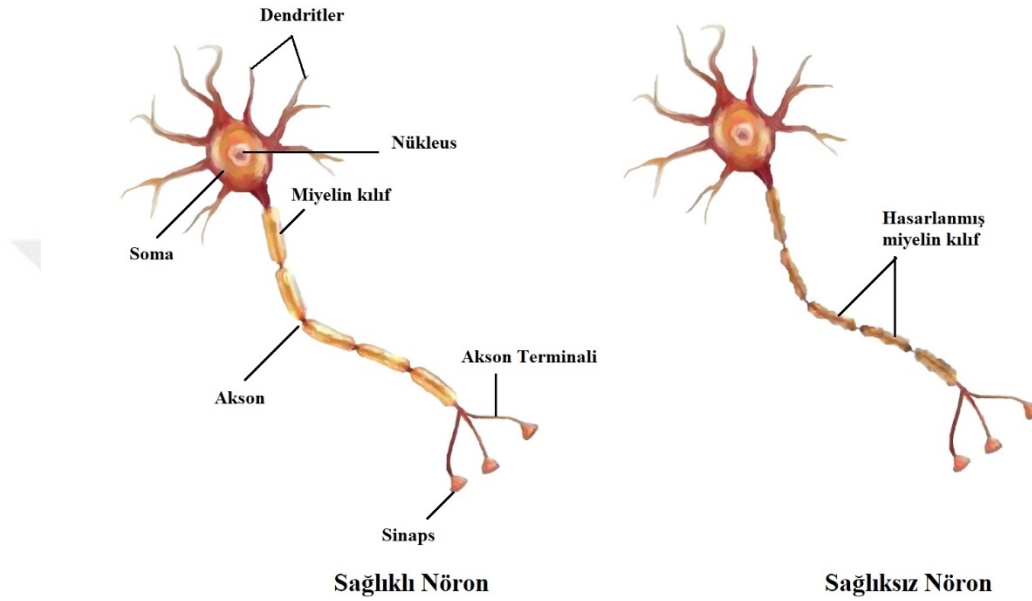
	A α	A β	A δ	C
				
Çap (μm)	13-20	6-12	1-5	0,2-1,5
Hız (m/s)	80-120	35-75	5-30	0,5-2
İşlev	Propriosepsiyon	Mekanoreseptör	Ağrı, ısı	Ağrı, ısı, kaşıntı

Şekil 2.5. Duysal liflerin genel sınıflandırılması.

2.2.3. Duysal Liflerin Patofizyolojisi

Çapı küçük, miyelinsiz ve ince miyelinli lifler termal ve mekanik ağrı bilgilerini, yaralanma ve yanma bilgilerini iletirken nöropati gelişimi durumunda; karıncalanma, elektrik şokları, hiperaljezi (ağrılı uyaranlara karşı artan hassasiyet) veya allodini (zararsız bir uyarana karşı ağrılı his) görülür (Şekil 2.6). Orta ve büyük çaplı miyelinli duysal lifler, titreşim ve eklem pozisyon bilgisini iletirken, nöropati gelişimi durumunda uyuşma, dengesizlik ve yaranlanmalar görülür. Büyük miyelinli

motor aksonlarda meydana gelen hasarlanma, distal güçsüzlük ve atrofiye yol açar. Otonom nöropatilerde ise kardiyovasküler (ortostatik hipotansiyon), gastrointestinal (kabızlık, bulantı veya ishal), ürogenital (nörojenik mesane veya erektil disfonksiyon) ve sekretomotor (anormal terleme) sistemlerde farklı semptomlar görülebilir (36).



Şekil 2.6. Sağlıklı ve hasarlı nöronların yapısal özellikleri.

2.3. Nörotrofik Faktörler

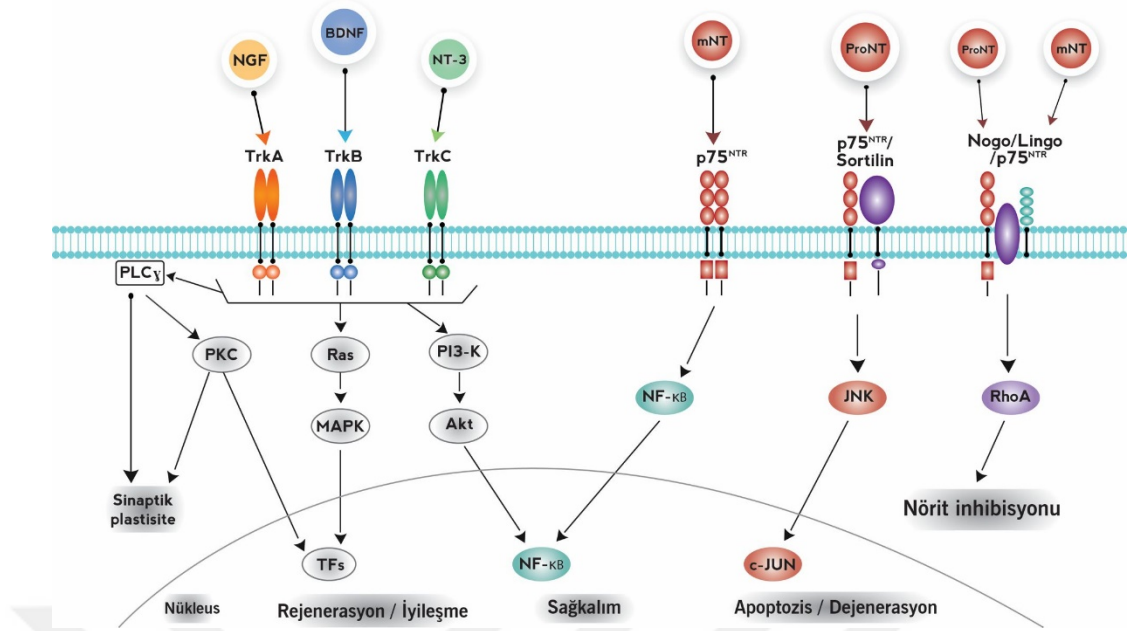
Nörotrofik faktörler (nörotrofin), MSS ve PSS’de nöronların hayatta kalmalarını, büyümelerini ve farklılaşmalarını teşvik eden protein yapılı moleküllerdir. Memelilerde birçok nörotrofin bulunmuştur. İnsanlarda bilinen ve tirozin kinaz (Trk) reseptörlerini kullanan nörotrofinler şunlardır: Sinir Büyüme Faktörü (NGF), Beyin Türevli Nörotrofik Faktör (BDNF), Nörotrofin 3 (NT3) ve Nörotrofin 4/5 (NT4/5) (33). Tüm bu moleküller düşük afiniteyle p75 reseptörüne bağlanabilir (37). Ek olarak, NGF spesifik olarak tirozin kinaz A (TrkA) reseptörüne; BDNF ve NT4/5 tirozin kinaz B (TrkB) reseptörüne ve son olarak NT3 tirozin kinaz C (TrkC) reseptörüne (ve bir dereceye kadar ilk ikisine) bağlanır (Şekil 2.7). Tüm Trk reseptörleri, bir tirozin kinaz alanına sahip membran reseptörleridir (33).

NGF: Hücrenin gelişiminde, aksonal filizlenme ve dendritik dallanma önemli rol oynar (38). İlk keşfedilen ve en iyi karakterize edilmiş nörotrofik faktördür. Memelilerde periferik duyu ve sempatik nöronlar ile ön beyindeki kolinerjik nöronların yaşamasını ve gelişimini teşvik eden nörotrofik faktördür (39). Periferik duyu ve sempatik sinirlerde büyüme ve gelişmeye olan katkısının yanı sıra nörotransmitter salınımı ve nöropeptit sentezinde de rol oynar (39). NGF'nin yüksek seviyedeki ekspresyonu sinir sisteminde ve diğer dokularda doku rejenerasyonunun yanında hem farklılaşmayı hem de fonksiyonel iyileşmeyi destekler (40).

BDNF: Hücrenin hayatta kalması, farklılaşması, sinaptik plastisite, dendritik filizlenme, uzun süreli güçlenme ve nöronal ağ gelişiminde önemli rol oynar (37). İkinci keşfedilen nörotrofik faktördür. Ayrıca hipokampüste yüksek ekspresyona sahip olması hafıza ve öğrenmede de rol alabileceğini düşündürmektedir. Yine akson hasarı sonrası rejenerasyon ve remiyelinizasyonu teşvik ettiği bildirilmiştir. BDNF ekspresyonundaki azalmada majör depresif bozukluk ve bipolar bozukluk dahil olmak üzere duygu-durum bozuklukları ile Alzheimer, Parkinson ve Huntington hastalığı gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (40).

NT3-NT4/5: Nöronal hayatta kalma ve farklılaşmada önemli rol oynar (37, 38). NT3 özellikle embriyonik dönemde duyu ve adrenerjik nöronların sağkalımında rol oynarken, MSS'de ise bağlantıların güçlenmesinde ve sinaps oluşumunda etkilidir. Ayrıca beyindeki olgunlaşma döneminde seviyesi iyice azalırken, periferik dokularda ise bulunmaktadır (41). NT4/5 ise özellikle NMDA reseptör aktivasyonunu artırır (42).

Tüm nörotrofinler başlangıçta pro-nörotrofinler olarak bilinen öncü proteinler olarak sentezlenir. Bu pro-nörotrofinler daha sonra, stabil olgun nörotrofinler oluşturmak için furin veya prokonvertazlar tarafından hücre içinde veya metaloproteazlar ve plazmin tarafından hücre dışında bölünebilir. Olgun nörotrofinlerin, nörotrofik etkiler gerçekleştirmek için seçici olarak kendi reseptörlerine bağlandıkları, oysa pro-nörotrofinlerin p75^{NTR}/sortilin reseptörüne bağlandıkları ve bu yolak üzerinden pro-apoptotik etkiler gerçekleştirdikleri saptanmıştır.



Şekil 2.7. p75^{NTR} ve Trk reseptörleri aracılığıyla nörotrofin sinyal mekanizması.

NGF, sinir büyüme faktörü; BDNF, beyin kaynaklı nörotrofik faktör; NT-3, nörotrofin-3; Trk, tropomiyosin reseptör kinaz; mNT, olgun nörotrofin; ProNT, pronörotrofin; p75^{NTR}, pan nörotrofin reseptörü 75; PLCγ1, fosfolipaz C gama bir;

PKC, protein kinaz C; MAPK, mitojenle aktive olan protein kinaz; TF'ler, transkripsiyon faktörleri; PI3-K, fosfoinositol 3-kinaz; NF-κB, aktifleştirilmiş B hücrelerinin nükleer faktör kappa-hafif zincir güçlendiricisi; JNK, c-Jun N-terminal kinaz.

Nörotrofik faktörler Trk reseptörlerinin aktivasyonunu fosforile ederek fosfolipaz C gama-1(PLC-γ1) ile ilişkili ikinci mesajlaşma sinyal yolunu etkinleştirir. PLCγ aktivitesi genellikle iki farklı ikinci haberci sistemi üretir: inositol-3-fosfat (IP3) ve diaçilgliserol (DAG), her ikisi de hücre içi kalsiyum (Ca²⁺) salınımını artırır ve protein kinaz C(PKC) aracılı sinyali uyarak gelişmiş nöronal ve sinaptik plastisite ile sonuçlanır (Şekil 2.7) (38). Genel olarak Trk reseptörü, hücrelerin hayatta kalması, çoğalması ve farklılaşmasını sağlayacak cAMP bağlayıcı protein (CREB) ve nükleer faktör kappa B (NFκB)'nin aracılık ettiği gen ekspresyonları sayesinde ya fosfatidil inositol 3 kinaz-Akt (PI3k/Akt) ya da mitojen aktiviteli protein kinaz-ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz (MAPK/ERK) sinyal yollarını kullanarak etkisini gösterir (43). Trk reseptörleri, ERK üretmek için MAPK sinyal yolunu daha da aktive eden küçük bir guanozintrifosfat bağlayıcı protein olan Ras'ı aktive ederek, nöronal farklılaşmayı ve nörit büyümesini kontrol eden genlerde transkripsiyonel değişikliklere sebep olarak CREB dahil bir dizi transkripsiyon faktörünü fosforile ve aktive eder (44). Trk reseptörleri tarafından aktive edilen diğer bir ana yol, nükleer faktör kappa B (NF-κB) aracılı nöronal sağ kalımı teşvik etmek için serin / threonin

kinaz Akt'nin aşağı akış aktivasyonuna yol açan PI3-K yoludur. PI3K/Akt sinyal yolunun, fizyolojik ve patolojik koşullar altında hücre büyümesinin, proliferasyonunun ve hayatta kalmasının düzenlenmesinde merkezi bir rol oynadığı, hipokampal nöron kültürlerinde aksonal filizlenmeye katkıda bulunduğu, ayrıca inme sonrası fonksiyonel iyileşmeye katkı sağladığı belirtilmiştir (Şekil 2.7).

ProNGF'nin olgun NGF'ye dönüşmesi nöronal yaşam için çok önemlidir. Çünkü proNGF p75 reseptörüne bağlanır ve akabinde nöronun apoptoza gitmesini sağlayan mekanizmaları tetikler (43). NGF, nöronların gelişimlerinden ölümlerine kadar çeşitli nörofizyolojik ve bilişsel kabiliyetler gibi birçok işlevde görev alır (43). NGF'in büyüme konusunda, tubulin ve aktin gibi hücre iskeletindeki değişiklikleri indüklediği belirtilmiştir (45).

NGF-TrkA sinyalizasyonu TRPV1 kanal ekspresyonunu artırmaktadır. Bu kanallar, Kap (acı kırmızı biberin keskin bileşeni) ve resiniferatoksin gibi vanilloidler, yüksek ısı ($>43^{\circ}\text{C}$), asit ($\text{pH}<5$), hücresel voltaj değişikliği, oksidatif stres ve inflamatuvar medyatörler ile aktive olmaktadır. Ayrıca bu kanalın özellikle nöronlarda ve daha ziyade DRG hücrelerinde inflamatuvar ve ağrı mekanizmaları üzerinde önemli rol üstlendiği daha sonra yapılan araştırmalarda anlaşılmıştır. Aynı zamanda, bu kanalların PKA ve PKC gibi ikinci haberciler vasıtasıyla aktive olduğu da kanıtlanmıştır (46). NT-3 antinosesepsiyonda, NT-4 ise propriyosepsiyonda rol almaktadır. Trk reseptörlerinin aktivasyonları aşağı akış sinyalleme mekanizmalarından Ras-MAPK yolağı üzerinden rejenerasyon ve iyileşmeyi, PI3K-Akt yolağı üzerinden nöronal sağ kalımı, PLC- γ 1 yolağı üzerinden ise doğrudan ya da PKC üzerinden sinaptik plastisiteyi, sadece PKC üzerinden rejenerasyon ve iyileşmeyi başlatmaktadır. p75^{NTR} 'nin aktivasyonu nöropatik ağrıda Trk aracılı sinyalleme güçlendirebilir (47). NGF, PSS'de somatoduysal ve sempatik nöronların, MSS'de ise bazal ön beyin kolinerjik nöronlarının hayatta kalmaları ve işlevleri için anahtar rol oynayan ve ilk keşfedilen nörotrofindir (48, 49). Ras-MAPK aktivasyonu ayrıca, nöronal farklılaşmayı, nörit büyümesini ve nöroplastisiteyi teşvik etmektedir (44, 50). TrkA ve TrkB'nin NGF ve BDNF kaynaklı aktivasyonunu takiben; lumbal DRG'lerde ve omurilikte artırılmış p38, MAPK ve ERK sinyal yolağı, kronik ağrı patobiolojisinde rol oynamaktadır (51, 52). Ras-MAPK yolağı dolaylı olarak PI3K sinyalleşmesini de aktive etmektedir (44). PI3K'da Akt sinyalleşmesini artırmaktadır

(53). PLC- γ 1 aktivasyonu, IP3 ve DAG üretimini indüklemektedir. IP3 ise hücre içi depolardan Ca^{2+} salınımını başlatarak, PKC ve kalmodulin ile düzenlenen protein kinaz yollarını harekete geçirmektedir. DAG ise DAG-üretimi ile düzenlenen PKC izoformlarının aktivasyonuna yol açmaktadır (54). Ancak hem IP3 hem de DAG ile düzenlenen sinyal yollarının sinaptik ve yapısal nöroplastisite ile ilişkili olduğu (55) ve PKC'nin, merkezi duyarlılaşma ve kalıcı ağrının gelişiminde rol oynadığı belirtilmiştir (47, 56, 57).

2.3.1. Kalori Kısıtlaması ile Nörotrofik Faktörler Arasındaki İlişki

Kalori kısıtlamaları ve diyet değişiklikleri serum NGF ve BDNF seviyelerinde bir artışa sebep olmakta ve bilişsel performanslarda iyileşmeye yol açmaktadır (43). NGF, sıçan sempatik nöron kültürlerinde p75^{NTR}'ye bağlı mekanizmalar üzerinden kolinerjik sinaptik iletimi düzenler (58). NGF ayrıca, sadece sinaptik iletimi ve plastisiteyi artırmakla kalmaz, aynı zamanda sinapsları toksik hasardan koruma rolünü de üstlenir (43). NGF'lerin mitokondriyal biyogenezi teşvik ederek, redoks reaksiyonlarını düzenleyerek, hücresel enerji dengesini koruyarak sinaptik işlevlere aracılık ettiğine inanılır (43). Egzersiz ve dayanıklılık eğitimleri (59, 60), kalori kısıtlamaları, diyet değişiklikleri (61, 62) NGF homeostazının yeniden kazanılmasına yardımcı olabilir. NGF, bilişsel performansı geliştirmek (63, 64) ve nörobilişsel işlev bozukluklarını tedavi etmek için klinikte kullanılabilir. İnsanlarda, istirahat esnasında beyinden önemli miktarda BDNF salınımının gerçekleştiği, egzersiz sırasında bu salınımın iki ila üç kat arttığı bildirilmiştir. Farelerde egzersiz aktivitesinin, hipokampus ve korteks bölgelerinde BDNF ekspresyonunu üç ila beş kat artırdığı, korteks ve hipokampusun BDNF ekspresyonu için ana bölgeler olduğu bildirilmiştir (65). CREB ve BDNF ekspresyonları ile bilişsel işlevler arasında bir ilişki olduğu saptanmıştır. En hızlı öğrenme ve en iyi hatırlama kabiliyetine sahip farelerin, aynı zamanda en yüksek seviyede CREB ve BDNF ekspresyonu içerdikleri tespit edilmiştir (43).

2.4. Periferik Nöropati

Periferik nöropati, sinir lifleri ve miyelin kılıfta değişen ve farklı derecelerdeki hasarı ifade eden genel bir hastalık terimidir (33, 36).

Periferik nöropati hastalarda ağrıya, yaşam kalitesinin azalmasına, düşmelere, ülserasyonlara ve amputasyonlara sebep olmaktadır (9).

Nöropatiler kendi içinde farklı kollara ayrılmaktadır. Bunlar; distal duyu nöropatileri (diyabetik periferik nöropati, kriptojenik duyu periferik nöropatisi, toksik ve besinsel nöropatiler, monoklonal gammopati, kalıtsal nöropatiler), duyu nöropatisi, mononörit multipleks, poliradikulonöropatisi, motor nöropatiler (simetrik motor nöropatisi, asimetrik motor nöropatisi), mononöropati ve akut nöropatidir (36).

Metabolik sendrom bileşenlerinin sayısı arttıkça periferik nöropati prevalansının arttığı gözlemlenmiş ve periferik nöropatinin sebeplerinden biri olarak gösterilmiştir (9). Ancak, tek tek bileşenlerin katkılarını araştıran çalışmalar çelişkili sonuçlar ortaya koymuş olsa da obez ve yaşlı popülasyon çalışmalarında diyabet, prediyabet ve obezitenin periferik nöropati ile ilişkili ana metabolik bileşenler olduğu gösterilmiştir (9).

Metabolik sendroma sahip bireylerin glisemik indeks durumları göz önüne alındığında, glisemik indeks seviyeleri yüksek bireylerin distal simetrik polinöropatiye yatkınlıkları artmaktadır (9). Hiperglisemiye ek olarak diyabet, fazla kilo ve MetS periferik nöropati ile yakın ilişkilidir (9). Obez hastalarda, distal simetrik polinöropati, küçük lif nöropatisi ve kardiyovasküler otonomik nöropati gibi çok sayıda periferik nöropati gelişebilir (66).

2.5. Aralıklı Açlık

Aralıklı açlık; günün belirli saatlerinde ya da haftanın belirli günlerinde enerji içeren hiçbir besin maddesinin alınmadığı bir diyet programıdır. Spesifik AA diyetleri; her gün tam açlık, her gün %70 enerji kısıtlaması, haftada iki ardışık gün yalnızca 500-700 kalori alımı ve gıda alımını günde 6-8 saatlik bir zaman periyoduyla sınırlamak şeklinde olabilir (67). Sonuçlar, AA diyetlerinin tiplerine bağlı olarak kantitatif olarak farklılık gösterse de AA rejimleri; normal öğün aralıklarında kan glikoz seviyesinin referans aralıkta korunmasını, glikojen depolarının harcanmasını, yağ asitlerinin mobilizasyonunu, keton oluşumunu, kanda leptin seviyesinin azalmasını ve adiponektin düzeyinin sıklıkla yükselmesini sağlamaktadır (67).

2.5.1. Aralıklı Açlığın Fizyolojik Etkileri

Kalori kısıtlaması ve AA'nın pek çok yararlı etkileri vardır. Kalori kısıtlaması ve aralıklı açlığın yaşam süresi üzerindeki etkileri aynı seviyededir. AA uygulamasının, meme kanseri, prostat kanseri, pankreas kanseri; kardiyovasküler hastalıklar, serebrovasküler hastalıklar ve tip 2 diyabet gibi metabolik hastalıklarda kalori kısıtlaması ile ya aynı seviyede ya da daha iyi etkiler gösterdiği bildirilmiştir (67).

Aralıklı açlığın faydaları arasında artmış metabolik yakıt kullanımı, azalan sistemik inflamasyon, dolaşımda azalan insülin benzeri büyüme faktörü (IGF)-1 ve apoptoz modülasyon yoluyla arttırılmış hücresel sağ kalım ve güçlendirilmiş hücresel korunma sayılabilir (68).

Kemirgenlerde alternatif gün açlık uygulaması ile yapılan 8-24 haftalık çalışmalarda; kalp hızında, kan basıncında, glikoz, kolesterol ve trigliserit konsantrasyonlarında azalma gözlenmiştir (69).

Sağlıklı bireylerde AA diyetine cevap; ketogenez, serum bilirubin ve üre seviyesinde artma, insülin hormonu ve IGF-1 seviyelerinde azalma ve otofajinin aktivasyonu ile karakterizedir. Dolaşımdaki yüksek glikoz, lipolizi baskılamak, insülin lipoliz ve ketogenezi baskılar (70). Ayrıca, nörodejeneratif hastalıklarda fonksiyon kaybını geciktirir, hastalıkların ilerleyişini yavaşlatır (7).

Enerji kısıtlaması, fazla kiloyu azaltır, meme kanseri riskini düşürür, tümör gelişimini engeller ve yaşam süresini uzatır. Enerji kısıtlaması, hücresel stres direnç yollarının regülasyonunu artırarak sitoprotektif etkiler ortaya çıkaran düşük yoğunluklu bir stres faktörü işlev görür (29). Uzun süreli açlık ya da açlığı taklit eden diyetler, kemoterapinin ve yaşlanmanın immünsupresif etkilerini, hematopoietik kök hücre rejenerasyonunu artırmak suretiyle tersine çevirebilmektedir (31).

Aşırı kilolu veya obez annelerin yavruları fazla kilolu doğmaktadır. Gebelik ve emzirme dönemlerinde annede meydana gelen metabolik değişiklikler yavrularda hiperinsülinemi, insülin direnci ve glikoz intoleransı gibi obezite ile ilişkili hastalıkları ortaya çıkarabilmektedir (71).

Aralıklı açlık, oksidatif ve apoptotik hasarı önlemektedir (72, 73). Kalori kısıtlaması ise oksidatif stresi azaltmakta, vücut ağırlığını ve vücut ısını düşürmekte (74), nöronal toksisiteyi iyileştirmektedir (75).

2.5.2. Aralıklı Açlığın Sinir Sistemi Üzerine Etkileri

Otonom sinir sistemi, leptin tarafından modüle edilen enerji depolanma ve harcanmasındaki değişiklikler yoluyla vücut ağırlığının uzun vadeli düzenlenmesini sağlar. Otonomik nöropati, otonom sinir sisteminin periferik ve merkezi sinir sistemi bileşenleri arasında etkili iletişim yeteneğini azaltır, daha fazla kilo alımına ve obeziteye sebep olur. Ayrıca, nöro-humoral uyaranları azaltır, hipotalamustaki tokluk merkezinin harabiyetine yol açar (76). Beyaz yağ dokusunun sempatik denervasyonu adiposit hücre sayısında artışa ve lipolizde azalmaya sebep olur (76, 77).

Sempatik sinir sistemi, kahverengi yağ dokusu termojenezini teşvik ederek ya da kardiyovasküler sistem üzerinde pozitif inotropik ve kronotropik etkiler yaparak enerji tüketimini artırır: (76).

Kahverengi adipoz doku karışık sinir lifleri ile parankim boşluklarda arada kan damarları olmadan doğrudan temas halindedir. Özellikle küçük miyelinsiz aksonların yağ hücreleriyle sıkı bir şekilde ilişkili olduğu bu sinir akson terminallerinin bazılarının adiposit yüzeyinin invajinasyonlarına gömülü olduğu ve katekolamin içeren sinaptik veziküllere sahip olduğu bilinmektedir. Birden fazla memeli türünde kahverengi yağ dokudaki uyarlanabilir termojenezin katekolamin salınımını tetiklediğine ilişkin bilgiler artan kanıtlarla desteklenmektedir. Ayrıca kahverengi ve beyaz yağ doku makrofajlarının soğuğa cevap olarak katekolaminleri sentezlediği öne sürülmüştür (77).

Sıçanlarda aralıklı açlık; beyin ve kalpte doku hasarını azaltır (78), hipokampal nöronlarda eksitotoksik hasarı önler (79), otofajiyi artırır (29, 80).

Yüksek yağlı diyetle beslenen ratların birinci nesil yavrularında dalak, karaciğer, böbrek üstü bezi ağırlıkları, total kolesterol, HDL, LDL ve trigliserit seviyelerinin normal diyetle beslenenlere göre yüksek olduğu, üçüncü nesil yavrularının ise vücut ağırlıklarının daha fazla olduğu bildirilmiştir (81).

2.6. Kapsaisin

Kapsaisin, acı biberde bulunan ve acı özelliğini veren aktif bir bileşendir. Kap, nöronlarda TRPV1 kanalı için oldukça seçici bir agonisttir (82) ancak makrofajlar gibi nöronal olmayan hücrelerde etkisini NFκB yolu üzerinden gerçekleştirmektedir (16). Kap, termoregülasyonu etkileyebilen, otonom refleksleri tetikleyebilen ve yüksek oranda emilebilen keskin kokulu bir moleküldür (83).

2.6.1. Kapsaisinin Fizyolojik Etkileri

Kapsaisin kilo vermede ve obeziteyi iyileştirmede etkilidir. İnsanlarda, diyetle kapsaisin eklenmesi doyumluk hissi oluşturarak gıda alımını azaltmaktadır (84).

Kapsaisin hücre içine Ca^{2+} girişini artırarak P maddesi ve kalsitonin gen ilişkili peptid (CGRP) gibi nörotransmitterlerin salgılanmasına sebep olur. Ayrıca, glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) salgısını arttırıp, ghrelin salgısını azaltır. İnce bağısaktaki TRPV1 kanallarının aktivasyonu ile GLP-1 sekresyonu gerçekleşir. GLP-1 insülin salgılayan β hücre kütlelerinin artmasını sağlayan bir inkretin hormondur (83). Yüksek veya tekrarlanan dozlarda kapsaisine maruz kalma TRPV1'in duyarsızlaşmasına yol açarak analjezi sağlar (84). Kap, ağrı yönetiminin yanı sıra, obezite ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde de faydalı olabilir (85). Kap ayrıca, antipruritik, antiinflamatuvar, antiapoptotik, antikanser, antioksidan ve nöroprotektif etkilere de sahiptir (83).

Kapsaisin içeren diyetlerde bulunan acı biber, sağlıklı yetişkinlerde hiperinsülinemiyi hafifletmektedir (86). Takviye tarzında kullanımlarda gestasyonel diyabetes mellituslu kadınlarda yemek sonrası hiperglisemi ve hiperinsülinemiyi iyileştirmektedir (87). Sağlıklı erkeklerde oral kullanım, glikozu düşürüp insülin seviyesini yükseltmektedir (88). Kap, adipokin salınımını modüle ederek obeziteye bağlı inflamasyonu baskılamaktadır (16). İnsülin direnci ve karaciğer hastalıkları gibi obezite ile ilişkili metabolik bozuklukları iyileştirmek için faydalı bir fitokimyasaldır (89).

Kapsaisin, MSS'yi aktive ederek adrenal medulladan katekolamin sekresyonunu artırmakta, artan sempatik sinir sistemi aktivitesine bağlı olarak anoreksijenik etki göstermektedir. Kap tüketimi, insanlarda anoreksijenik hormon olan

GLP-1 konsantrasyonunu arttırmakta, oreksijenik hormon olan ghrelin konsantrasyonunu ise azaltmaktadır (84). Kap ayrıca β -endorfin öncüsü olan proopiomelanokortin (POMC) mRNA ekspresyonu ile hipotalamusun arkuat çekirdeğinde opioid aktivitesinde artışa yol açmaktadır (84, 90).

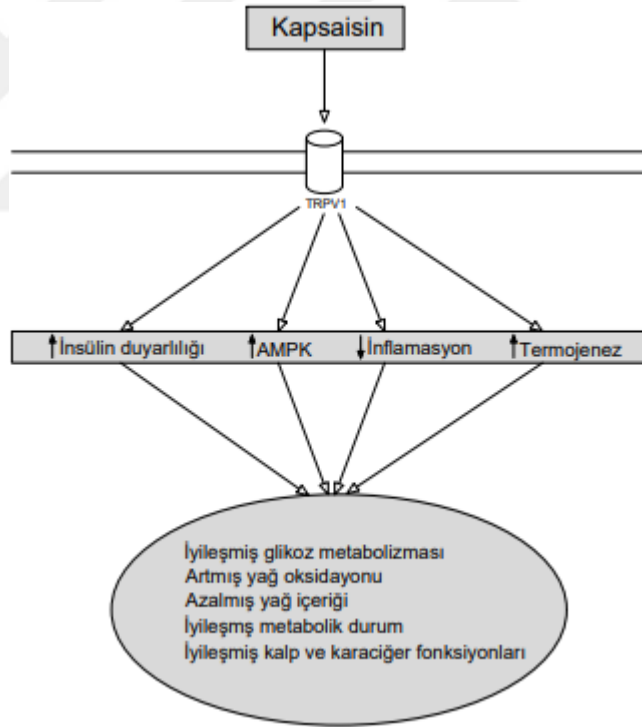
2.6.2. Kapsaisin-TRPV Etkileşim Mekanizması

TRPV1 reseptörü, kalsiyum iyonlarına sodyum iyonlarından daha yüksek afiniteye sahip seçici olmayan bir katyon kanalıdır (84). TRPV1, hem MSS hem de PSS'de bulunur. Periferik sinirlerin spinal ve periferik terminallerinde, periferik sinir ağlarında, trigeminal gangliyonlarda, dorsal kök gangliyonların küçük ve orta büyüklükteki hücrelerinde, nöronlarda, mesanede, adipositlerde, düz ve iskelet kas hücrelerinde, endotelial hücrelerde, pankreatik β -hücrelerinde, karaciğer, kalp ve böbrekte eksprese edilir (17, 83). Periferik duyu nöronlarındaki TRPV alt aile üyeleri (TRPV1, 2, 3 ve 4) ortam sıcaklığını doğru algılamada, davranışsal tepkiler göstererek çevresel sıcaklık değişikliklerine uyum sağlamada işlev görür (91). Kap, TRPV1 için çok yüksek bir afinite, duyarlılık ve seçiciliğe sahiptir. Bununla birlikte, homolog TRPV2 – TRPV6 reseptörlerini aktive etmez (84).

Kapsaisin, DRG nöronlarında kalsiyum iyon akışını artırarak nosiseptörleri uyarır (92, 93). Kap nosiseptörler tarafından eksprese edilen TRPV1 reseptörlerini aktive ederek ağrı benzeri davranışı indükler. Kap ile uyarılmış mekanik allodininin omurilikteki işleyiş mekanizmaları G-protein ve protein kinazlara (PKA ve PKC) bağlıdır (84). Hem G-protein hem de protein kinaz inhibitörleri, kapsaisinin işlevlerini tersine çevirir. Mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) ailesi de, ağrı ile ilgili durumlarda rol alır. Kapsaisin uygulaması, periferde ve omuriliğin dorsal boynuzunda p38 MAPK'nın fosforilasyonunu arttırmaktadır. PKC ayrıca TRPV1'in duyarlılığını, büyük katyonlara geçirgenliğini ve içe doğru akımı artırır (84). Bu kinazlara ek olarak, nöropeptid CGRP, merkezi sensitizasyonda bir başka önemli bileşendir. Kap ile indüklenen TRPV1 aktivasyonu, omurilikte CGRP salınımını uyarır. CGRP antagonisti ile intratekal tedavi, mekanik hiperaljezi ve sekonder allodini gelişimini azaltır (84). Yine TRPV1'in Kap kaynaklı aktivasyonu, P maddesi ve CGRP'nin salınmasını indükleyerek vazodilatasyona sebep olur, böylece hipertansiyonu hafifletir (83, 84, 94).

Kapsaisin ile kan glikoz seviyesinin ve insülin salgılanma modülasyonunun TRPV1'e bağlı olduğu, TRPV1 eksprese eden adacık β hücrelerinin, plazma insülin konsantrasyonlarını artırdığı ve bu etkinin ise TRPV1 inhibitörü kapsazepin tarafından inhibe edilebileceği bildirilmiştir (84). TRPV1'in Kap tarafından uzun süreli aktivasyonu, farelerin aortik sinüs ve torakoabdominal aortunda lipid depolanmasını ve aterosklerotik lezyonları azaltmaktadır (95). Vasküler düz kas hücrelerinde TRPV1'in Kap ile aktivasyonu, AMPK sinyal yolunu aktive ederek oksitlenmiş LDL tarafından bozulan otofajiyi yeniden çalıştırdığı, köpük hücre oluşumunu inhibe ettiği ve nihayetinde ateroskleroz sürecini yavaşlattığı bildirilmiştir (96).

Kapsaisin ile indüklenen TRPV1 aktivasyonu, termogenezi ve enerji harcanmasını artırmaktadır (Şekil 2.8) (83, 84). Termojenez, kahverengi yağ dokusunun aktivasyonu ile gerçekleşmektedir (84).



Şekil 2.8. Kapsaisin'in etki mekanizması ve fizyolojik işlevleri.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmanın deneysel kısmı ve analizleri, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi ile Tıp Fakültesi Sınır Bilim Araştırma Birimi Hücre Kültürü ve Mikroskopi Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Çalışma bütçesi TDK-2019-8459 nolu proje kapsamında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından karşılanmıştır.

3.1. Materyal

3.1.1. Deney Hayvanı

Bu çalışma için Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 07.03.2019 tarih ve 2019/02 no'lu kararı ile etik onay alınmıştır. Çalışmada Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinden tedarik edilen 6-8 haftalık 46 adet C57Bl/6 ırkı erkek fare kullanıldı. Deneysel obezite modeli oluşturmak için obeziteye ve diyabete en yatkın tür C57Bl/6 ırkı fareler tercih edildi.

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler

Çalışmada kullanılan sarf malzeme listesi Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Sarf malzeme listesi.

Sarf Malzemesi	Firma	Katalog Numarası
Kapsaisin	Santa Cruz	sc-3577
Neurobasal Medium (NBA)	Invitrogen	10888
RPMI 1640	Invitrogen	11875093
Hank'ın Dengeli Tuz Solüsyonu (HBSS)	Sigma	H9269
Kollojenaz (Tip IV)	Sigma	C7657
Tripsin	Sigma	T4424
Deoksiribonükleaz I (DNAz)	Sigma	D4513
Fetal dana serumu (FCS)	Sigma	F9665
Tripsin İnhibitörü	Sigma	T6522
Percoll	Sigma	P4937
Poly-l-lizin	Sigma	P6282
Laminin	Sigma	L2020
B27 suplementi	Invitrogen	17504-044
Antibiyotik-antimikotik solüsyonu	Sigma	A5955
Glutamax	Invitrogen	35050-038
Kalsein	Calbiochem	206700
Cam tabanlı petri kabı	WPI	FD35
Fosfat tamponu (PB)	Sigma	P3288
Fosfat tuz tamponu (PBS)	Sigma	P4417
Paraformaldehit	Sigma	P6148
Propidyum iyodür (PI)	ICN	255535-16-4
	Biochemicals	
Sodyum azid	Sigma	S8032
Bovine serum albümin	Sigma	A-9418
Poly-l lysin kaplı lam	Manzel-Glaser	08696
Tween 20	Merck	S95415 814
Tween 80	Merck	9005-65-6
NFH	Sigma	N5389
β -III	Abcam	ab4680
S100	Dako	Z0311
BNG	ThermoFisher	B35451
MBP	Santa Cruz	Sc-13912
P0	Millipore	ABN363
Alexa 488 tavuk anti-fare IgG	Invitrogen	A11029
Alexa 568 keçi anti-tavşan IgG	Invitrogen	A-21208
Alexa 488 tavuk anti-keçi IgG	Abcam	ab150129
K252a	Merck	420298
LY294002	Ezsolution	1747-5
PD98059	ChemCruz	sc-3532
Triton X	Merck	K26456203924
%45 yüksek yağlı yem	Research diet	D12451

3.2. *In Vivo* Deneysel İşlem

3.2.1. Deney Grupları ve Çalışma Dizaynı

Diyete bağlı deneysel obezite oluşturmak amacıyla çalışma başlangıcında tüm hayvanlar (n=46), Kontrol (n=8) ve Obez (n=38) olmak üzere iki gruba ayrıldı. Gruplara ayrılan farelerin ortalama olarak aynı gramajda olmalarına dikkat edildi ve her kafese 8 adet olacak şekilde ayrıldı. Kontrol grubu standart fare yemiyle (%23 protein, %3.7 yağ, %7.7 selüloz, %12.8 nem, %6.9 kül, %0.6 sodyum) obez grubu ise yüksek yağlı yemle (%45 yağ, %35 karbonhidrat, %20 protein, Research Diet, D12451) 15 hafta boyunca beslendi. Obezite gelişimi kilo artış oranlarıyla belirlendi. Kontrol gruplarına göre en az %20 ağırlık artışı gerçekleşen hayvanlar obez olarak değerlendirildi. 16. haftadan itibaren obezite gelişen fareler; Obez (n=8), Obez + Aralıklı Açlık (n=8), Obez + Kapsaisin (n=10) ve Obez + Aralıklı Açlık + Kapsaisin (n=10) olmak üzere dört gruba ayrıldı (Şekil 3.1).

I. Kontrol Grubu (Kontrol): 30 hafta boyunca normal fare yemiyle besleme. 16. haftadan itibaren sadece Kap çözülen çözücü, farelere haftada üç gün deri altı (subkutan-sc) uygulamayla verildi.

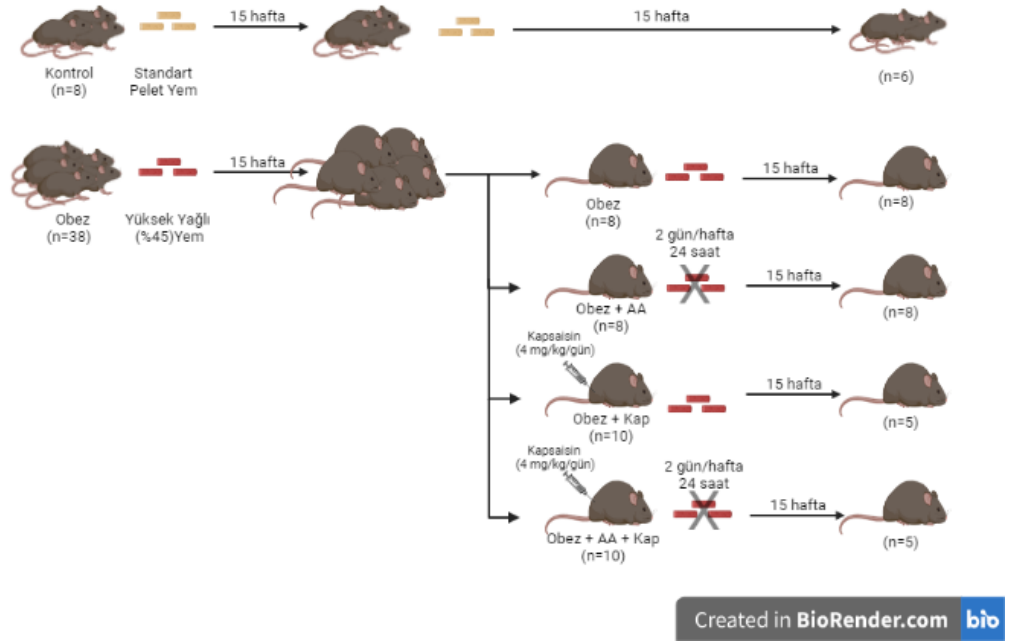
II. Obez Grubu (Obez): 30 hafta boyunca yüksek yağlı yemle (%45 yağlı) besleme (97). 16. haftadan itibaren sadece Kap çözülen çözücü, farelere haftada üç gün deri altı (subkutan-sc) uygulamayla verildi.

III. Obez + Aralıklı Açlık Grubu (Obez + AA): İlk 15 hafta boyunca yüksek yağlı yemle (%45 yağlı) besleme, ikinci 15 hafta boyunca yüksek yağlı yemle (%45 yağlı) besleme + haftada ardışık olmayan 2 gün (pazartesi ve perşembe) 24 saat yem kısıtlaması (98). 16. haftadan itibaren sadece Kap çözülen çözücü, farelere haftada üç gün deri altı (subkutan-sc) uygulamayla verildi.

IV. Obez + Kapsaisin Grubu (Obez + Kap): İlk 15 hafta boyunca yüksek yağlı yemle (%45 yağlı) besleme, ikinci 15 hafta boyunca yüksek yağlı yemle (%45 yağlı) besleme + deri altı (subkutan-sc) kapsaisin (4 mg/kg/gün) enjeksiyonu haftada üç gün (18).

V. Obez + Aralıklı Açlık + Kapsaisin Grubu (Obez + AA+ Kap): İlk 15 hafta boyunca yüksek yağlı yemle (%45 yağlı) besleme, ikinci 15 hafta boyunca yüksek yağlı yemle (%45 yağlı) besleme + haftada ardışık olmayan 2 gün (pazartesi ve perşembe) 24 saat yem kısıtlaması + deri altı (subkutan-sc) kapsaisin (4 mg/kg/gün) enjeksiyonu haftada üç gün.

Çalışma boyunca tüm hayvanların suya erişimleri serbest bırakıldı.



Obezite gelişiminin sağlandığı 15. haftada hem in vivo hem in vitro testler yapıldı. Bunlar arasında motor ve duysal sinir fonksiyon testleri (rotarod, hot plate, tail-flick), immünohistokimyasal analizler (aksonal belirteçler; β III-Tub ve NFH, miyelin belirteçleri; MBP ve P0, Schwann hücre belirteci; S100) ve aksotomi hasarlı DRG nöronlarında sağ kalım oranları belirlendi.

Obez fare modeli oluşturulduktan sonra obezite tedavisi için, 16-30. haftalar arasında %45 yüksek yağlı yemle beslemeye devam edildi. Buna ilaveten, AA ve/veya kapsaisin tedavisi uygulandı. 30. haftanın sonunda tedavinin terapötik etkilerini ortaya koymak için canlı ağırlık tartımları, duysal ve motor sinir fonksiyon testleri, morfolojik (immünohistokimya) inceleme ve DRG nöronlarında sağ kalım oranları hesaplandı. Ayrıca uygulanan tedavilerin etki mekanizmalarını aydınlatmak için dejenerasyon ve rejenerasyonda etkili hedef reseptörlerin rollerini belirlemek amacıyla nöron hücre kültürleri medyumuna reseptör inhibitörleri eklenerek sonuçlar değerlendirildi.

3.2.2. Kapsaisinın Hazırlanması

Kapsaisin başlangıçta DMSO çözücüsünde çözülerek farelere verildi. Ancak farelerde ortaya çıkan iritasyon sonrası çözücü değiştirildi. Kapsaisin 4 mg/kg olacak şekilde 1:1:8 (Etil alkol: Tween 80: Serum fizyolojik (SF)) oranında hazırlandı (16).

3.2.3. Terapötik Etkinin Değerlendirilmesinde Uygulanan Motor ve Duysal Fonksiyon Testleri

Rotarod testi: Hayvanın dönen bir mil üzerinde (Ugo Basile Rota-Rod 47600, comerio VA, Italy) motor koordinasyonu sağlamasını değerlendirmek üzere uygulanan bir testtir. Hayvanlar testten bir gün önce 5 rpm hızda rotarod testine alıştırıldı. Bu test, cihazın 5 rpm'den 40 rpm hıza 5 dakikada ulaştığı bir modülde gerçekleştirildi. Hayvanlar mil üzerinde 300 saniyeden fazla bekletilmedi. Her bir hayvan için üç tekrar yapıldı. Testler arasında hayvanlar 30 dak dinlendirildi. Farelerin dönen çubuk üzerinde toplam kalma süreleri hesaplanarak üç denemenin ortalaması alındı ve bu değer ilgili hayvanın o günkü “Rotarod Değeri” olarak kaydedildi. Rotarod testi 0., 15. ve 30. haftalardaki tüm gruplarda gerçekleştirildi (Şekil 3.2).



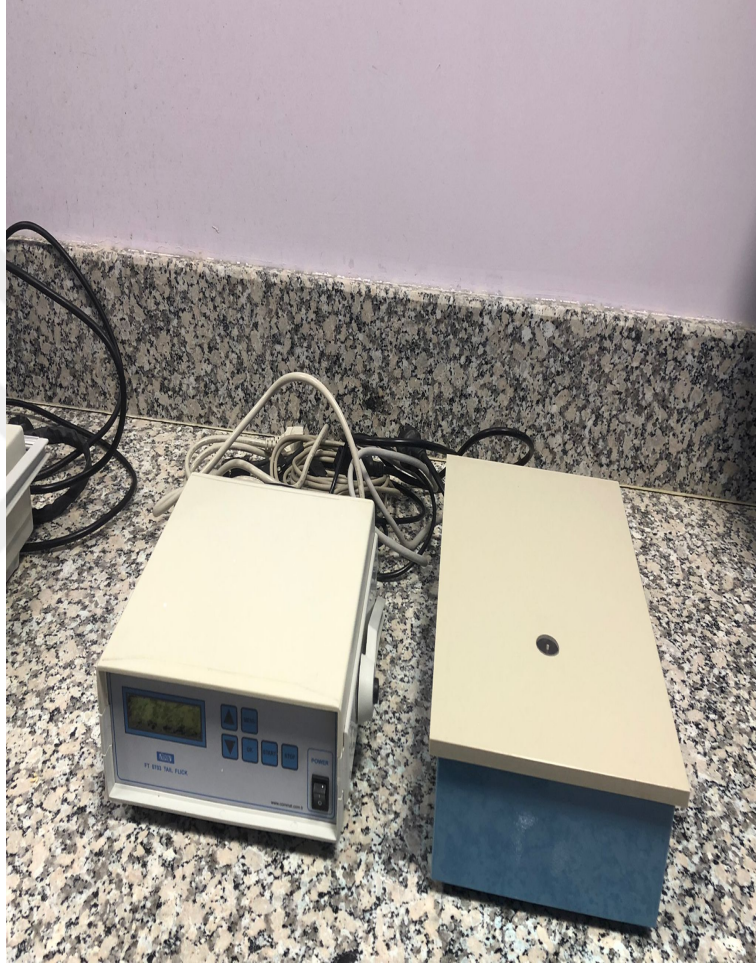
Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan rotarod cihazı.

Hot plate (ısıtıcı plaka) testi: Bu test için ağırlı nosisepsiyon ısıtıcı aleti (May, Turkey) kullanıldı ve ısıtıcı tabla 55 °C'ye ayarlandı. Tablaya tek bir fare yerleştirildi. Farenin sıcak tablaya bırakılmasından sonra ayaklarını kaldırması, silkelemesi veya yalaması ağırlı uyarana tepki olarak değerlendirildi. Geçen süre ağırlı uyarana tepki süresi olarak saniye cinsinden kaydedildi. Çalışma öncesinde 10 saniyeden daha uzun sürede tepki veren hayvanlar çalışmaya dahil edilmedi. Testler esnasında hayvanların ayaklarının yanmasını önlemek için denekler sıcak tabla üzerinde 30 saniyeden fazla bekletilmedi ve bu hayvanların termal ağrı değeri 30 saniye olarak kaydedildi (99, 100). Hot plate testi 0., 15. ve 30. haftalardaki tüm gruplarda gerçekleştirildi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan hot plate cihazı.

Tail-flick (kuyruk çekme) testi: Bu test tail-flick cihazıyla (May FT 0703, Turkey) gerçekleştirildi. Kuyruk ucunun 3 cm önündeki alan tail-flick ışınına maruz bırakıldı. Kuyruğun oynatılması veya kaldırılması ağrılı ışık-ısı uyaranına tepki olarak değerlendirildi. Termal hasar oluşmaması için kuyruk 10 saniyeden fazla ışına maruz bırakılmadı (101). Tail-flick testi 15. ve 30. haftalardaki tüm gruplarda gerçekleştirildi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Çalışmada kullanılan tail-flick cihazı.

3.2.4. Elektromiyografik Analizler

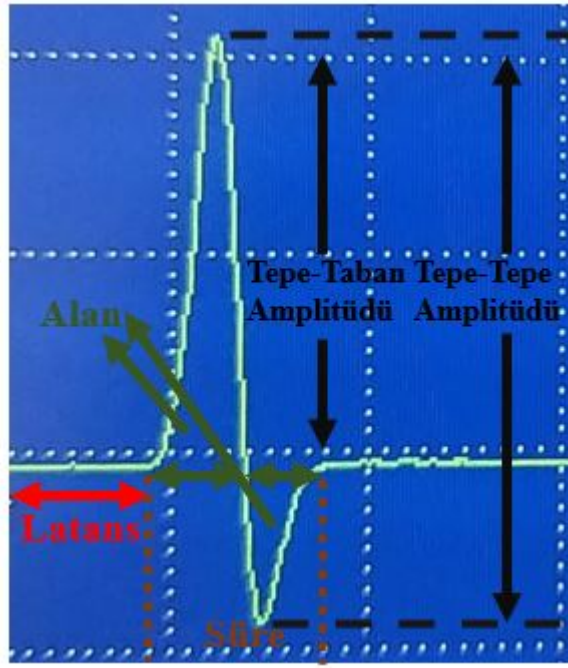
Elektromiyografik analizler; çalışmanın 30. haftasında duysal ve motor fonksiyon testleri tamamlandıktan sonra, intraperitoneal yolla sağlanan genel anestezi altında (Ketamin-HCl 100 mg/kg / Ksilazin 10 mg/kg), 37°C vücut ısısında, çevresel elektromanyetik dalgalardan izole bir ortamda (Faraday kafesi içerisinde), elektromiyografi (EMG) cihazı (Nihon Kohden, Japan) ile gerçekleştirildi (Şekil 3.5).

Motor sinir ileti hızı incelemesi, motor aksonun rejenerasyon, miyelinizasyon ve kas inervasyonunun değerlendirilmesinde için altın bir yöntemdir.



Şekil 3.5. Sinir ileti hızı tespitinde kullanılan cihaz (Nihon Kohden) ve laboratuvar ortamı.

Motor sinir ileti hızı (MSİH); sinir liflerinde oluşturulan uyarı sinyalinin aksonlar üzerinden distaldeki sinir ve kaslara ulaştırılma hızını belirlemek için kullanılır. Bileşik kas aksiyon potansiyeli (BKAP), sinir lifince inerve edilen kas liflerinin sayısı ile belirlenir ve kas kütlesindeki kasılmanın elektriksel potansiyeli ölçülerek, motor ünite sayısı değerlendirilir (Şekil 3.5). Latans, sinir lifine yapılan stimülasyondan (uyarım) defleksiyon başlangıcına (cevap vermenin başladığı, elektriksel potansiyelin sıfır çizgisinden ayrıldığı noktaya) kadar geçen zaman dilimi olarak değerlendirilir (Şekil 3.6) (102, 103).



Şekil 3.6. Çalışmada değerlendirilen latans ve BKAP (tepe-tepe amplitüdü) değerlerinin şematik görünümü.

Bileşik kas aksiyon potansiyeli genliğini ölçmek için, kalça kemiğinin tam üzerindeki siyatik çentik (notch) noktasından uyarım yapıldı. Kayıt elektrotları, anot-katod arası uzaklık 3 mm olacak şekilde yerleştirildi. Toprak elektrot ise stimülatör ile kayıt elektrotu arasına yerleştirildi. Uyarım, siyatik siniri supramaksimal olarak uyaracak ancak çevreye yayılmayacak şekilde 0.05 ms süreli, 1 Hertz, 10 mA şiddetinde gerçekleştirildi. Kayıt elektrodu gastroknemius kasının ortasına, referans elektrot ise kasın tendonuna yerleştirilerek kayıtlar alındı. BKAP'ın amplitüdü miliVolt (mV) cinsinden kaydedildi. Proksimal ve distal latansı ölçebilmek ve motor sinir ileti hızını hesaplamak için; proksimal uyarım “siyatik çentik” noktasından yapıldı. Kayıt elektrotu lateral plantar kaslara, referans elektrot ise ayağın dorsalinde ikinci ile üçüncü parmak arasına yerleştirilerek kayıtlar alındı. Distal uyarı dirsekten (ayak bileği) verilerek, kayıt lateral plantar kaslardan alındı. Proksimal ve distal latans değerleri milisaniye (ms) cinsinden kaydedildi. Uyarım noktaları arasındaki mesafe milimetre (mm) cinsinden ölçüldü ve proksimal latans ile distal latans farkı hesaplandı. Ölçülen mesafe latans farkına bölünerek MSİH m/sn hesaplandı (104, 105).

3.2.5. İmmünohistokimyasal Analizler

Otuzuncu haftada tüm fonksiyonel testler ve elektromiyografik analizler tamamlandıktan sonra hayvanlar genel anesteziye alındı ve immünohistokimyasal analizler için siyatik sinir ile gastroknemius kas dokuları ayrıldı. Ardından servikal dislokasyon yöntemiyle hayvanlar sakrifiye edildi.

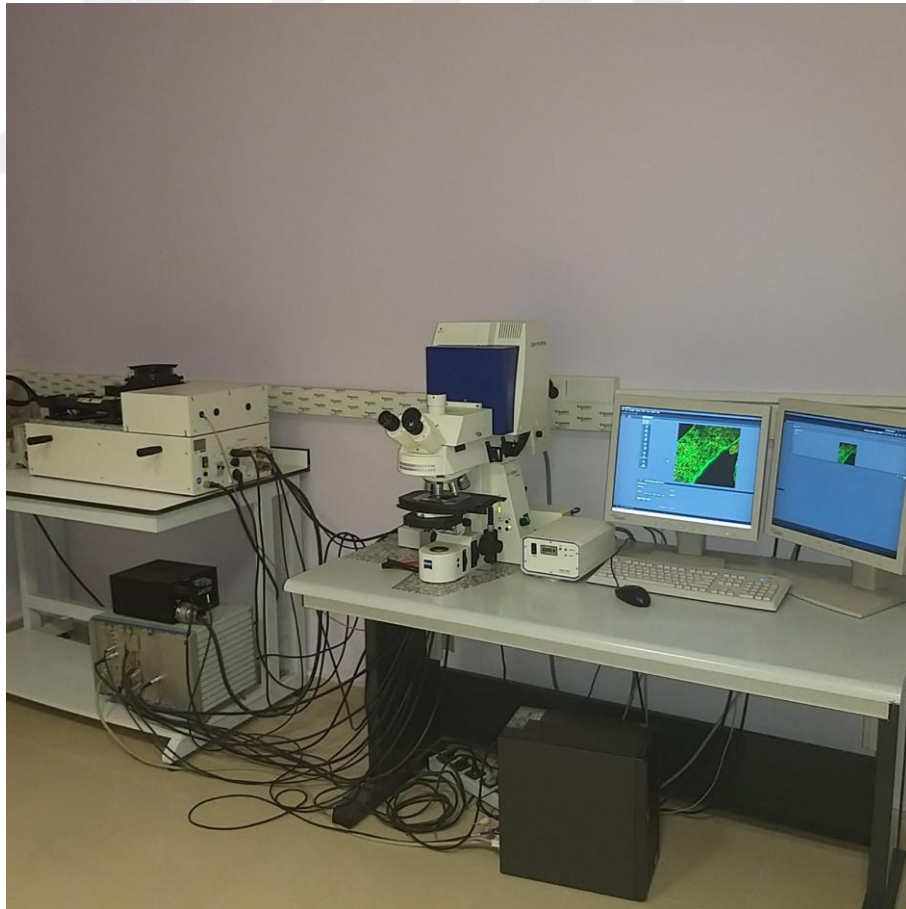
Ayrılan siyatik sinir ile gastroknemius kası %4'lük önceden soğutulmuş paraformaldehid içerisinde fikse edildi. Daha sonra fosfat tampon solüsyonunda (FTS) hazırlanan %30'luk süktroz solüsyonunda 24 saat bekletildi. *Frozen kriyostat* (Leica CM 1900) cihazında siyatik sinir dokusundan uzunlamasına 10 µm'lik, gastroknemius kasından ise uzunlamasına 18 µm'lik kesitler, poly-L lysine kaplı lamlara alındı. Kesitler 30 dakika süreyle blok solüsyonunda bekletildi, primer antikorlar ile +4 °C de nemli ortamda 1 gece inkübasyona bırakıldı (106).

Boyama için kullanılan primer antikorlar: Mouse monoclonal anti-beta tubulin-III IgG (1/100), anti-neurofilament heavy IgG (1/100), goat polyclonal anti-MBP antibody (1/50), polyclonal anti-MP0 antibody (1/50), α- Bungarotoxin (1/50), polyclonal rabbit anti-S100 antibody (1/100).

Boyama için kullanılan sekonder antikorlar: Alexa fluor 488 goat anti-rabbit IgG, alexa fluor 488 goat anti-mouse IgG, alexa fluor 568 goat anti-mouse IgG, Alexa Fluor® 594 α-bungarotoxin conjugate IgG.

Siyatik sinir lifindeki (akson-miyelin) ve sinir-kas kavşağındaki dejenerasyon, rejenerasyon ve reinnervasyon bulguları ve Schwann hücre aktivasyonu, lazer taramalı konfokal mikroskop sisteminde immunofloresan görüntüleme tekniği ile incelendi. Akson bütünlüğündeki dejeneratif- rejeneratif değişiklikler anti-neurofilament 200 antibody (NFH) ve anti-βIII-Tubulin antibody (βIII-Tub), miyelin yapısındaki demiyelinizasyon-remiyelinizasyon bulguları anti-miyelin basic protein antibody (MBP) ve anti-miyelin protein zero antibody (P0), Schwann hücre aktivasyonundaki değişiklik anti-S100 antibody (S100) ile, reinnervasyonun değerlendirilmesi kas dokusundaki sinir sonlanmaları NFH ile, motor son plaktaki asetilkolin reseptörleri ise alfa-Bungarotoksin (α-BNG) primer ve sekonder antikorları ile boyanarak görüntülendi (107).

Floresan görüntüleme ve analiz: İmmünohistokimyasal boyaması yapılan preparatlar FTS ile üç kez yıkandıktan sonra, lazer taramalı konfokal mikroskopta (LSM 510 META- Zeiss) her kesitten üç görüntü alındı (Şekil 3.7). Görüntülemeler için Argon lazeri (488 nm) ve Helyum-Neon lazeri (543 nm) kullanıldı. Görüntülemelerde immersiyon yağlı 20X büyütme objektiften yararlanıldı. Aynı anda çoklu floresan ışımları göstermesi için uygun çok kanallı (multitrack) işlem madunda görüntüler alınıp kaydedildi. Siyatik sinir kesitlerinde aksonal belirteçler (NFH ve β III-Tub), miyelin belirteçleri (MBP ve P0), Schwann hücre belirteci (S100) görüntülendi. Siyatik sinirin inerve ettiği hedef kas kesitlerinde motor sinir sonlanması aksonal belirteç (NFH) ile motor son plak ise asetilkolin reseptör belirteci (α -BNG) ile görüntülendi. Lazer taramalı konfokal mikroskopla alınan floresan görüntüler Image J yazılımı ile kantitatif olarak analiz edildi. Siyatik sinirde, miyelin kılıfında, nöromüsküler kavşakta ve kas dokusunda dejenerasyon ve rejenerasyon seviyesi değerlendirildi (106-108).



Şekil 3.7. Lazer taramalı konfokal mikroskop sistemi (LSM 510 META-Zeiss).

3.3. *In Vitro* Deneysel İşlem

3.3.1. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, 15. haftadaki Kontrol ve Obez gruplarından birer fareden ve 30. haftadaki Kontrol, Obez, Obez + AA, Obez + Kap, Obez + AA + Kap gruplarındaki en az üç fareden hazırlandı. Hayvanlar, intaperitoneal ketamin uygulamasıyla (100 mg/kg) anestezi edildi ve servikal dislokasyonla sakrifiye edildi. DRG aseptik koşullarda, stereo mikroskop (Nikon SMZ800) altında çıkarıldı (Şekil 3.8). Hücre kültürü hazırlanıncaya kadar gangliyonlar, önceden soğutulmuş RPMI 1640 vasatında bekletildi.



Şekil 3.8. Hücre kültürünün hazırlandığı laboratuvar ortamı.

Hücre kültürü başlıca dört ana basamakta gerçekleştirildi.

Enzimatik ayrıştırma: Kolajenaz ile enzimatik ayrıştırmaya başlandı (992.5µl Neurobasal Medium (NBA) + 7.5 µl kolajenaz). Gangliyonlar, 40 dakika inkübatörde (Thermo Scientific Hera cell 150) inkübe edildi. HBSS ile 3 kez yıkandıktan sonra, bir diğer enzim olan tripsin (400 µl NBA + 200 µl Tripsin- 15 dak) ile enzimatik ayrıştırmaya devam edildi.

Mekanik ayrıştırma: Bu amaçla solüsyon içerisindeki gangliyonlar, önce daha büyük çaplı uçlardan başlayarak pipetle yaklaşık 15 dak süre ile çekip bırakma yöntemiyle

(tritürasyon) mekanik olarak ayrıştırıldı. Sonrasında kültüre %1 oranında DNaz (6 µl) eklenerek 30 dak. boyunca 50 Hz frekansta ajitasyon için inkübasyona bırakıldı.

Percoll gradienti ile ayırıştırma: İnkübasyondan sonra 120 RCF'de 3 dak santrifüjleme (Eppendorf Centrifuge 5804 R) ile ayrılan hücreler çöktürüldü, süpernatant atıldı ve ardından pellet NBA (360 µl), FCS (40 µl) ve tripsin inhibitörü (30 µl) ile çözündürüldü. Plastik tüp içinde dipten yukarıya doğru %60, %35 ve %10'luk yoğunluklarda Percoll gradienti hazırlandı ve üzerine hücre süspansiyonu eklendi. Tüpler santrifüj cihazında, 4000 RPM'de, 4 °C'de, 20 dakika santrifüj edildi. Nöronlar diğer hücrelerden ve doku kalıntılarından ayrıldı. Nöronları içeren percoll gradient tabakası bir başka tüpe aktarıldı. Ardından 120 RCF'de 3 dak. santrifüj edilerek hücreler dibe toplandı. Süpernatantın büyük bir bölümü atılarak, hücre pelletine 600 µl NBA eklenerek süspansiyon oluşturuldu.

Hücre ekimi: 600 µl NBA ile süspansiyon oluşturan nöronlar, bir gün öncesinde oda sıcaklığında 2 saat %10 poly-l lizin ve ardından 37 °C'de 1 gece süresince %0.001'lik laminin ile kaplanan ve ekim öncesinde steril distile su ile yıkanıp kurutulan 35 mm'lik petri kaplarına ekildi. Hücrelerin tabana tutunabilmeleri için, 1 saat inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Daha sonra petri kabındaki medyum NBA ile 1.5 ml'ye tamamlandı. Kültürler, %100 nem, %5 CO₂ ayarlı 37 °C'lik inkübatörde 48 saat inkübasyona bırakıldı (108, 109).

3.3.2. Nöronlarda Canlılıkların Doğrulanması

Ekim yapıldıktan 72 saat sonra, hücre kültürü medyumuna propidyum iyodür (7.5 µM) eklenerek akson uzatmış nöronlara aksotomi öncesi propidyum iyodür alım testi uygulandı. Floresan mikroskop görüntüleme sisteminde hücrelerin ölü-canlı ayrımı yapıldı. Çekirdeği propidyum iyodürle boyanan ve floresan mikroskopta parlak kırmızı renk veren hücreler ölü, boyanmayan hücreler canlı kabul edildi (110).

3.3.3. Aksotomi (akson kesisi) Modelinin Oluşturulması ve Görüntülenmesi

Kontrol, Obez, Obez + AA, Obez + Kap, Obez + AA + Kap gruplarından *in vitro* test grupları oluşturuldu. Ayrıca her test grubundan 4 tane grup daha oluşturuldu. Hücrelerin ekimi yapıldıktan 72 saat sonra, aksotomiden önce, akson uzatmış

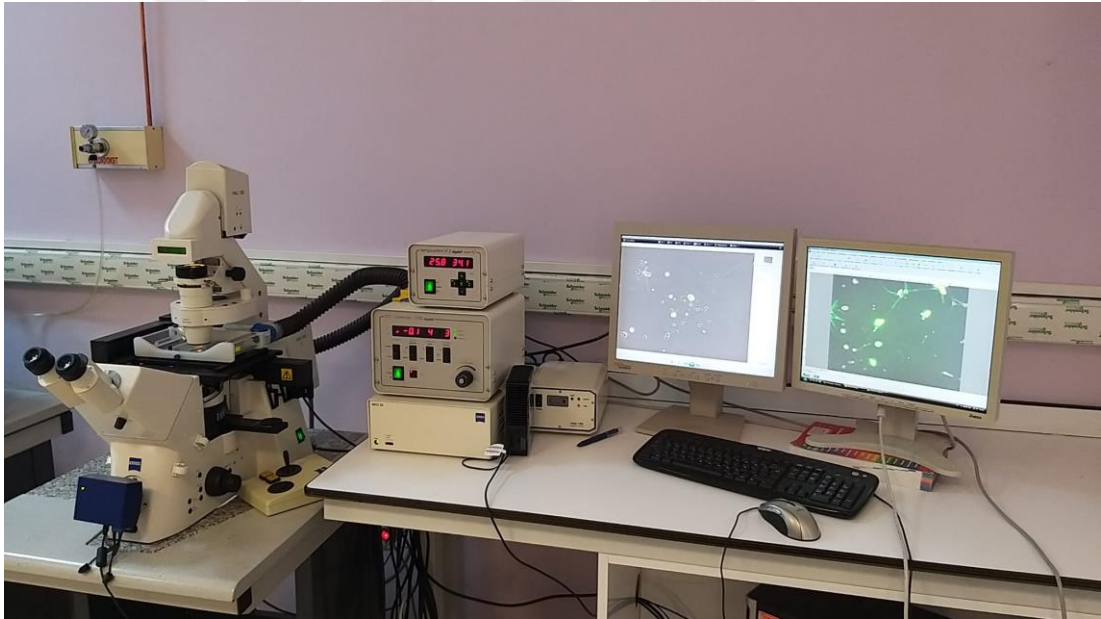
nöronların görüntüleri zaman aralıklı görüntüleme mikroskobunda 20X'lik objektifle kaydedildi. Aksotomi için her gruptan en az 200 canlı nöron seçildi. Ayrıca, canlı nöronların membranlarının deforme olmamasına, kabarcık, vakuol veya boncuklu nöritler gibi stres belirtileri göstermemesine özen gösterildi. Aksotomi için nöritlerin boyunun en az 50 μm ve en kalın, en uzun nöritler olmalarına dikkat edildi (Şekil 3.9). Aksotomi işlemi, ultraviyole (UV) lazer ünite ataçmanlı, özel invert mikroskop sistemi ile gerçekleştirildi. Bu sistem PALM Microlazer Teknolojisi ve LPMC sisteminden oluşmaktadır. Sistemde lazer üretici ünite, motorize invert mikroskop (Zeiss Axiovert 200M) ve kontrolleri sağlayan özel yazılımlı (RoboLPC) bilgisayar bulunmaktadır. Mikroskopta bulunan lazer ünitesi 337 nm dalga boyunda, her biri 3 nanosaniye (ns) süren ve yaklaşık olarak 300 μJ enerji salan darbeler üretmektedir. Lazer mikrodiseksiyon sisteminde aksotomi yapmak için 63X kuru faz kontrast objektif (Achromplan N.A. 0.75, Zeiss Almanya), lazer ışını, mikroskop ve mikroskoba bağlı olan CCD kamerayı kontrol eden bilgisayar sistemi kullanıldı (110). Aksotomi uygulamasından 24 ve 48 saat sonra zaman aralıklı görüntüleme mikroskobuyla, faz ve floresan görüntüler kaydedildi. Nöronlar sağ kalım özellikleri bakımından takip edildi (108, 110).



Şekil 3.9. Aksotomi işleminin yapıldığı mikroskop sistemi (PALM Microlazer Teknolojisi ve LPMC sistemi).

3.3.4. Hücre Takibi Görüntüleme ve Değerlendirme

Aksotomi sonrası kültürler, canlı hücre görüntüleme (zaman aralıklı mikroskopi) sistemine (Cell Observer-Zeiss) transfer edildi. Görüntülemeler 20X büyütme objektifle gerçekleştirildi (Şekil 3.10). Sistem motorize bir invert mikroskop (Axiovert 200M) ile tüm fonksiyonların kontrol edilip programlanabildiği bilgisayar ve yazılımından oluşmaktadır. Mikroskop üzerinde bulunan dijital kamerayla görüntüler bilgisayar ortamına aktarıldı. Tabla üzerinde bulunan ve preparatın yerleştirildiği inkübasyon kutusu destek üniteler sayesinde hücreler için fizyolojik şartlar (37 °C, %5 CO₂, nem) sağlandı. Sistemde kullanılan bilgisayar programı (Axiovision 3.1) mikroskobun tüm fonksiyonlarının bilgisayar ortamında düzenlenebilmesine imkan sağlamaktadır. Çalışmada aksotomi öncesi ile aksotomiden 24 ve 48 saat sonraki görüntüler alınarak bu görüntülerden hasarlı nöronların sağ kalım oranları % olarak hesaplandı (110).



Şekil 3.10. Hücre takip ve görüntülemesinin yapıldığı zaman aralıklı mikroskop sistemi (Axiovert 200M).

3.3.5. Hücre Kültürü Medyumuna Reseptör İnhibitörlerinin Uygulanması

Rejenerasyon mekanizmasını aydınlatmak amacıyla tüm deney gruplarındaki hücre medyumlarına TrkA (K252a), MEK-1 (PD98059), PI3K (LY294002) inhibitörleri eklendi. Tüm inhibitörler Dimetil Sülfoksit (DMSO) çözücüsünde

hazırlandı. DMSO'nun sitotoksik etkisini önlemek için medyumundaki son hacmi %0.3 oranını aşmadı. Tüm deney gruplarında medyuma aksotomi işleminden 60 dakika önce TrkA (200 nM), MEK-1 (20 µM), PI3K (10 µM) eklendi. Aksotomi hasarlı nöronların sağ kalım oranları 24. ve 48. saatlerde hesaplanarak ölüm ve sağ kalım yolları değerlendirildi.

3.4. İstatistiksel Analiz

Tanımlayıcı istatistikler; Ortalama $\pm$ Standart Hata (veya Sapma) ve Medyan (Minimum-Maksimum) değeri olarak ifade edildi. Belli özellikler bakımından grupların karşılaştırmasında Kruskal – Wallis analiz testi, *in vitro* gruplarda oran karşılaştırmasında ise Z testi uygulandı. Farklı grupları belirlemede Dunnet çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Görüntü analizlerinde Image J programı kullanıldı. Hesaplamalarda istatistiksel anlamlılık düzeyi %5 olarak alındı ve hesaplamalar için SPSS (ver: 21) ve MINITAB (ver:14) istatistik paket programlarından yararlanıldı.

4. BULGULAR

Çalışmaya, Kontrol grubunda 8, Obez grubunda ise 38 olmak üzere toplam 46 fare ile başlandı. 15. haftada Kontrol ve Obez gruplarından birer fare hücre kültürü ve immünohistokimya analizleri için kullanıldı. 16. haftadan itibaren Kontrol grubunda 7 fare ile devam edilirken, obezite geliştirilen fareler ise Obez (n=8), Obez + AA (n=8), Obez + Kap (n=10), Obez + AA + Kap (n=10) olacak şekilde dört gruba ayrıldı. İlerleyen haftalarda özellikle Kap uygulanan gruplarda yaşanan kayıplar sebebiyle çalışma Kontrol grubunda 6, Obez grubunda 8, Obez + AA grubunda 8, Obez + Kap grubunda 5, Obez + AA + Kap grubunda ise 5 fare ile tamamlandı.

4.1. *In Vivo* Bulgular

4.1.1. Canlı Ağırlık Bulguları

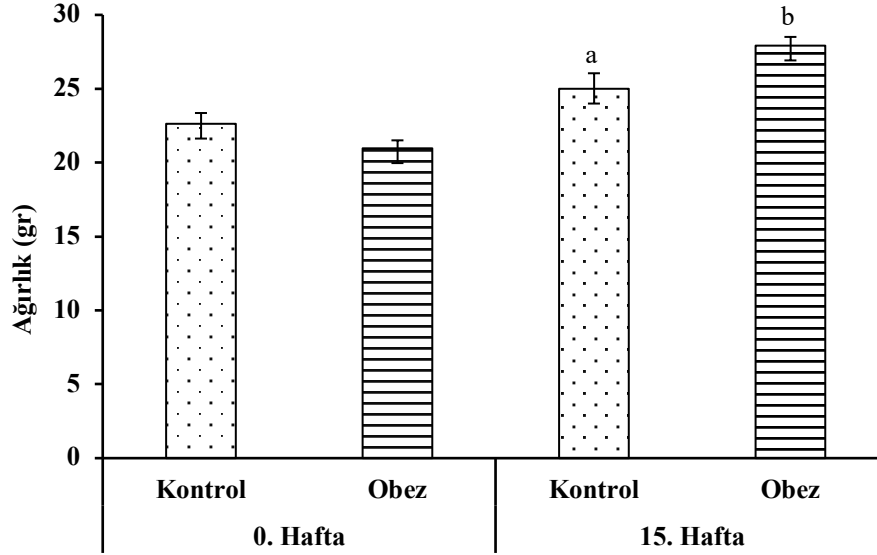
Grupların çalışma öncesi (0. hafta), obezite gelişimi sonrası (15. hafta) ve AA/Kap uygulama sonrası (30. hafta) dönemlere ait ortalama canlı ağırlık değerlerinin haftalara göre tanımlayıcı istatistikleri ve karşılaştırma sonuçları Tablo 4.1. ve Şekil 4.1-2’de verilmiştir.

Tablo 4.1. Grupların ortalama canlı ağırlık değerlerinin (gr) haftalara göre tanımlayıcı istatistikleri ve karşılaştırma sonuçları (AA: Aralıklı Açlık, Kap: Kapsaisin).

Ortalama ± Standart Hata Medyan (Minimum-Maksimum)					
	0. hafta	15. hafta		30. hafta	n
Kontrol	22.63 ± 0.73	25 ± 1.05 ^b	Kontrol	27.67 ± 0.71	6
	22.50 (19-25)	26 (20-28)		28.50 (25-29)	
Obez	20.97 ± 0.54 21 (14-27)	27.92 ± 0.59 ^a 28 (18-37)	Obez	30 ± 2.15 30 (21-38)	8
			Obez + AA	28 ± 1.12 28 (22-32)	8
			Obez + Kap	28.40 ± 1.29 28 (26-33)	5
			Obez + AA + Kap	28.80 ± 1.16 30 (26-31)	5

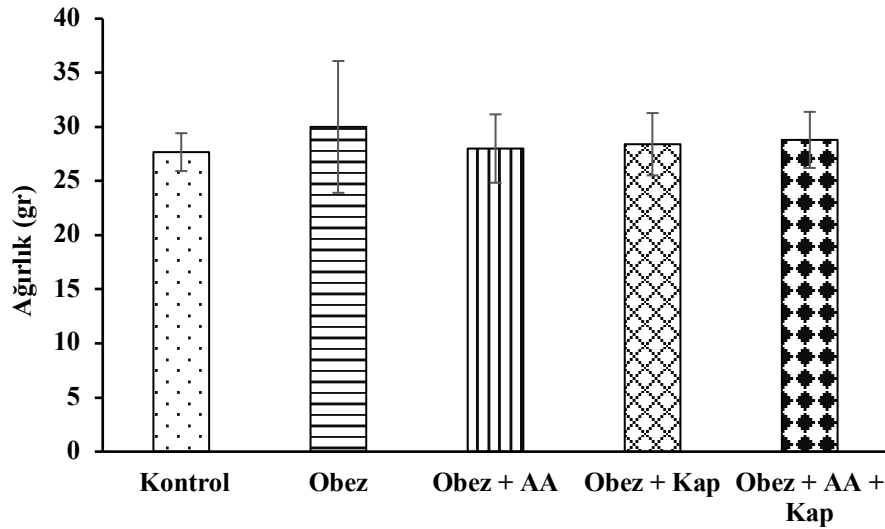
^{a,b}Belli bir haftadaki gruplar arası karşılaştırmaları göstermektedir (Farklı harfle gösterilen değerler için gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır p<0.05).

Kontrol grubu ile obez grubunun 0. ve 15. haftalardaki canlı ağırlık değerleri karşılaştırıldığında, obez grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde canlı ağırlık artışı gerçekleştiği tespit edildi ($p<0.05$) (Tablo 4.1, Şekil 4.1).



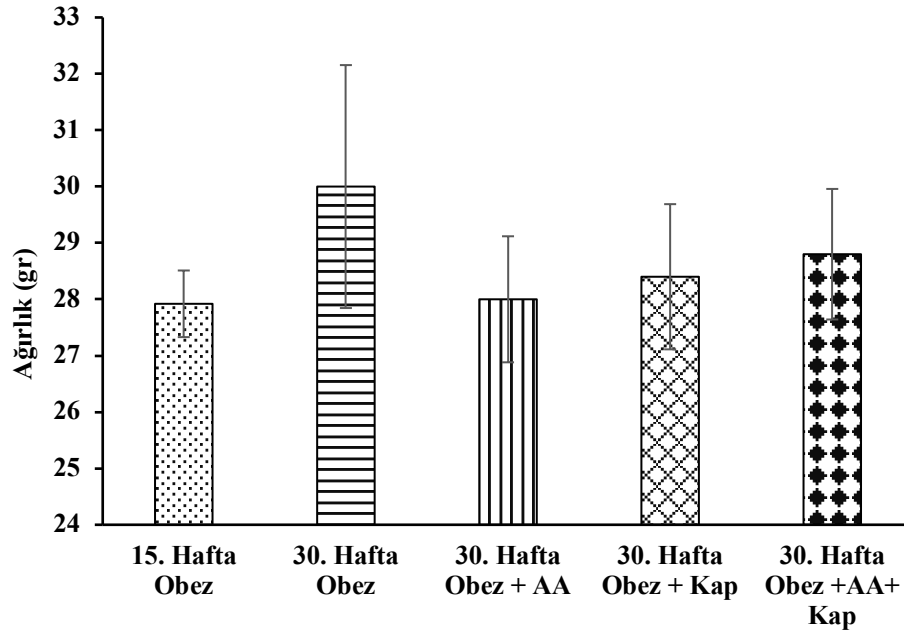
Şekil 4.1. Kontrol ve obez grubuna ait 0. ve 15. haftalardaki ortalama canlı ağırlık değerleri (gr). ^{a, b}Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

Grupların 30. haftadaki ortalama canlı ağırlık değerleri karşılaştırıldığında ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (Tablo 4.1, Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Grupların 30. haftadaki ortalama canlı ağırlık değerleri (gr).

30. hafta obez ve tedavi gruplarının ortalama canlı ağırlık değerleri 15. haftanın obez grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı (Tablo 4.1, Şekil 4.3).



Şekil 4.3. 30. hafta obez ve tedavi gruplarının ortalama ağırlık değerlerinin 15. hafta obez grupla karşılaştırılması.

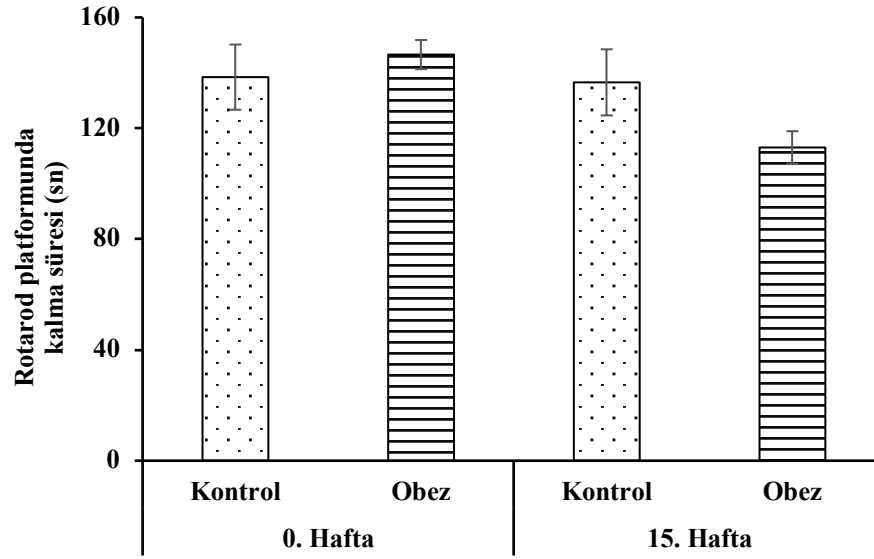
4.1.2. Rotarod Performans Testi Bulguları

Farelerin dönen bir mil üzerindeki toplam kalma sürelerinden elde edilen rotarod platformunda kalma sürelerinin gruplara ve haftalara göre tanımlayıcı istatistikleri ve karşılaştırma sonuçları Tablo 4.2 ve Şekil 4.4-6'da verilmiştir.

Tablo 4.2. Farelerin rotarod platformunda kalma sürelerinin (sn) gruplara ve haftalara göre tanımlayıcı istatistikleri ve karşılaştırma sonuçları (AA: Aralıklı Açlık, Kap: Kapsaisin).

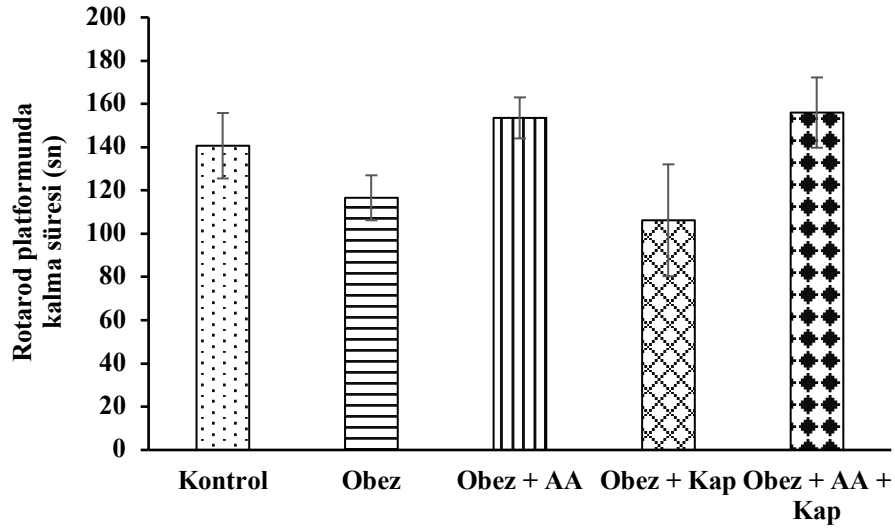
Ortalama ± Standart Hata Medyan (Minimum-Maksimum)				
	0. hafta	15. hafta	30. hafta	n
Kontrol	138.46 ± 11.77 143 (81.33-196)	136.57 ± 11.93 145.33 (87.67-172.33)	Kontrol 140.67 ± 15.13 127.17 (106.33-91)	6
Obez	146.60 ± 5.27 150.50 (77.67-49.67)	113.07 ± 5.88 110.67 (46.67-181.67)	Obez 116.60 ± 10.40 116.67 (70.33-165.33)	8
			Obez + AA 153.54 ± 9.49* 151 (127.33-209.33)	8
			Obez + Kap 106.20 ± 25.87 107.33 (58-199.67)	5
			Obez + AA + Kap 156 ± 16.26* 164.33 (109.33-198)	5

*30. haftadaki grupların 15. haftadaki obez grupla karşılaştırılmasında değerler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.05).



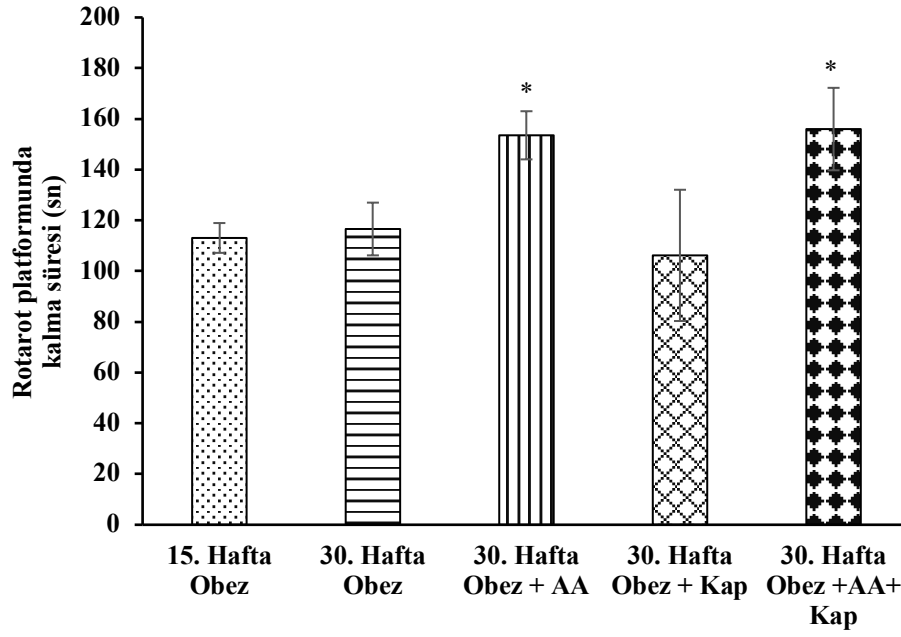
Şekil 4.4. Kontrol ve obez grubuna ait 0. ve 15. haftalardaki ortalama rotarod platformunda kalma süreleri (sn).

Grupların 30. haftadaki rotarod platformunda kalma süreleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (Tablo 4.2, Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Grupların 30. haftadaki rotarod platformunda kalma süreleri (sn).

30. hafta obez ve tedavi gruplarının rotarod platformunda kalma süreleri 15. haftanın obez grubuyla karşılaştırıldığında, Obez + AA grubu ile Obez + AA + Kap grubunun rotarod platformunda kalma süresinin daha uzun olduğu tespit edildi ($p < 0.05$) (Tablo 4.2, Şekil 4.6).



Şekil 4.6. 30. hafta obez ve tedavi gruplarının rotarod platformunda kalma sürelerinin 15. hafta obez grupla karşılaştırılması. *30. haftadaki grupların 15. haftadaki obez grupla karşılaştırılmasında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

4.1.3. Hot Plate Testine Ait Bulgular

Farelerin 55 °C’de termal ağrılı uyarana karşı verdikleri tepki sürelerinin (hot plate latansları) gruplara ve haftalara göre tanımlayıcı istatistikleri ve karşılaştırma sonuçları Tablo 4.3 ve Şekil 4.7-9’ da verilmiştir.

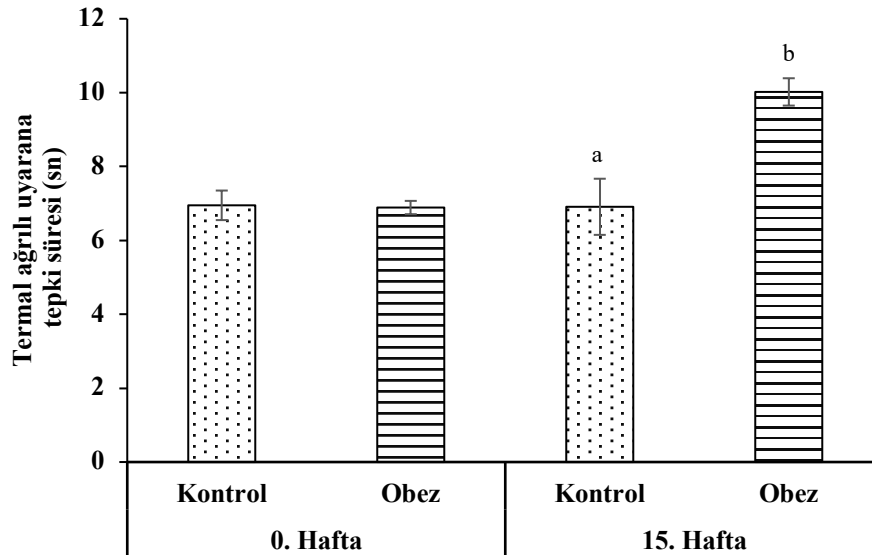
Tablo 4.3. Farelerin hot plate testinden elde edilen termal ağırlı uyarana tepki sürelerinin (sn) gruplara ve haftalara göre tanımlayıcı istatistikleri ve karşılaştırma sonuçları (AA: Aralıklı Açlık, Kap: Kapsaisin).

Ortalama ± Standart Hata					
Medyan (Minimum-Maksimum)					
0. hafta		15. hafta	30. hafta	n	
Kontrol	6.95 ± 0.40	6.91 ± 0.76 ^a	7.47 ± 0.67	6	
	6.93 (5.35-9.05)	8.10 (3.50-9.20)	6.80 (6.80-8.80)		
Obez	6.89 ± 0.18 7.15 (4.05-9.15)	10.02 ± 0.37 ^b 9.60 (5.70-15.10)	Obez	8.17 ± 0.37 8.10 (3.50-9.20)	8
			Obez + AA	7.68 ± 0.55* 7.05 (5.50-0.30)	8
			Obez + Kap	8.36 ± 0.78 7.70 (6.50-0.80)	5
			Obez + AA + Kap	8.58 ± 1.12 8 (6.30-12.10)	5

^{a,b}Belli bir haftadaki gruplar arası karşılaştırmaları göstermektedir (Farklı harfle gösterilen değerler için gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır p<0.05).

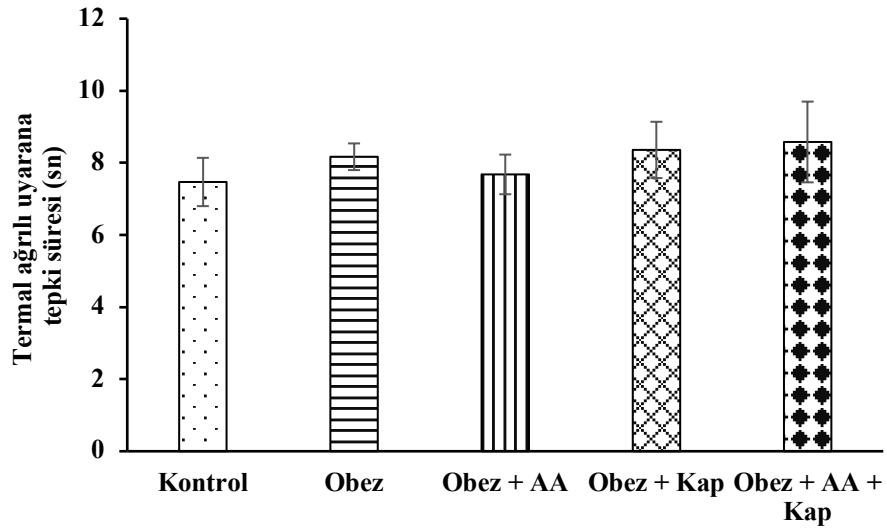
*30. haftadaki grupların 15. haftadaki obez grubuyla karşılaştırılmasında değerler arasındaki fark anlamlıdır (p<0.05).

Kontrol grubu ile obez grubunun 0. ve 15. haftalardaki termal ağırlı uyarana tepki süreleri karşılaştırıldığında, obez grubunun tepki süresinin anlamlı düzeyde uzadığı tespit edildi (p<0.05) (Tablo 4.3, Şekil 4.7).



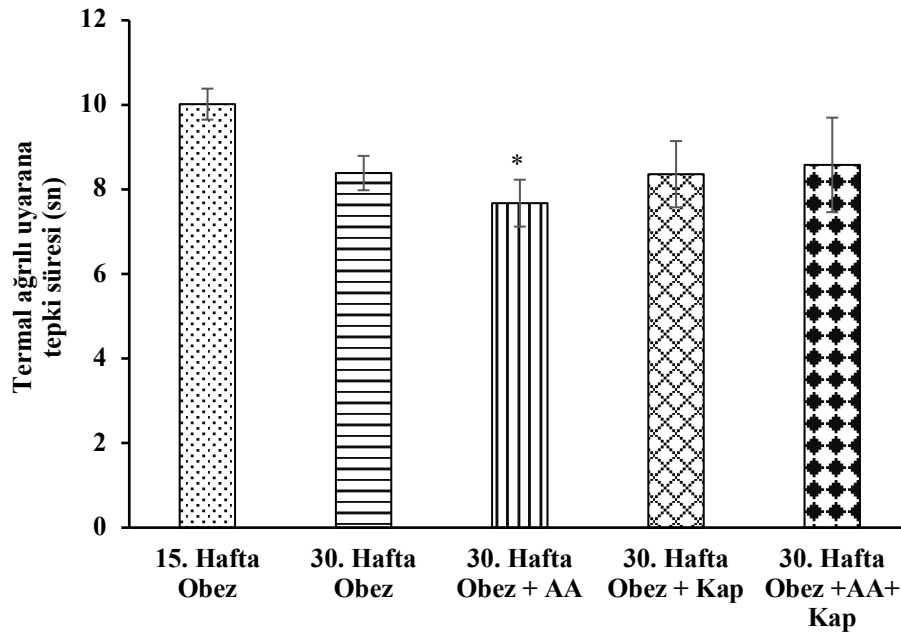
Şekil 4.7. Kontrol ve obez grubuna ait 0. ve 15. haftalardaki termal ağırlı uyarana tepki süreleri (sn). ^{a,b}Farklı harfle gösterilen gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.05).

Grupların 30. haftadaki termal ağırlı uyarana tepki süreleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (Tablo 4.3, Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Grupların 30. haftadaki termal ağırlı uyarana tepki süreleri (sn).

30. hafta obez ve tedavi gruplarının termal ağırlı uyarana tepki süreleri 15. haftanın obez grubuyla karşılaştırıldığında, Obez + AA grubunun istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşük olduğu tespit edildi ($p < 0.05$) (Tablo 4.3, Şekil 4.9).



Şekil 4.9. 30. hafta obez ve tedavi gruplarının termal ağırlı uyarana tepki sürelerinin 15. hafta obez gruba karşılaştırılması. *30. haftadaki grupların 15. haftadaki obez gruba karşılaştırılmasında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$).

4.1.4. Tail-Flick Testine Ait Bulgular

Farelerin kuyruk çekme testi cihazıyla kuyruklarından elde edilen ağırlı ılık-ısıl uyarana tepki sürelerinin (tail-flick latansı) gruplara ve haftalara göre tanımlayıcı istatistikleri ve karşılaştırma sonuçları Tablo 4.4, Şekil 4.10-12’de verilmiştir.

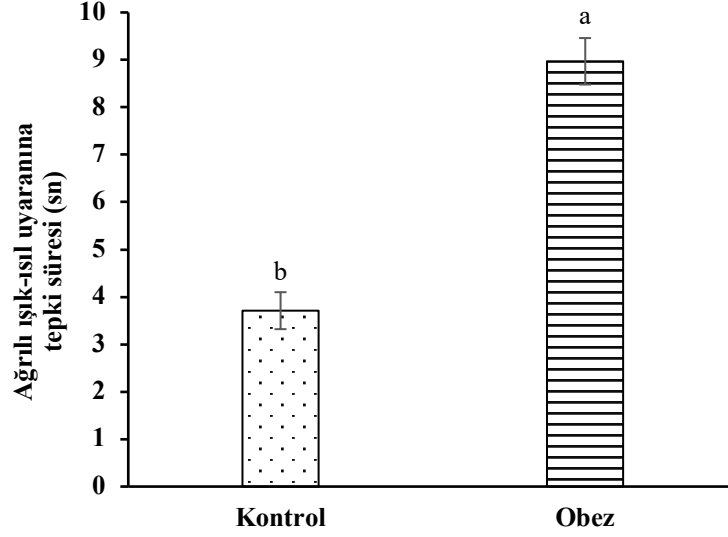
Tablo 4.4. Farelerin tail-flick testi ağırlı ılık-ısıl uyarana tepki sürelerinin (sn) gruplara ve haftalara göre tanımlayıcı istatistikleri ve karşılaştırma sonuçları (AA: Aralıklı Açlık, Kap: Kapsaisin).

Ortalama ± Standart Hata				
Medyan (Minimum-Maksimum)				
15. hafta		30. hafta		n
Kontrol	3.71 ± 0.39 ^b 3.80 (2.30-5.40)	Kontrol	3.07 ± 1.04 2.40 (1.70-5.10)	7
Obez	8.97 ± 0.49 ^a 10 (2.30-15)	Obez	4.50 ± 0.67* 3.90 (2.20-7.90)	8
		Obez + AA	3.60 ± 0.43* 3.35 (1.60-5.40)	8
		Obez + Kap	3.72 ± 0.46* 3.86 (2.30-4.90)	5
		Obez + AA + Kap	2.75 ± 0.21* 2.80 (2.20-3.20)	5

^{a,b}Belli bir haftadaki gruplar arası karşılaştırmaları göstermektedir (Farklı harfle gösterilen değerler için gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır p<0.05).

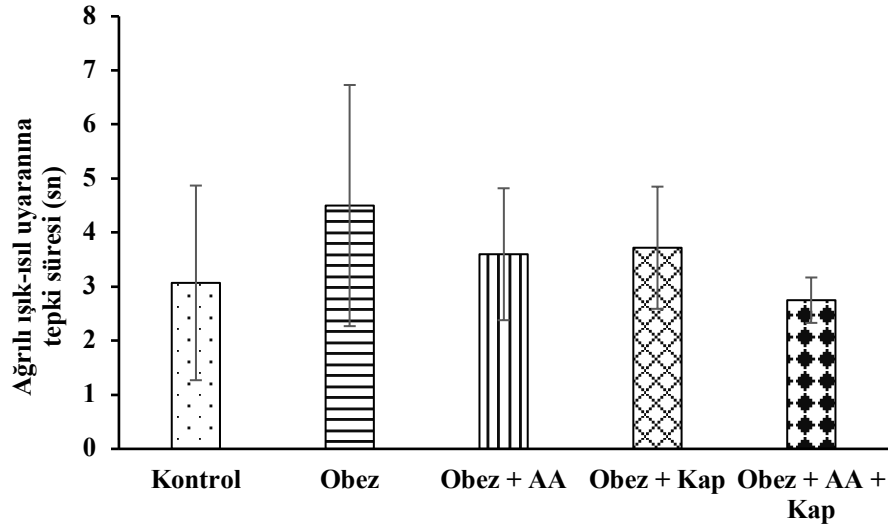
*30. Haftadaki grupların 15. Haftadaki obez grubuyla karşılaştırılmasında değerler arasındaki fark anlamlıdır (p<0.05).

Kontrol grubu ile obez grubunun 0. ve 15. haftalardaki ağırlı ılık-ısıl uyarana tepki süreleri karşılaştırıldığında, obez grubunun ağırlı ılık-ısıl uyarana tepki süresinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde uzadığı tespit edildi (p<0.05) (Tablo 4.4, Şekil 4.10).



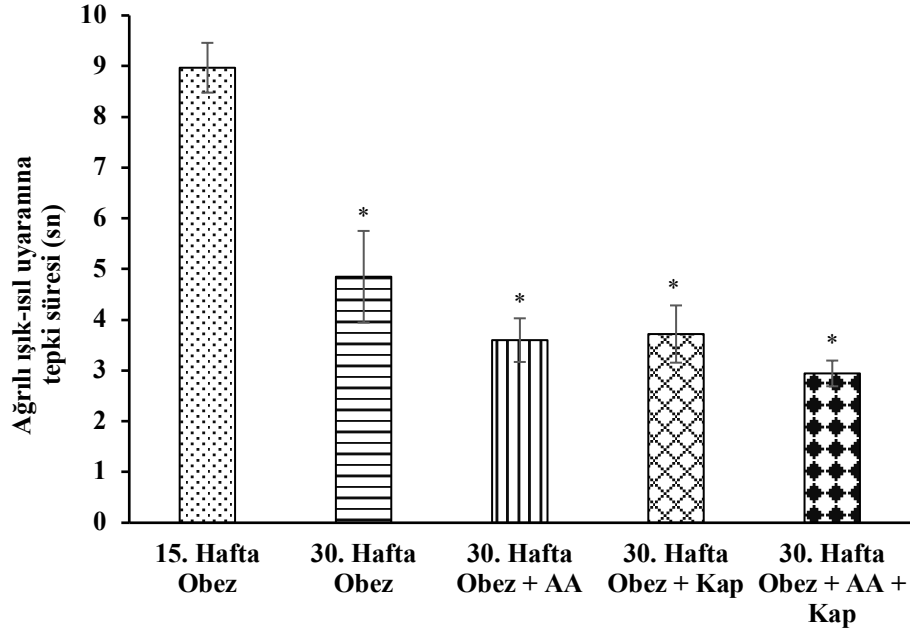
Şekil 4.10. Kontrol ve obez grubuna ait 0. ve 15. haftalardaki ağırlı ışık-ısıl uyarana tepki süreleri (sn). ^{a,b}Farklı harfle gösterilen gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$).

Grupların 30. haftadaki ağırlı ışık-ısıl uyarana tepki süreleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemekle birlikte Obez + AA, Obez + Kap ve Obez + AA + Kap gruplarında Obez grubuna göre ağırlı ışık-ısıl uyarana tepki sürelerinde kısalma eğiliminde olduğu gözlemlendi (Tablo 4.4, Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Grupların 30. haftadaki ağırlı ışık-ısıl uyarana tepki süreleri (sn).

30. hafta obez ve tedavi gruplarının ağırlı ışık-ısıl uyarana tepki süreleri 15. haftanın obez grubuyla karşılaştırıldığında, Obez + AA ile Obez + AA + Kap grubunun ağırlı ışık-ısıl uyarana tepki süresi önemli düzeyde daha kısaydı ($p < 0.05$) (Tablo 4.4, Şekil 4.12).



Şekil 4.12. 30. haftada obez ve tedavi gruplarının ağırlı ışık-ısıl uyaranına tepki sürelerinin 15. haftadaki obez grupla karşılaştırılması. *30. haftadaki grupların 15. haftadaki obez grupla karşılaştırılmasında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

4.1.5. Elektromiyografi Bulguları

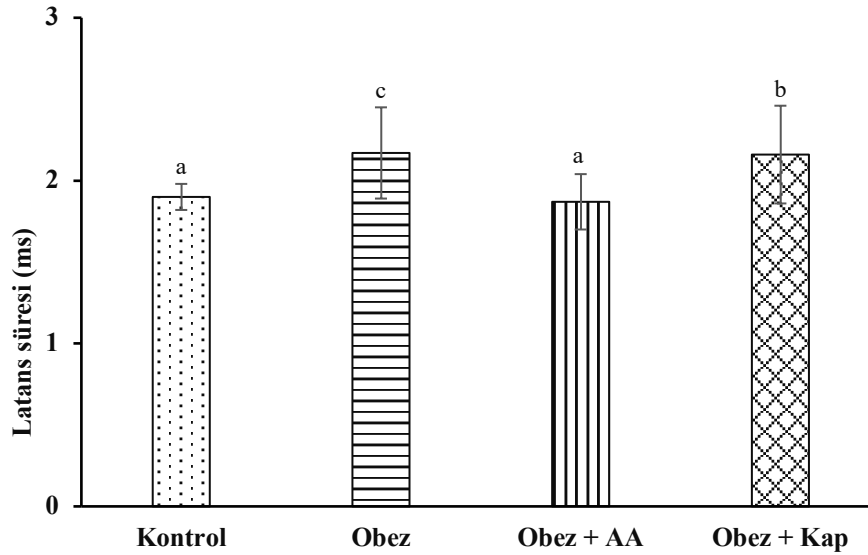
Elektrofizyolojik testler, 30. haftada gerçekleştirildi. Çalışmada Obez + AA + Kap grubunda bulunan farelerin anesteziye gösterdikleri aşırı duyarlılık sebebiyle hayatlarını kaybetmelerinden dolayı bu grubun elektromiyografi verileri alınamamıştır. Bileşik kas aksiyon potansiyeli (BKAP) verileri milivolt (mV) cinsinden, latans süresi milisaniye (ms), motor sinir ileti hızı (MSİH) verileri metre/saniye (m/s) cinsinden ifade edildi (Tablo 4.5, Şekil 4.13-15).

Tablo 4.5. Farelerin 30. haftadaki elektromiyografi verilerinin (latans süresi (ms), motor sinir ileti hızının (m/s) ve bileşik kas aksiyon potansiyelinin (mV)) gruplara göre tanımlayıcı istatistikleri ve karşılaştırma sonuçları (AA: Aralıklı Açlık, Kap: Kapsaisin).

Ortalama ± Standart Sapma				
Medyan (Minimum-Maksimum)				
	n	Latans	MSİH	BKAP
Kontrol	6	1.90 ± 0.08 ^a 1.86 (1.82-2.02)	40.76 ± 4.84 ^a 40.05 (35.14-46.43)	12.17 ± 3.24 10.41 (9.60-17)
Obez	8	2.17 ± 0.28 ^c 2.13 (1.88-2.64)	31.52 ± 5.64 ^b 32.29 (23.33-41.03)	8.75 ± 3.27 8.60 (3.67-14.08)
Obez + AA	7	1.87 ± 0.17 ^a 1.86 (1.64-2.14)	39.92 ± 10.42 ^a 37.50 (28.33- 60.87)	12.21 ± 3.62 12.18 (8.21-18.13)
Obez + Kap	5	2.16 ± 0.30 ^b 2.10 (1.90-2.66)	33.05 ± 10.12 ^b 30.95 (24.22-50)	10.54 ± 3.50 11.31 (4.76-14.27)

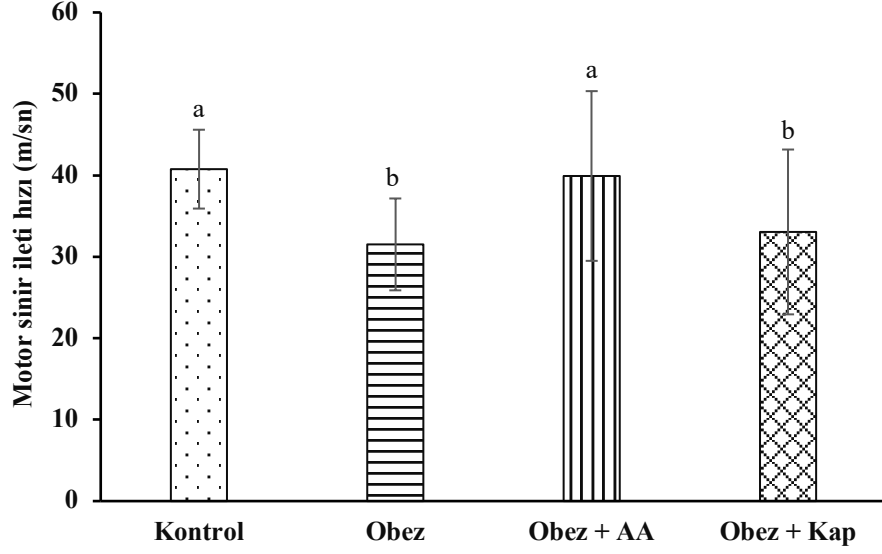
^{a,b,c}Farklı harfle gösterilen değerler için gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.05).

Latans süresi bakımından Obez grubu ile diğer gruplar arasında istatistik olarak anlamlı fark bulundu (p<0.05). En kısa latans Kontrol grubu ile Obez + AA grubunda, en uzun latans süresi ise Obez grubunda ölçüldü (p<0.05). Kontrol grubu ile Obez + AA grubu arasında anlamlı fark bulunamadı (Tablo 4.5, Şekil 4.13).



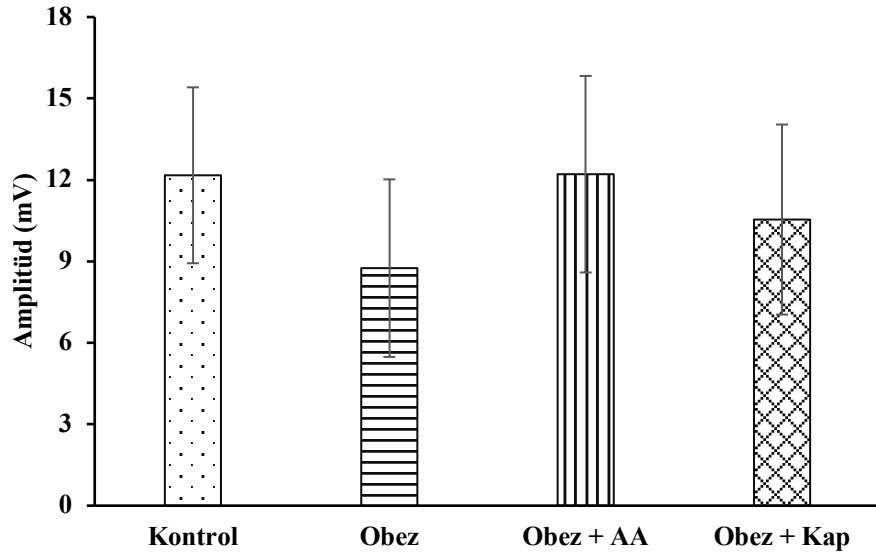
Şekil 4.13. Grupların 30. haftadaki başlangıç latans süreleri (ms). ^{a,b,c}Farklı harfle gösterilen gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.05).

Kontrol ile Obez + AA grubunun motor sinir ileti hızlarının, Obez grubu ile Obez + AA grubundan istatistiksel olarak anlamlı oranda daha yüksek olduğu gözlemlendi (p<0.05) (Tablo 4.5, Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Grupların 30. haftadaki motor sinir ileti hızları (m/sn). ^{a,b}Farklı harfle gösterilen gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$).

Bileşik kas aksiyon potansiyeli bakımından, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (Tablo 4.5, Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Grupların 30. haftadaki supramaksimal stimülasyona verdikleri bileşik kas aksiyon potansiyel yanıtları (mV).

4.1.6. İmmünohistokimya Bulguları

Farelerden alınan siyatik sinir doku kesitlerinde β III-Tub, NFH, MBP, P0 ve S100 protein belirteçleri; gastrocnemius kas dokusunda ise; NFH, α -BNG belirteçleri

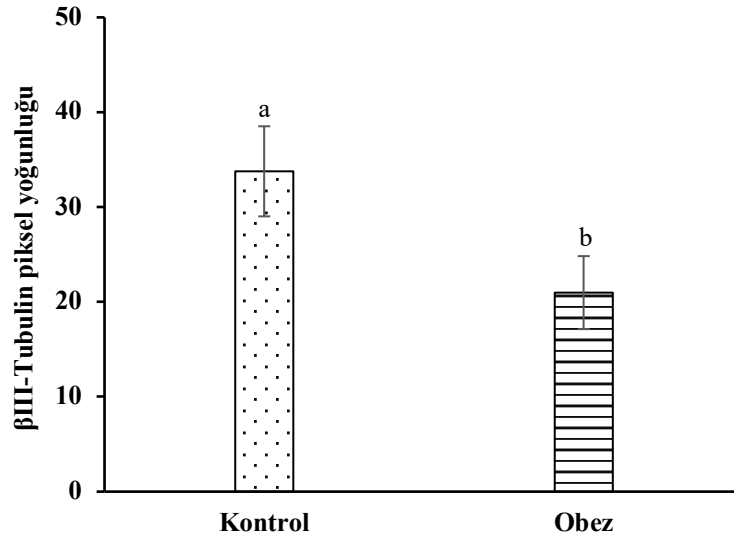
kullanılarak lazer taramalı konfokal mikroskopta immünfloresan görüntüleme gerçekleştirildi. Görüntülerin piksel yoğunlukları Image J programı ile analiz edildi.

15. haftada siyatik sinirde β III-Tub piksel yoğunluğunun, Kontrol grubunda Obez grubuna göre anlamlı oranda daha yüksek olduğu bulundu ($p<0.05$) (Tablo 4.6, Şekil 4.16, 4.22).

Tablo 4.6. Siyatik sinirde β III-Tubulin piksel yoğunluk verileri için gruplara ve haftalara göre tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırma sonuçları

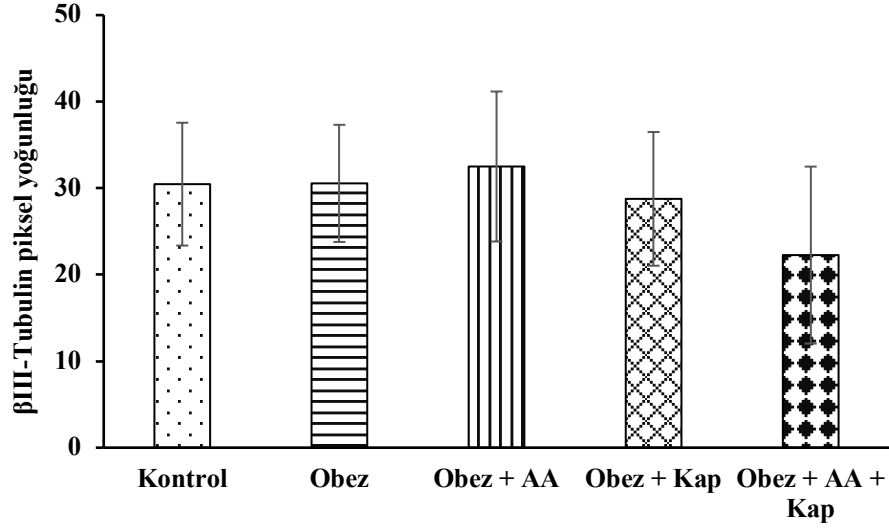
Ortalama $\pm$ Standart Hata			
Medyan (Minimum-Maksimum)			
15. hafta		30. hafta	
Kontrol	33.77 $\pm$ 4.75 ^a 31.59 (29.01- 41.12)	Kontrol	30.46 $\pm$ 7.1 31.45 (18.98-41.12)
Obez	20.98 $\pm$ 3.85 ^b 21.17 (17.12-24.46)	Obez	30.55 $\pm$ 6.77 31.3 (20.34-37.58)
		Obez + AA	32.5 $\pm$ 8.67 28.12 (22.43-45.57)
		Obez + Kap	28.76 $\pm$ 7.73 30.61 (15.62-38.83)
		Obez + AA + Kap	22.26 $\pm$ 10.23 17.82 (11.68-37.29)

^{a,b}Farklı harfle gösterilen değerler için gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).



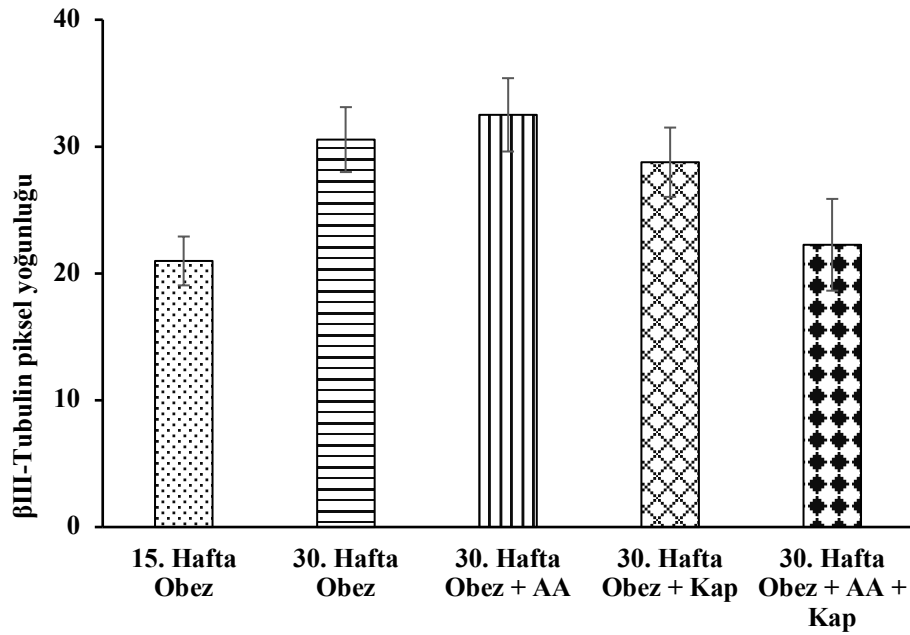
Şekil 4.16. Kontrol ve obez grubuna ait 15. haftadaki siyatik sinirde β III-Tubulin piksel yoğunlukları. ^{a,b}Farklı harfle gösterilen gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

30. hafta obez ve tedavi gruplarının siyatik sinirdeki β III-Tub piksel yoğunlukları bakımından gruplar arasında anlamlı fark bulunamadı (Tablo 4.6, Şekil 4.17, 4.23).



Şekil 4.17. Grupların 30. haftadaki siyatik sinirde β III-Tubulin piksel yoğunlukları.

30. hafta obez ve tedavi gruplarının siyatik sinirdeki β III-Tub piksel yoğunlukları 15. haftanın obez grubuyla karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi (Tablo 4.6, Şekil 4.18, 4.22-23).



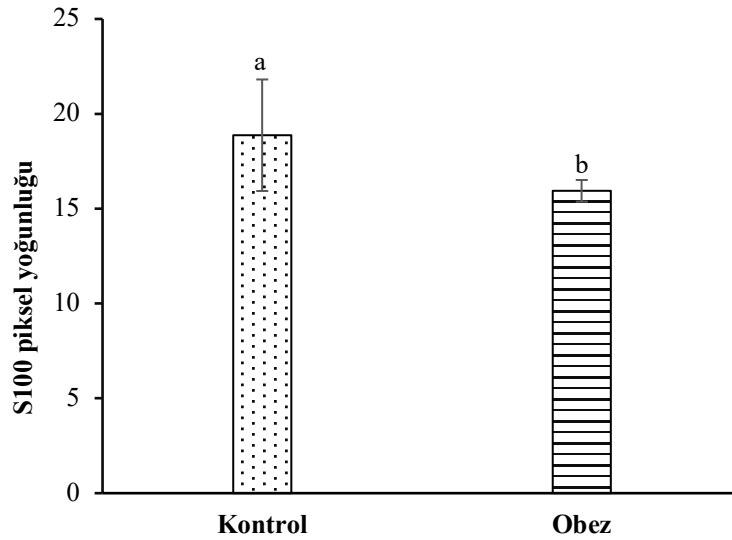
Şekil 4.18. 30. hafta obez ve tedavi gruplarının siyatik sinirde β III-Tubulin piksel yoğunluklarının 15. hafta obez grupla karşılaştırılması.

15. haftadaki Kontrol grubunun siyatik sinirde S100 piksel yoğunluğu, Obez grubundan daha yüksek bulundu ($p<0.05$) (Tablo 4.7, Şekil 4.19, 4.22)

Tablo 4.7. Siyatik sinirde S100 piksel yoğunluk verileri için gruplara ve haftalara göre tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırma sonuçları.

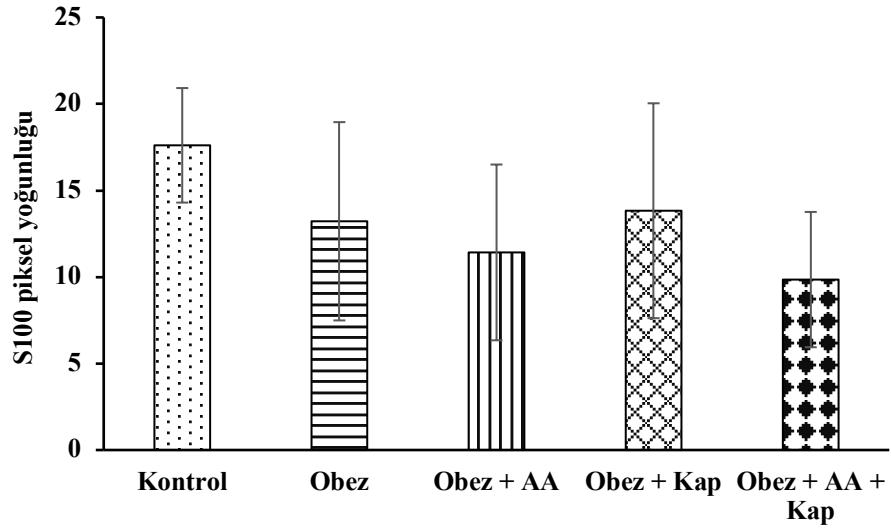
Ortalama $\pm$ Standart Hata Medyan (Minimum-Maksimum)			
15. hafta		30. hafta	
Kontrol	18.87 $\pm$ 2.94 ^a 17.75 (15.87-23.35)	Kontrol	17.61 $\pm$ 3.31 17.26 (13.15-23.35)
Obez	15.94 $\pm$ 0.57 ^b 15.79 (15.42-16.76)	Obez	13.22 $\pm$ 5.73 12.17 (6.65-22.62)
		Obez + AA	11.42 $\pm$ 5.08 10.37 (4.59-19.59)
		Obez + Kap	13.83 $\pm$ 6.21 13.89 (4.35-22.89)
		Obez + AA + Kap	9.85 $\pm$ 3.91 9.98 (4.76-15.25)

^{a,b}Farklı harfle gösterilen değerler için gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).



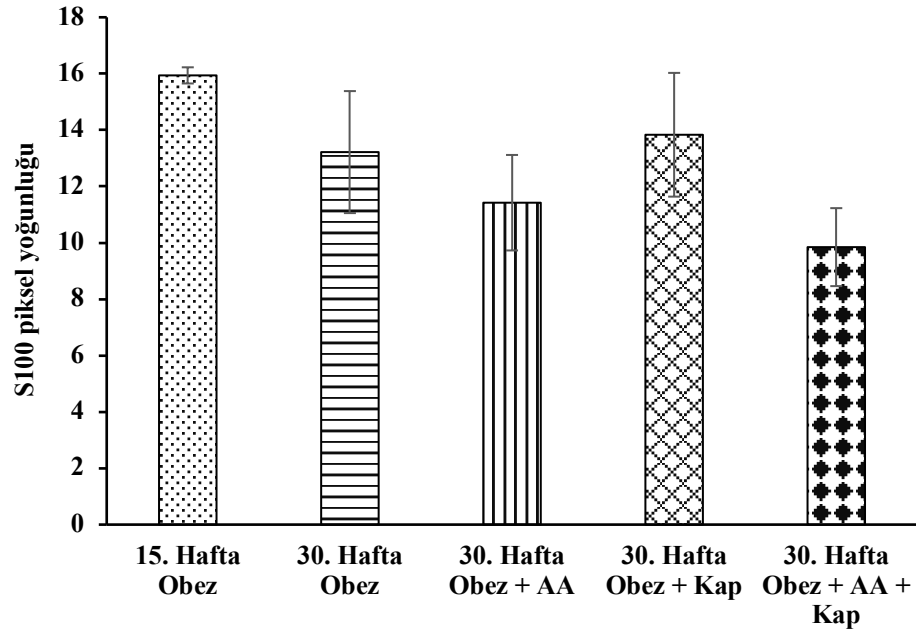
Şekil 4.19. Kontrol ve obez grubuna ait 15. haftadaki siyatik sinirde S100 piksel yoğunlukları. ^{a,b}Farklı harfle gösterilen gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

30. haftada obez ve tedavi gruplarının siyatik sinirdeki S100 piksel yoğunluğu bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi (Tablo 4.7, Şekil 4.20, 4.23).

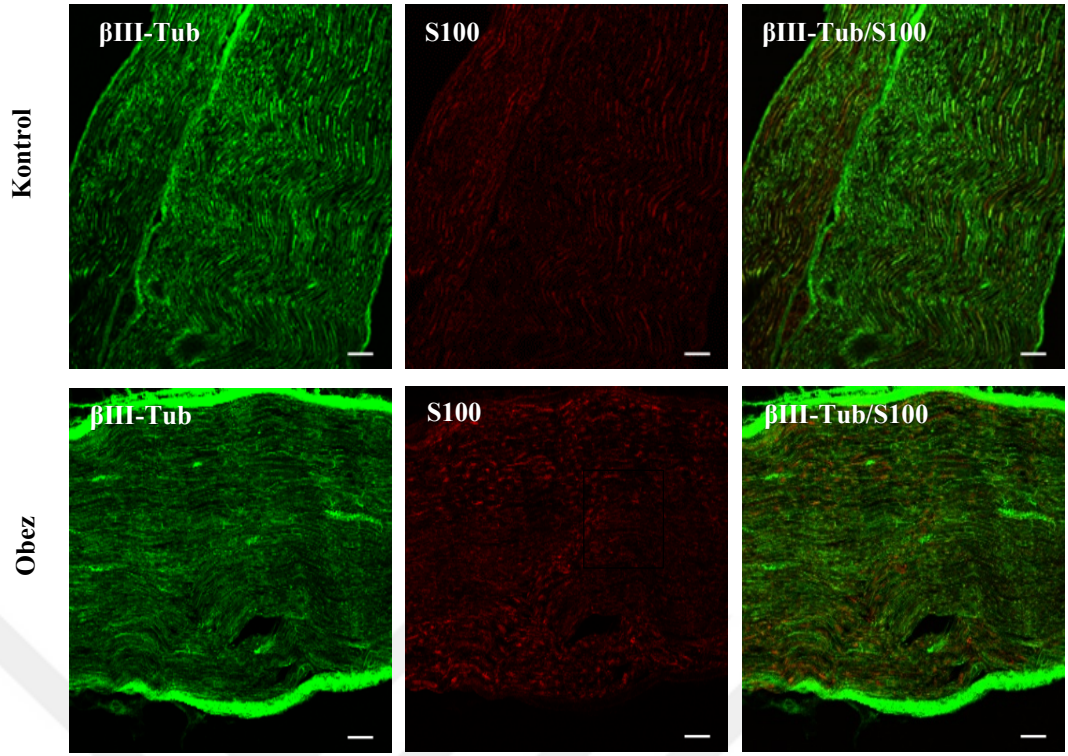


Şekil 4.20. Grupların 30. haftadaki siyatik sinirde S100 piksel yoğunlukları.

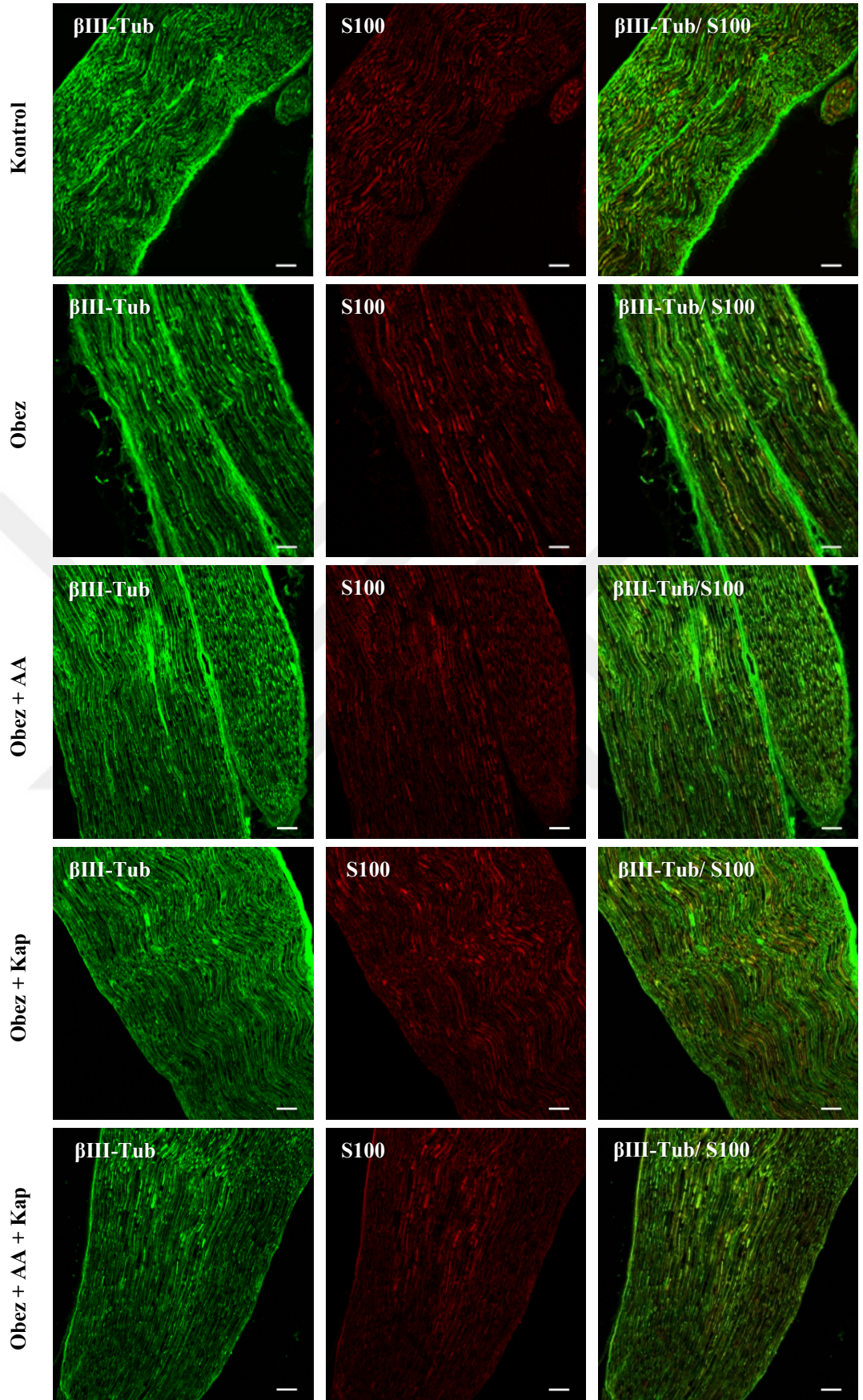
30. hafta obez ve tedavi gruplarının siyatik sinirdeki S100 piksel yoğunlukları 15. haftanın obez grubuyla karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Tablo 4.7, Şekil 4.21-23).



Şekil 4.21. 30. haftad obez ve tedavi gruplarının siyatik sinirde S100 piksel yoğunluklarının 15. hafta obez grupla karşılaştırılması.



Şekil 4.22. Kontrol ve obez grubuna ait 15. haftadaki siyatik sinirde β III-Tubulin ve S100 immünohistokimya görüntüleri (Objektif büyütmesi: 20X; skala bar: 40 μ m).



Şekil 4.23. Grupların 30. haftadaki siyatik sinirde β III-Tubulin ve S100 immünohistokimya görüntüleri (Objektif büyütmesi: 20X; skala bar: 40 μ m).

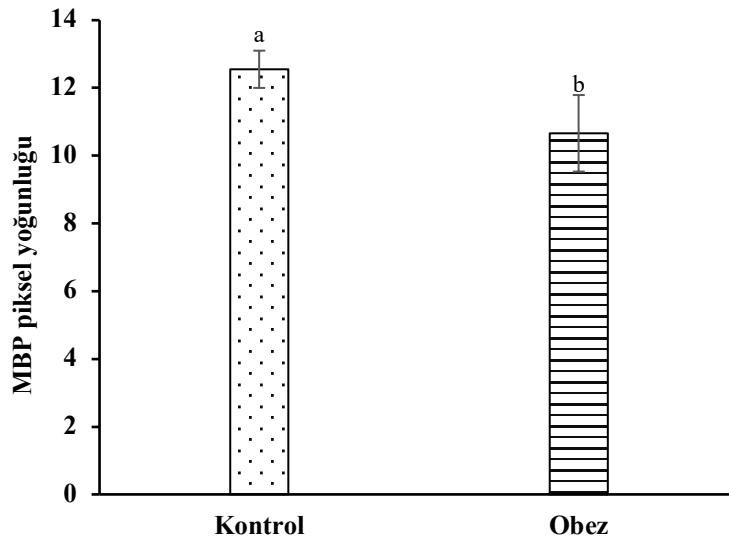
15. haftada siyatik sinirde MBP piksel yoğunluğunun, Kontrol grubunda Obez grubuna göre anlamlı oranda daha yüksek olduğu gözlemlendi ($p<0.05$) (Tablo 4.8, Şekil 4.24, 4.30).

Tablo 4.8. Siyatik sinirde MBP piksel yoğunluk verileri için gruplara ve haftalara göre tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırma sonuçları.

Ortalama $\pm$ Standart Hata			
Medyan (Minimum-Maksimum)			
15. hafta		30. hafta	
Kontrol	12.55 $\pm$ 0.55 ^a 12.74 (11.66-13.08)	Kontrol	11.45 $\pm$ 1.66 ^{ab} 12.03 (8.22-13.11)
Obez	10.66 $\pm$ 1.13 ^b 10.67 (9.2-12.46)	Obez	9.46 $\pm$ 1.8 ^c 8.97 (7.87-13.74)
		Obez + AA	9.13 $\pm$ 0.8 ^{c*} 9.41 (7.99-10.07)
		Obez + Kap	10.18 $\pm$ 1.24 ^{bc} 9.76 (8.49-12.3)
		Obez + AA + Kap	12.37 $\pm$ 1.82 ^{a*} 11.87 (10.87-16.02)

^{a,b,c}Belli bir haftadaki gruplar arası karşılaştırmaları göstermektedir (Farklı harfle gösterilen değerler için gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır $p<0.05$).

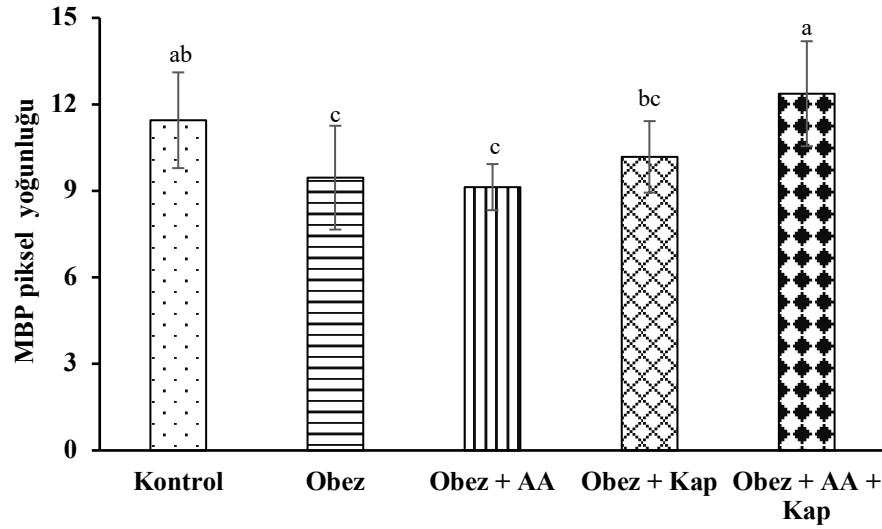
*30. haftadaki grupların 15. haftadaki obez grubuyla karşılaştırılmasında değerler arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).



Şekil 4.24. Kontrol ve obez grubuna ait 15. haftadaki siyatik sinirde MBP piksel yoğunlukları. ^{a,b}Farklı harfle gösterilen gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

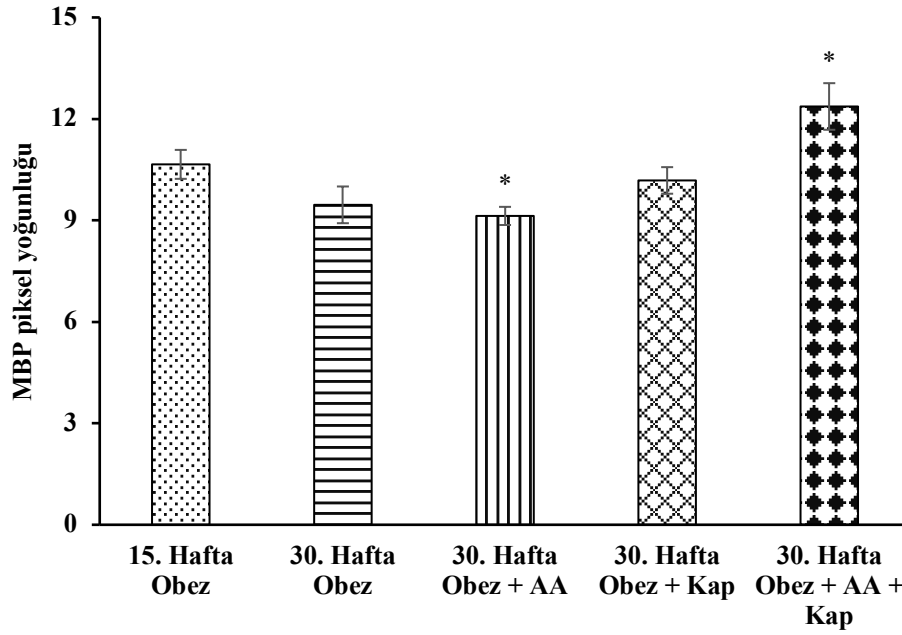
30. hafta obez ve tedavi gruplarının siyatik sinirdeki MBP piksel yoğunlukları karşılaştırıldığında, Kontrol ile Obez + AA + Kap grubunun piksel yoğunlukları, diğer

gruplardan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksekti ($p<0.05$). Diğer gruplar arasında fark yoktu (Tablo 4.8, Şekil 4.25, 4.31).



Şekil 4.25. Grupların 30. haftadaki siyatik sinirde MBP piksel yoğunlukları.
a,b,c Farklı harfle gösterilen gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

30. hafta obez ve tedavi gruplarının siyatik sinirdeki MBP piksel yoğunlukları 15. haftanın obez grubuyla karşılaştırıldığında Obez + AA + Kap grubunun piksel yoğunluğu anlamlı oranda daha yüksekken ($p<0.05$), Obez + AA grubunun ise piksel yoğunluğu ise anlamlı oranda daha düşük olarak gözlemlendi ($p<0.05$) (Tablo 4.8, Şekil 4.26, 4.30-31).



Şekil 4.26. 30. haftadaki obez ve tedavi gruplarının siyatik sinirde MBP piksel yoğunluklarının 15. haftadaki obez grupla karşılaştırılması. *30. haftadaki grupların 15. haftadaki obez grupla karşılaştırılmasında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

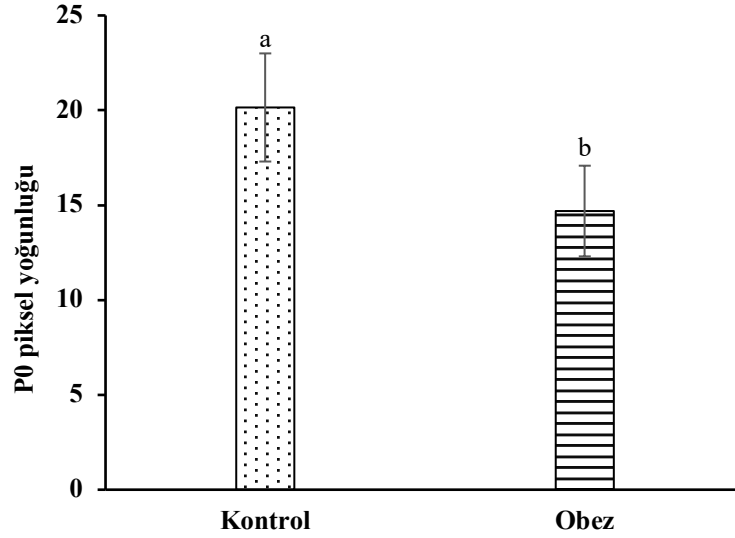
15. haftadaki siyatik sinirin P0 piksel yoğunluğu Kontrol grubunda, Obez grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda daha yüksek olduğu bulundu ($p<0.05$) (Tablo 4. 9, Şekil 4.27, 4.30).

Tablo 4.9. Siyatik sinirde P0 piksel yoğunluk verileri için gruplara ve haftalara göre tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırma sonuçları

Ortalama $\pm$ Standart Hata			
Medyan (Minimum-Maksimum)			
15. hafta		30. hafta	
Kontrol	20.15 $\pm$ 2.85 ^a 18.9 (17.89-24.64)	Kontrol	17.32 $\pm$ 3.27 ^{dc} 16.76 (12.36-24.64)
Obez	14.69 $\pm$ 2.39 ^b 14.73 (11.89- 18.96)	Obez	14.10 $\pm$ 2.2 ^b 13.77 (11.03-18.09)
		Obez + AA	16.95 $\pm$ 3.58 ^{bc} 18.51 (11.3-20.83)
		Obez + Kap	12.92 $\pm$ 1.63 ^a 12.64 (10.33-15.72)
		Obez + AA + Kap	17.76 $\pm$ 2.85 ^{d*} 18.27 (14.01-22.59)

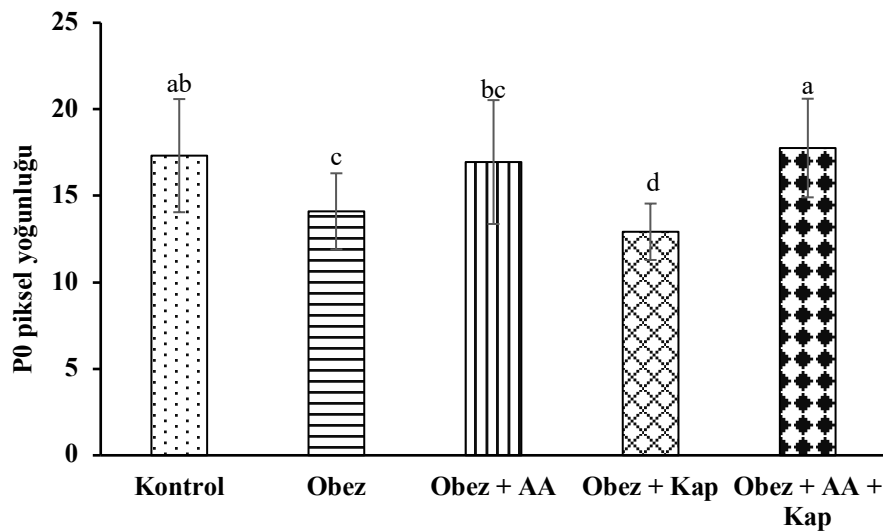
^{a,b,c,d}Belli bir haftadaki gruplar arası karşılaştırmaları göstermektedir (Farklı harfle gösterilen değerler için gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır $p<0.05$).

*30. haftadaki grupların 15. haftadaki obez grubuyla karşılaştırılmasında değerler arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).



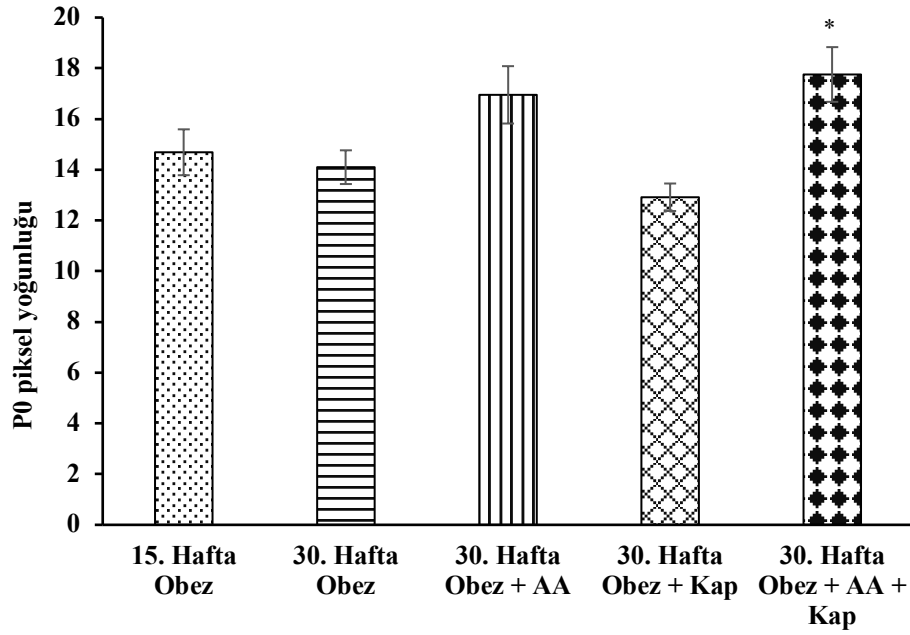
Şekil 4.27. Kontrol ve obez grubuna ait 15. haftadaki siyatik sinirde P0 piksel yoğunlukları. ^{a,b}Farklı harfle gösterilen gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

30. hafta obez ve tedavi gruplarının siyatik sinirdeki P0 piksel yoğunluğu karşılaştırıldığında Kontrol ve Obez + AA + Kap gruplarının piksel yoğunlukları, Obez ve Obez + Kap gruplarından anlamlı oranda daha yüksekti ($p<0.05$). Kontrol grubu ile Obez + AA ve Obez + AA + Kap grupları arasında anlamlı fark yoktu. Obez ve Obez + AA grupları arasında da anlamlı fark yoktu. Diğer taraftan Obez + Kap grubunun P0 piksel yoğunluğunun diğer tüm gruplarından daha düşük olduğu bulundu ($p<0.05$) (Tablo 4.19, Şekil 4.28, 4.31).

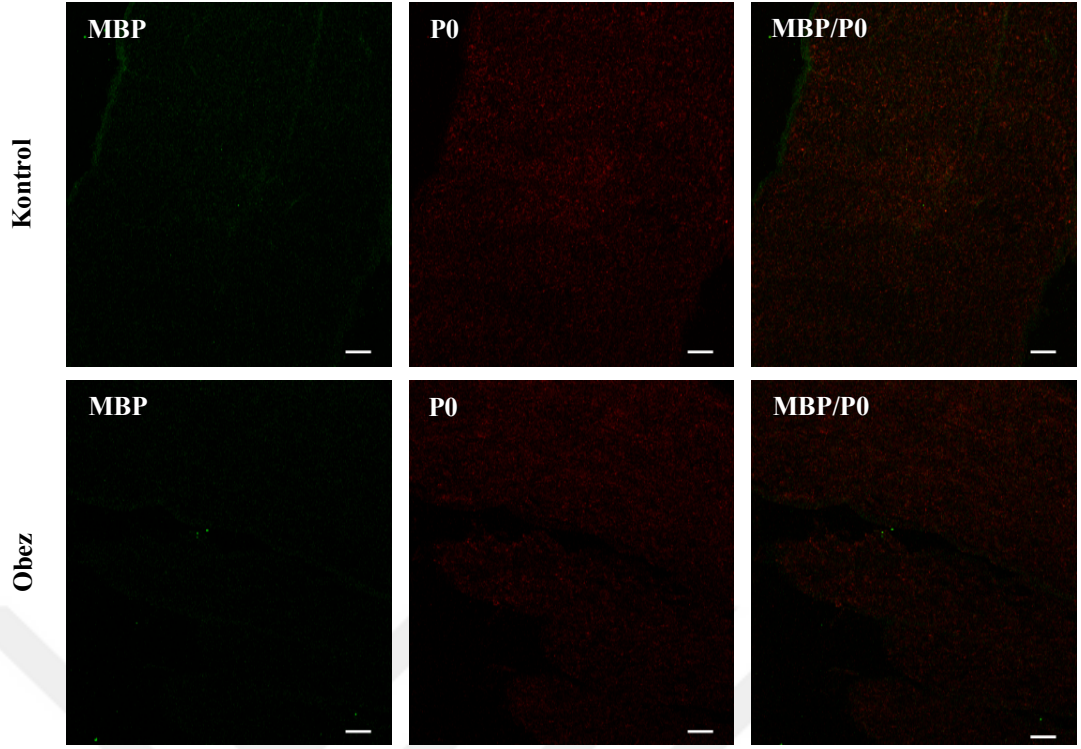


Şekil 4.28. Grupların 30. haftadaki siyatik sinirde P0 piksel yoğunlukları. ^{a,b,c,d}Farklı harfle gösterilen gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

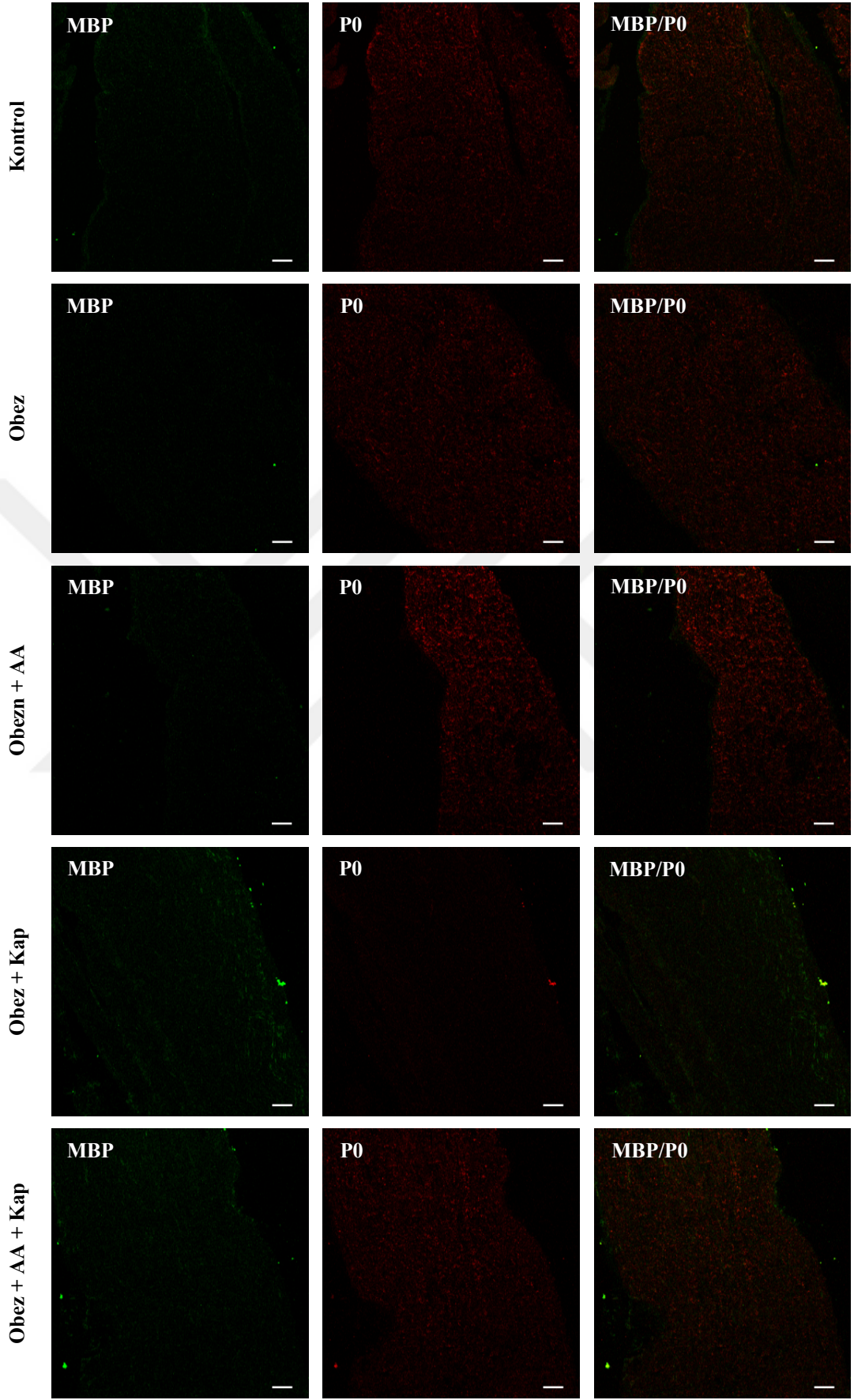
30. hafta obez ve tedavi gruplarının siyatik sinirdeki P0 piksel yoğunlukları 15. haftanın obez grubuyla karşılaştırıldığında, Obez + AA + Kap ve Obez + AA gruplarının P0 piksel yoğunlukları, Obez ve Obez + Kap gruplarından istatistiksel olarak anlamlı oranda daha yüksek olduğu bulundu ($p<0.05$). Fakat Obez + AA + Kap ile Obez + AA arasında istatistik olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi (Tablo 4. 9, Şekil 4.29, 4.30-31).



Şekil 4.29. 30. hafta obez ve tedavi gruplarının siyatik sinirde P0 piksel yoğunluklarının 15. hafta obez gruba karşılaştırılması. *30. haftadaki grupların 15. haftadaki obez gruba karşılaştırılmasında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).



Şekil 4.30. Kontrol ve obez grubuna ait 15. haftadaki siyatik sinirde MBP ve P0 immünohistokimya görüntüleri. (Objektif büyütmesi: 20X; skala bar: 40 µm)



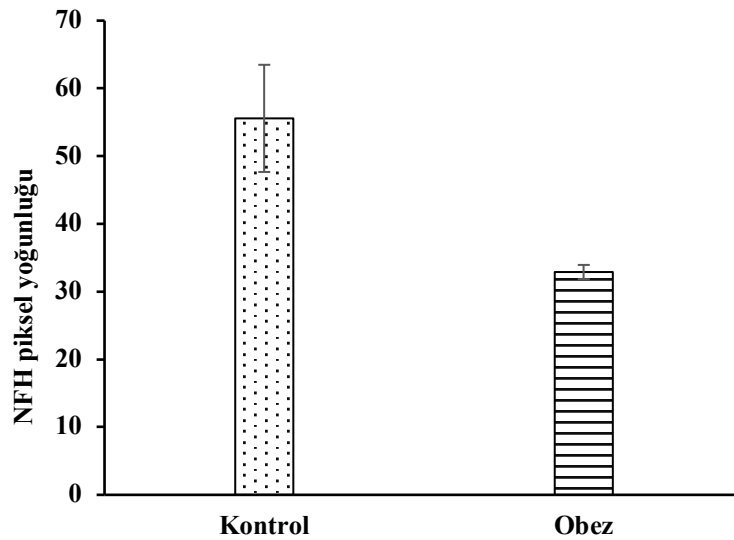
Şekil 4.31. Grupların 30. haftadaki siyatik sinirde MBP ve P0 immünohistokimya görüntüleri. (Objektif büyütmesi: 20X; skala bar: 40 µm)

15. haftada siyatik sinirde NFH piksel yoğunlukları karşılaştırıldığında Kontrol ve Obez grupları arasındaki anlamlı fark bulunmadı (Tablo 4.10, Şekil 4.32, 4,35).

Tablo 4.10. Siyatik sinirde NFH piksel yoğunluk verileri için gruplara ve haftalara göre tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırma sonuçları

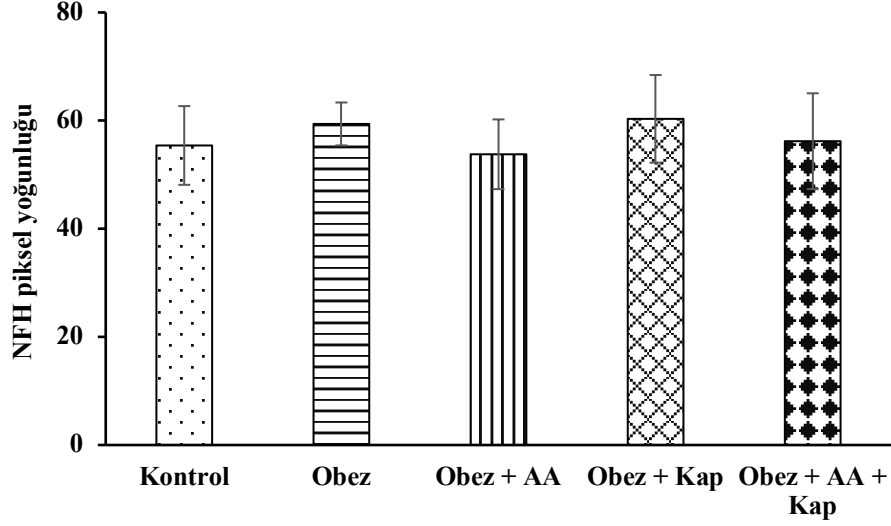
Ortalama $\pm$ Standart Sapma Medyan (Minimum-Maksimum)			
15. hafta		30. hafta	
Kontrol	55.57 $\pm$ 7.91 55.11 (45.01- 67.32)	Kontrol	55.4 $\pm$ 7.28 55.11 (45.01-67.32)
Obez	32.89 $\pm$ 1.05 32.89 (32.14-33.63)	Obez	59.38 $\pm$ 3.97* 59.29 (54.98-64.15)
		Obez + AA	53.77 $\pm$ 6.45* 51.81 (47.98-65.39)
		Obez + Kap	60.32 $\pm$ 8.11* 61.92 (46.52-66.24)
		Obez + AA + Kap	56.19 $\pm$ 8.86* 56.92 (42-66.94)

*30. haftadaki grupların 15. haftadaki obez grubuyla karşılaştırılmasında değerler arasındaki fark anlamlıdır (p<0.05).



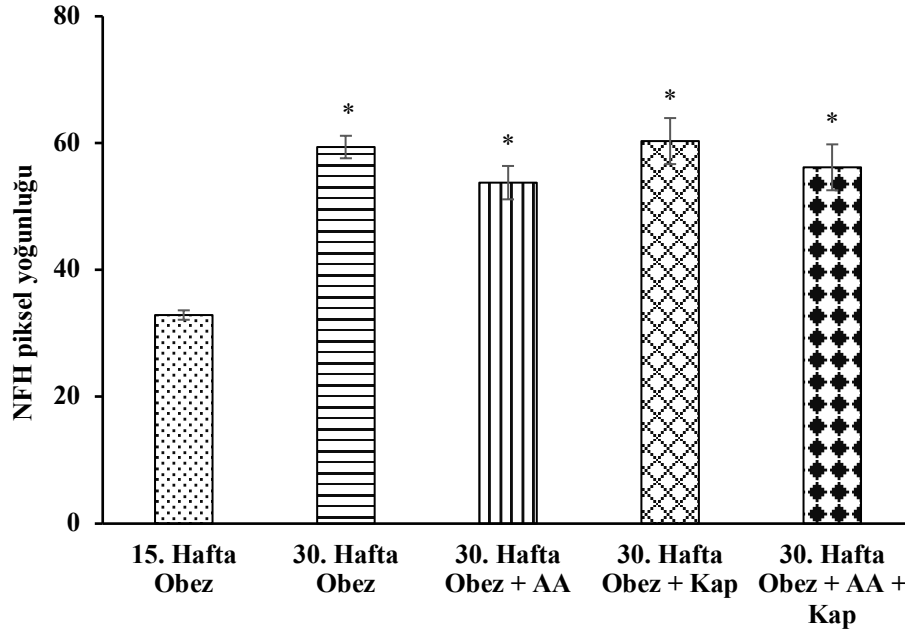
Şekil 4.32. Kontrol ve obez grubuna ait 15. haftadaki siyatik sinirde NFH piksel yoğunlukları.

30. hafta obez ve tedavi gruplarının siyatik sinirdeki NFH piksel yoğunlukları karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistik olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Tablo 4.10, Şekil 4.33, 4.35).



Şekil 4.33. Grupların 30. haftadaki siyatik sinirde NFH piksel yoğunlukları.

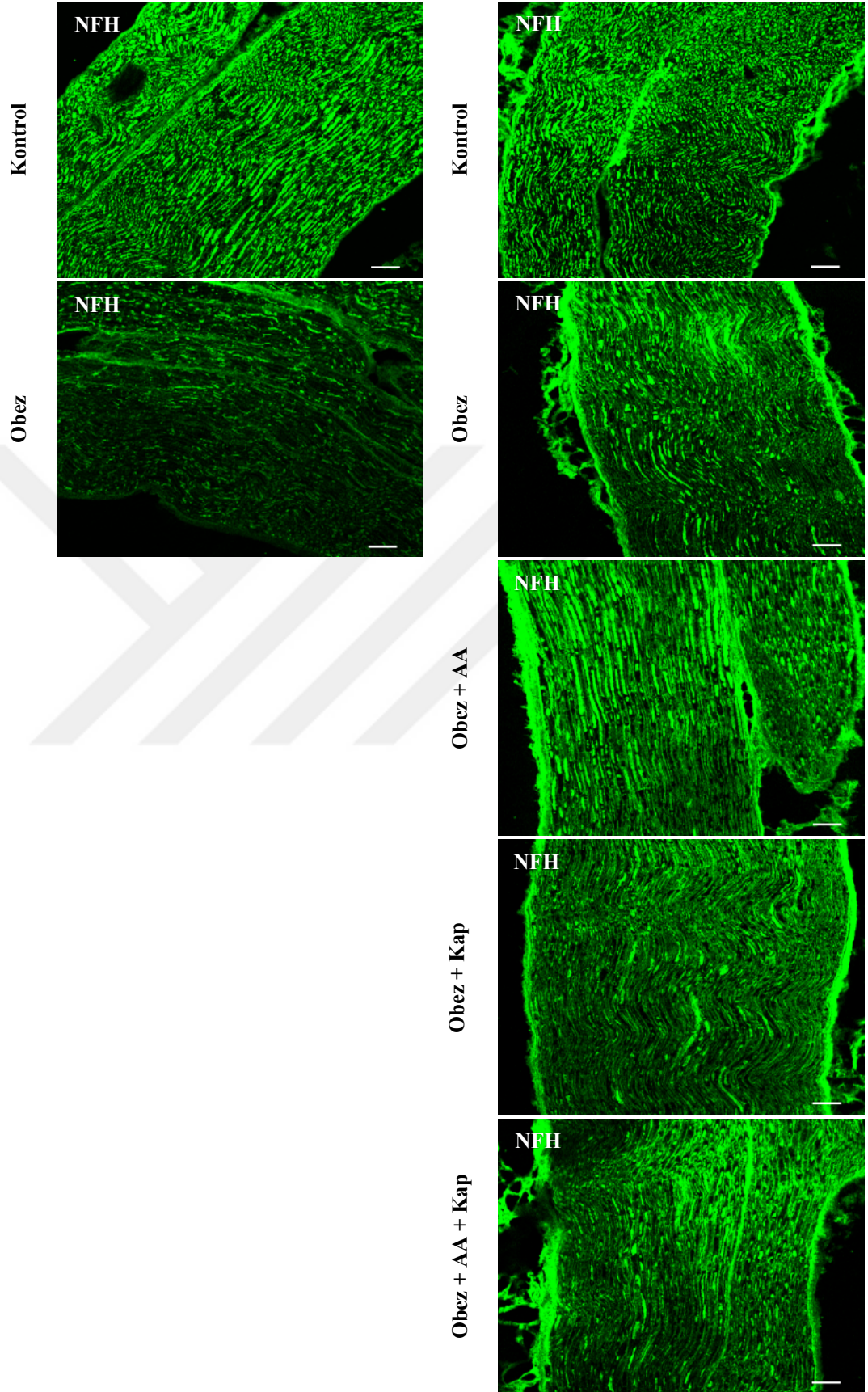
30. hafta obez ve tedavi gruplarının siyatik sinirdeki NFH piksel yoğunlukları 15. haftanın obez grubuyla karşılaştırıldığında 15. hafta Obez grubunun piksel yoğunluğu, diğer gruplardan istatistik olarak önemli oranda daha düşük olarak görüldü ($p < 0.05$) (Tablo 4.10, Şekil 4.34-35).



Şekil 4.34. 30. hafta obez ve tedavi gruplarının siyatik sinirde NFH piksel yoğunluklarının 15. hafta obez grupla karşılaştırılması. *30. haftadaki grupların 15. haftadaki obez grupla karşılaştırılmasında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$).

15. hafta

30. hafta



Şekil 4.35. Gruplara ait 15. ve 30. haftalardaki siyatik sinirde NFH immünohistokimya görüntüleri. (Objektif büyütmesi: 20X; skala bar: 40 µm)

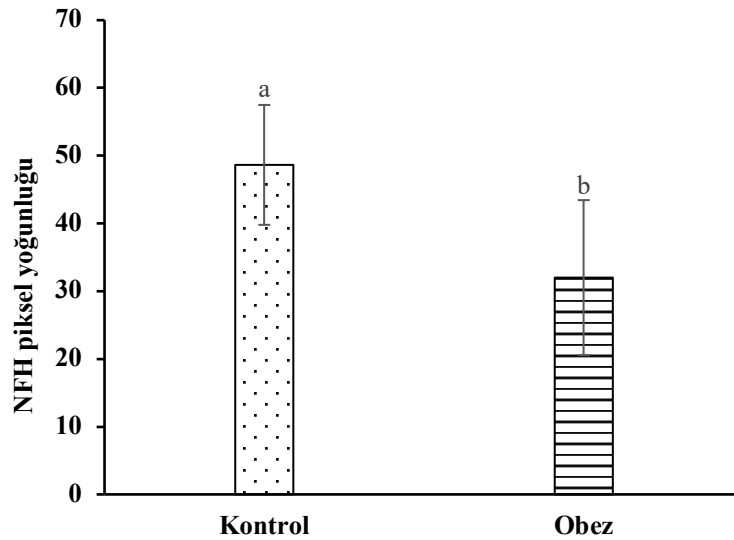
15. haftadaki Kontrol ve Obez grubunun gastroknemius kasında NFH piksel yoğunlukları karşılaştırıldığında Kontrol grubunun NFH piksel yoğunluğu, Obez grubundan anlamlı oranda daha yüksekti ($p<0.05$) (Tablo 4.11, Şekil 4.36, 4.42).

Tablo 4.11. Gastroknemius kasında NFH piksel yoğunluk verileri için gruplara ve haftalara göre tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırma sonuçları

Ortalama $\pm$ Standart Sapma			
Medyan (Minimum-Maksimum)			
15. hafta		30. hafta	
Kontrol	48.64 $\pm$ 8.85 ^a 52.33 (30.49-57.57)	Kontrol	33.91 $\pm$ 7.64 ^a 34.16 (16.24-46.77)
Obez	32 $\pm$ 11.44 ^b 37.13 (15.54-43.93)	Obez	25.43 $\pm$ 6.42 ^b 25.81 (12.12-36.29)
		Obez + AA	31.48 $\pm$ 6.59 ^{ab} 32.98 (19.32-41.03)
		Obez + Kap	29.49 $\pm$ 5.42 ^{ab} 29.73 (23-37.72)
		Obez + AA + Kap	15.35 $\pm$ 4.64 ^{c*} 14.03 (10.37-26.11)

^{a,b,c}Belli bir haftadaki gruplar arası karşıştırmaları göstermektedir (Farklı harfle gösterilen değerler için gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır $p<0.05$).

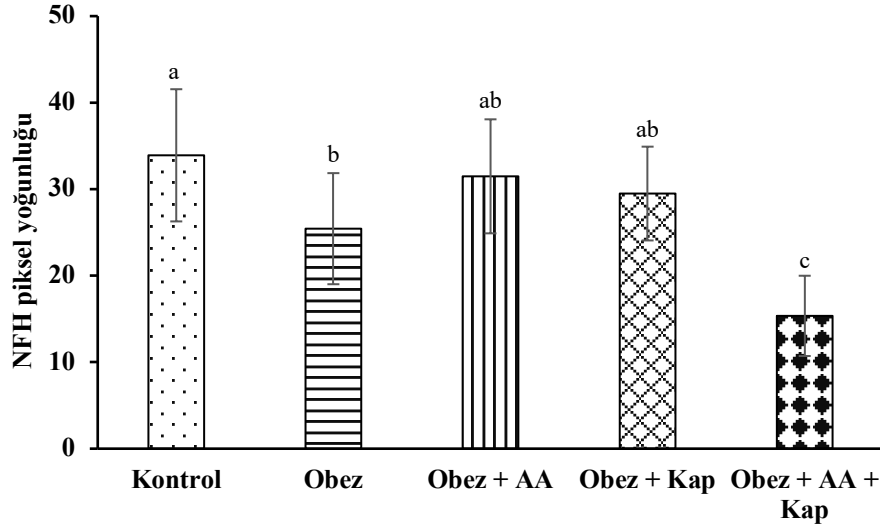
*30. haftadaki grupların 15. haftadaki obez grubuyla karşılaştırılmasında değerler arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).



Şekil 4.36. Kontrol ve obez grubuna ait 15. haftadaki gastroknemius kasında NFH piksel yoğunlukları. ^{a,b}Farklı harfle gösterilen gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

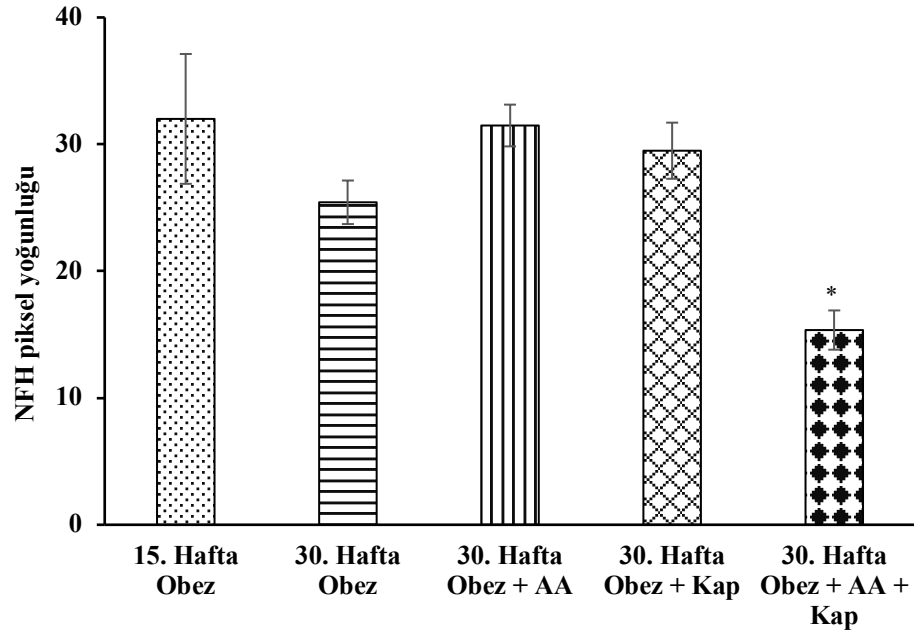
30. hafta obez ve tedavi gruplarının gastroknemius kasındaki NFH piksel yoğunlukları karşılaştırıldığında, Kontrol grubunun piksel yoğunluğu, Obez

grubundan ve Obez + AA + Kap grubundan daha yüksek olduğu bulundu ($p<0.05$). Kontrol grubu, Obez + AA ve Obez + Kap grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. En düşük piksel yoğunluğu Obez + AA + Kap grubunda görüldü ($p<0.05$) (Tablo 4.11, Şekil 4.37, 4.43).



Şekil 4.37. Grupların 30. haftadaki gastroknemius kasında NFH piksel yoğunlukları.
^{a,b,c}Farklı harfle gösterilen gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

30. hafta obez ve tedavi gruplarının gastroknemius kasındaki NFH piksel yoğunlukları 15. haftanın obez grubuyla karşılaştırıldığında en düşük piksel yoğunluğu Obez + AA + Kap grubunda gözlemlendi ($p<0.05$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı (Tablo 4.11, Şekil 4.37, 4.43).



Şekil 4.38. 30. hafta obez ve tedavi gruplarının gastroknemius kasında NFH piksel yoğunluklarının 15. hafta obez grupla karşılaştırılması. *30. haftadaki grupların 15. haftadaki obez grupla karşılaştırılmasında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

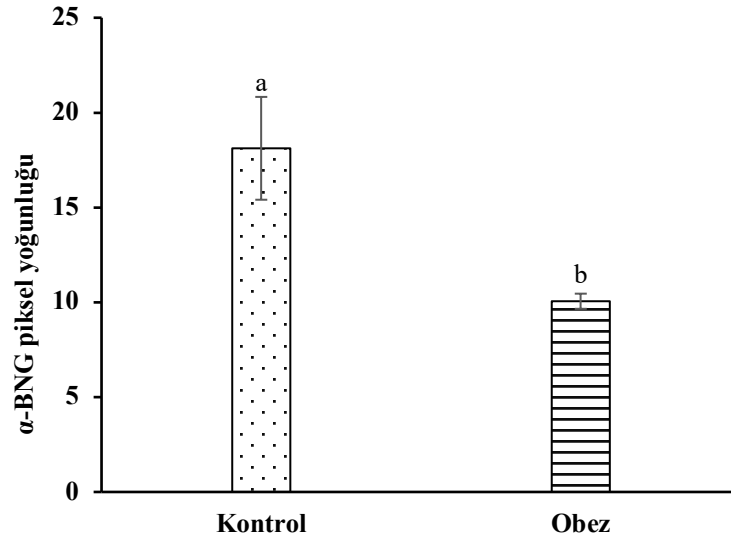
15. haftadaki Kontrol ve Obez grubunun gastroknemius kasında α -BNG piksel yoğunlukları karşılaştırıldığında Kontrol grubunun, Obez grubundan istatistik olarak daha yüksek piksel yoğunluğu gösterdiği bulundu ($p<0.05$) (Tablo 4.12, Şekil 4.39, 4.42).

Tablo 4.12. Gastroknemius kası α -BNG piksel yoğunluk verileri için gruplara ve haftalara göre tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırma sonuçları.

Ortalama $\pm$ Standart Sapma			
Medyan (Minimum-Maksimum)			
15. hafta		30. hafta	
Kontrol	18.11 $\pm$ 2.71 ^a 18.24 (14.82-24.52)	Kontrol	16.70 $\pm$ 1.87 ^{ab} 16.83 (13.6-20.17)
Obez	10.05 $\pm$ 0.39 ^b 10.21 (9.36-10.38)	Obez	14.45 $\pm$ 1.10 ^{c*} 14.52 (12.31-15.97)
		Obez + AA	15.58 $\pm$ 1.34 ^{bc*} 15.69 (13.26-17.86)
		Obez + Kap	15.78 $\pm$ 1.90 ^{bc*} 15.52 (13.38-18.7)
		Obez + AA + Kap	17.63 $\pm$ 1.20 ^{a*} 14.75 (15.66-19.12)

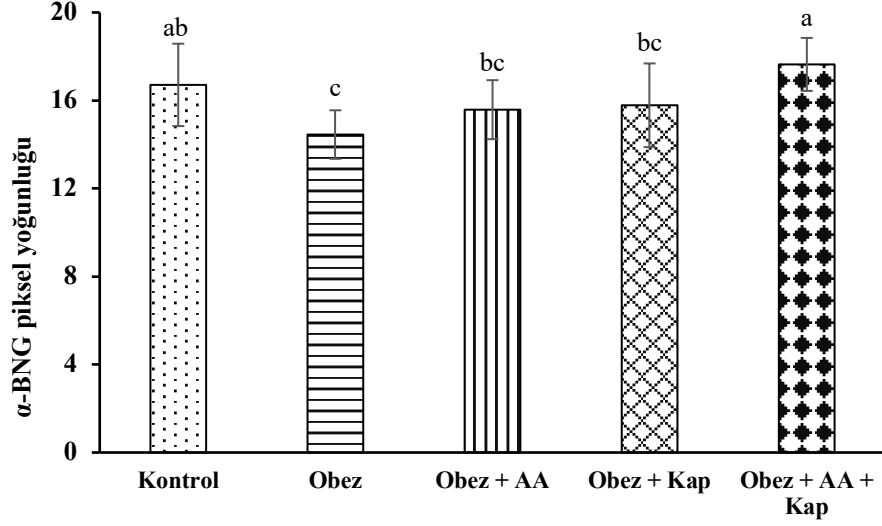
^{a,b,c}Belli bir haftadaki gruplar arası karşılaştırmaları göstermektedir (Farklı harfle gösterilen değerler için gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır $p<0.05$).

*30. haftadaki grupların 15. haftadaki obez grubuyla karşılaştırılmasında değerler arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).



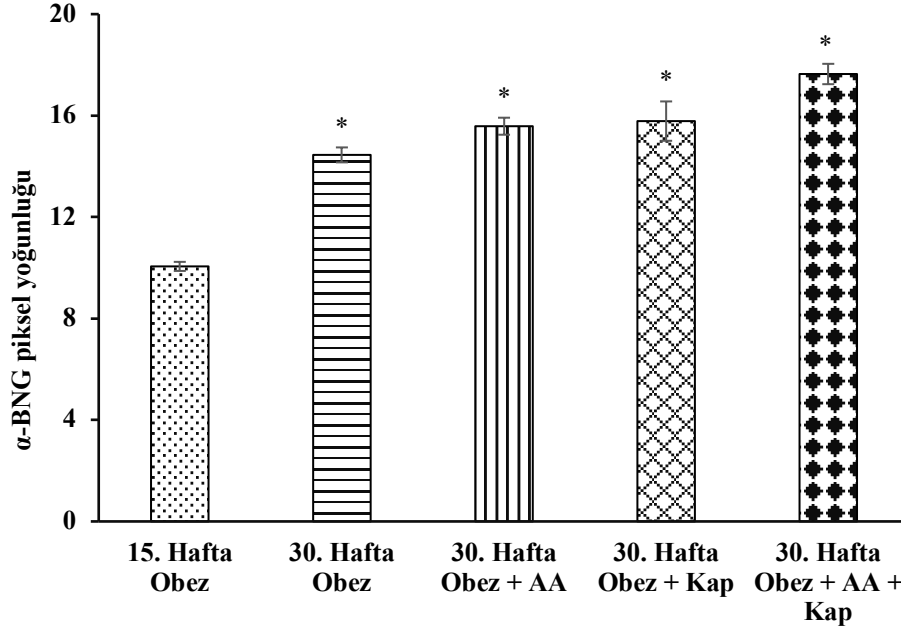
Şekil 4.39. Kontrol ve obez grubuna ait 15. haftadaki gastroknemius kasında α -BNG piksel yoğunlukları. ^{a,b}Farklı harfle gösterilen gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

30. hafta obez ve tedavi gruplarının gastroknemius kasındaki α -BNG piksel yoğunlukları karşılaştırıldığında, Obez + AA + Kap grubunun, Obez ve diğer tedavi gruplarından daha yüksek piksel yoğunluğu gösterdiği bulundu ($p<0.05$). Obez + AA + Kap grubu ile Kontrol grubu benzer piksel yoğunluklarına sahip olduğu gözlemlendi (Tablo 4.12, Şekil 4.40, 4.43).

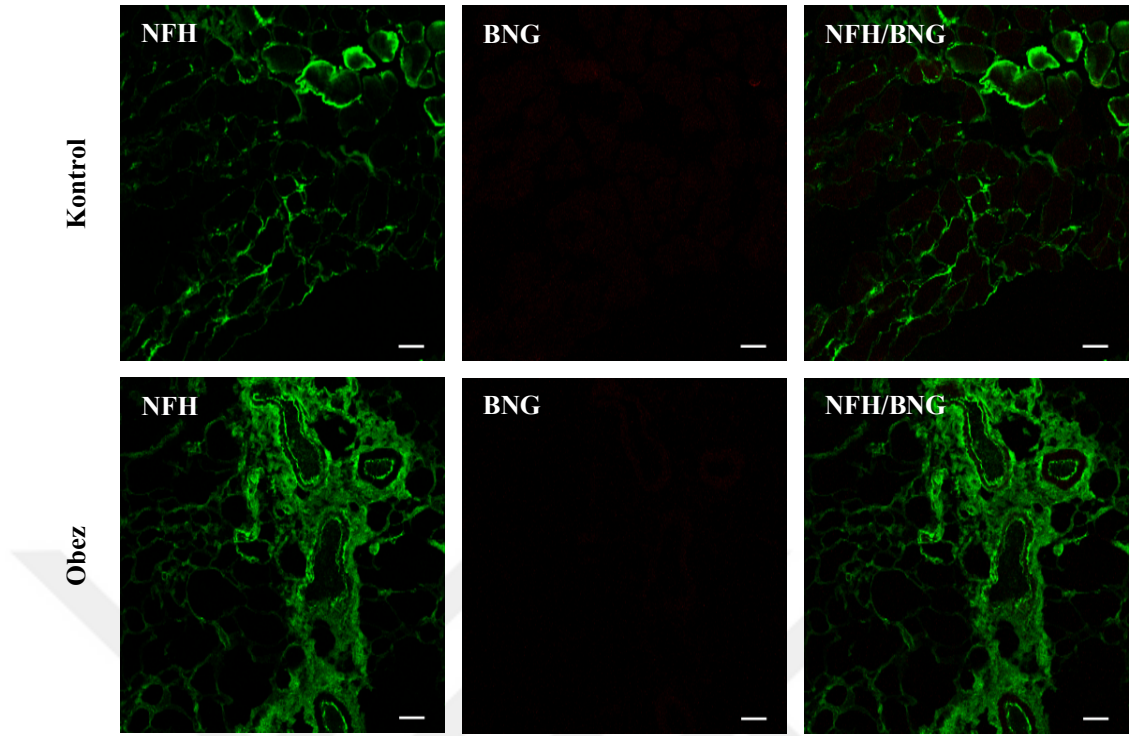


Şekil 4.40. Grupların 30. haftadaki gastroknemius kasında α -BNG piksel yoğunlukları. ^{a,b,c}Farklı harfle gösterilen gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

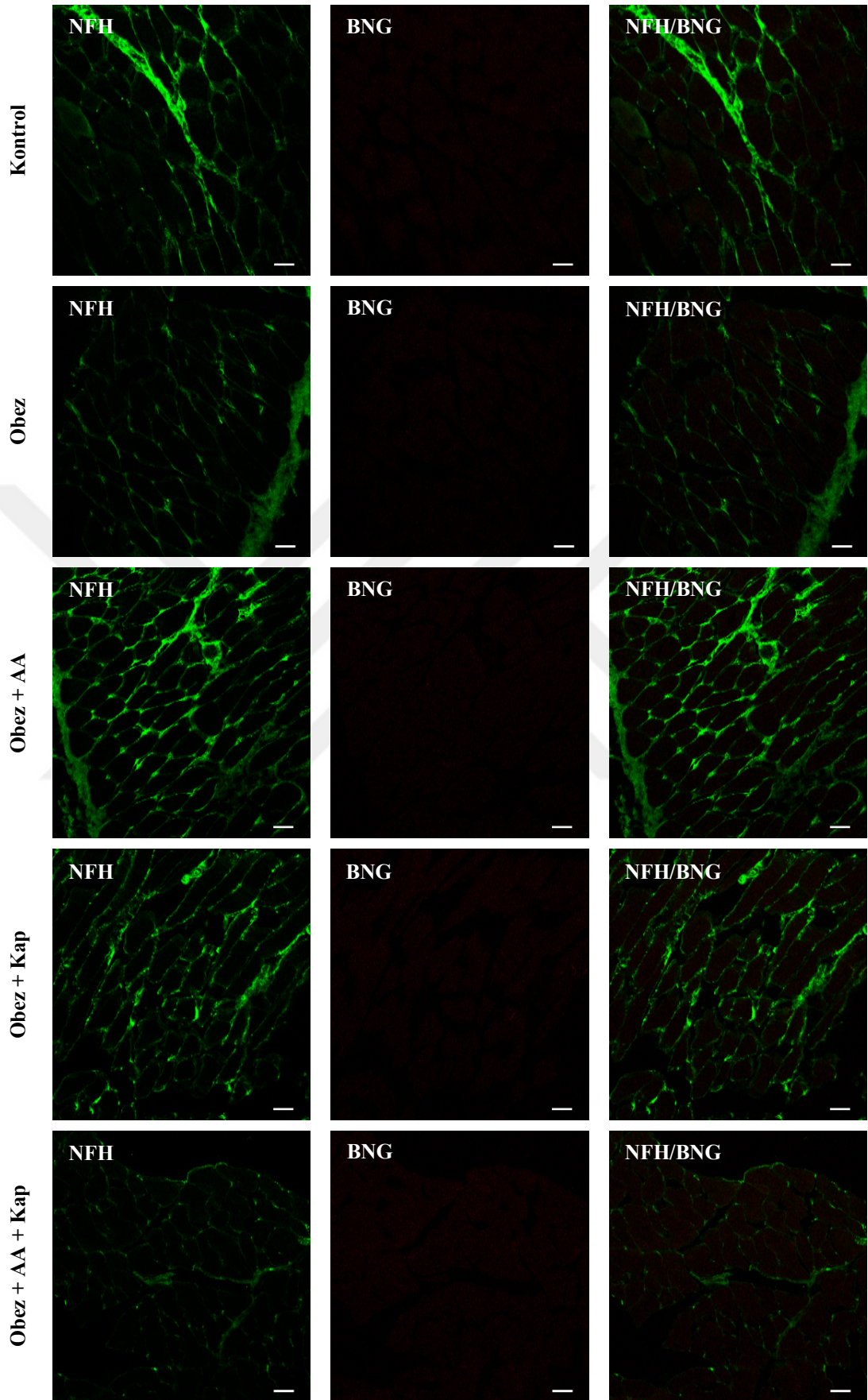
30. hafta obez ve tedavi gruplarının gastroknemius kasındaki α -BNG piksel yoğunlukları 15. haftanın obez grubuyla karşılaştırıldığında Obez + AA + Kap grubu en yüksek piksel yoğunluğu gösterdiği bulundu ($p<0.05$). Obez + AA + Kap grubu, 15. hafta Obez grubu ve 30. hafta Obez grubundan daha yüksek immünreaktivite gösterdiği gözlemlendi ($p<0.05$). (Tablo 4.12, Şekil 4.41-43).



Şekil 4.41. 30. haftadaki obez ve tedavi gruplarının gastroknemius kasında α -BNG piksel yoğunluklarının 15. haftadaki obez gruba karşılaştırılması. *30. haftadaki grupların 15. haftadaki obez gruba karşılaştırılmasında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).



Şekil 4.42. Kontrol ve obez grubuna ait 15. haftadaki gastroknemius kası NFH ve α -BNG immünohistokimya görüntüleri. (Objektif büyütmesi: 20X; skala bar: 40 μ m).



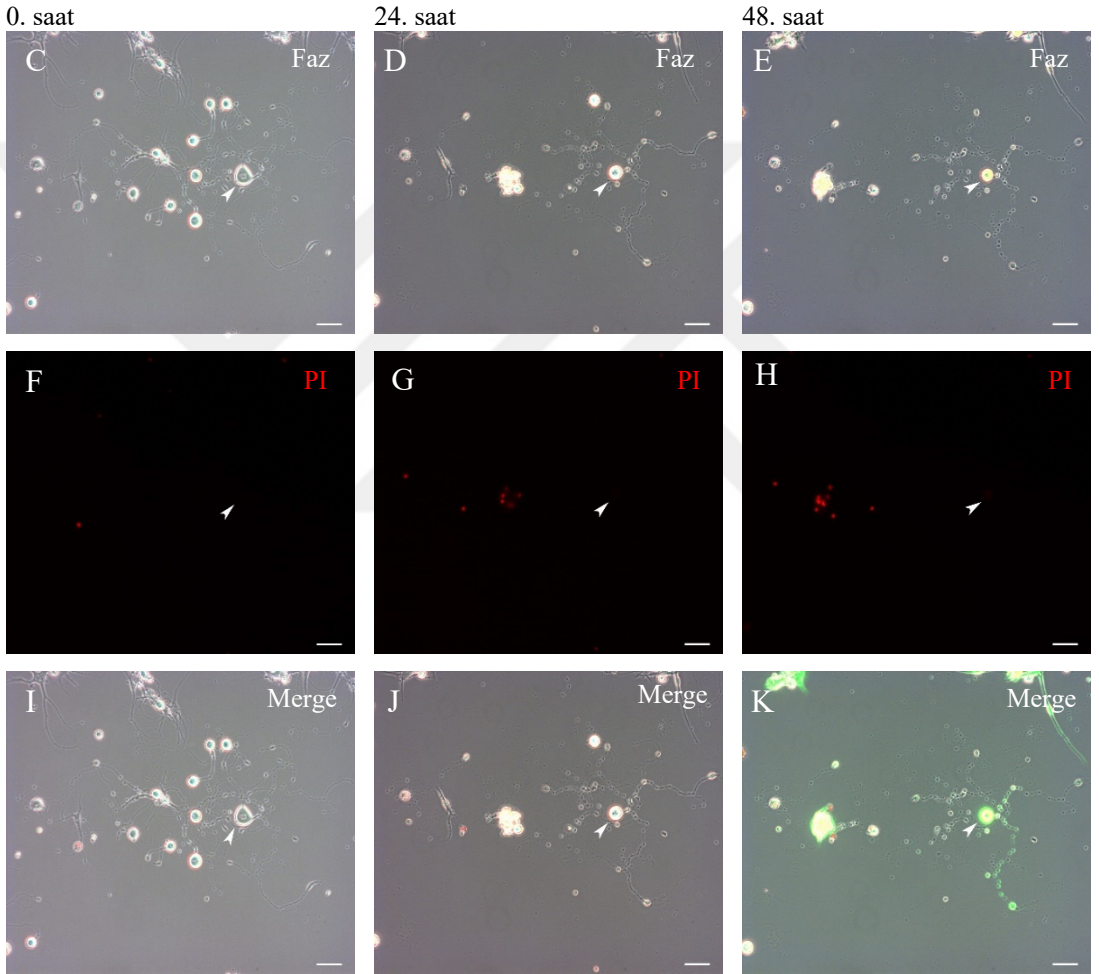
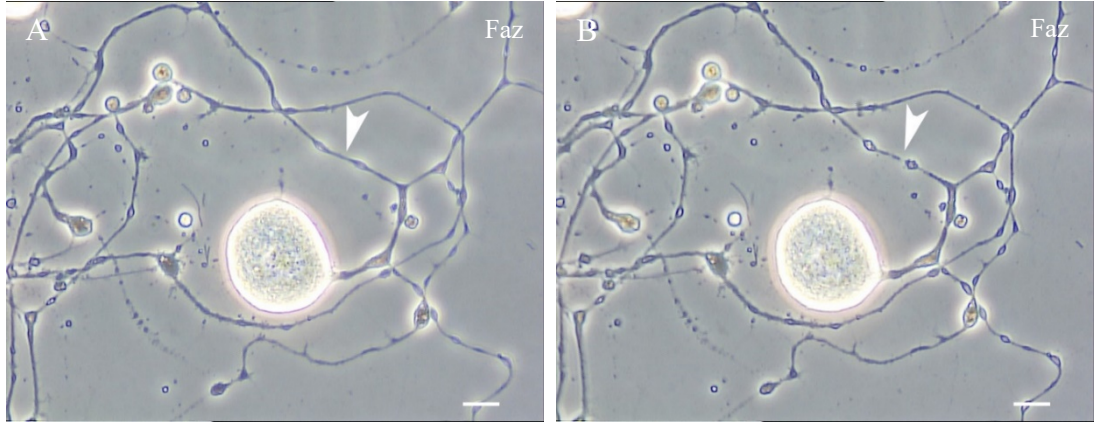
Şekil 4.43. Gruplara ait 30. haftadaki gastroknemius kasında NFH ve α -BNG immünohistokimya görüntüleri (Objektif büyütmesi: 20X; skala bar: 40 μ m).

4.2. *İn Vitro* Bulgular

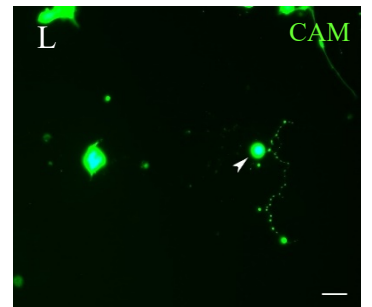
4.2.1 DRG Nöron Kültüründe Aksotomi Hasarlı Nöronların Sağ Kalım Oranları

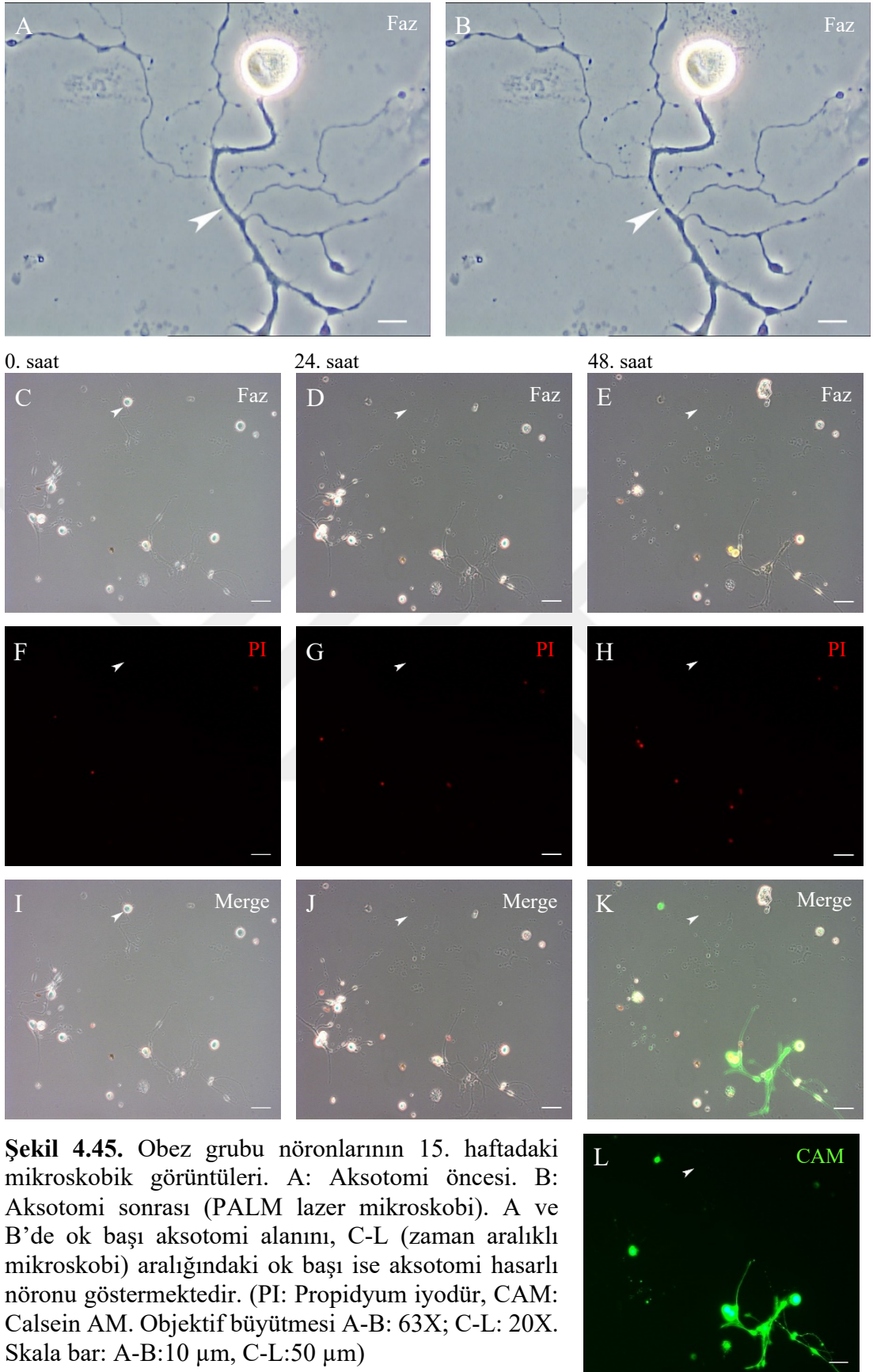
15. haftada Kontrol ve Obez grubuna ait nöronların mikroskopik görüntüleri Şekil 4.44 ve 4.45'te, istatistiksel analizleri Tablo 4.13'te, sağ kalım oranları ise Şekil 4.46'da verildi.





Şekil 4.44. Kontrol grubu nöronlarının 15. haftadaki mikroskopik görüntüleri. A: Aksotomi öncesi. B: Aksotomi sonrası (PALM lazer mikroskobu). A ve B’de ok başı aksotomi alanını, C-L (zaman aralıklı mikroskobu) aralığındaki ok başı ise aksotomi hasarlı nöronu göstermektedir. (PI: Propidyum iyodür, CAM: Calsein AM. Objektif büyütmesi A-B: 63X; C-L: 20X. Skala bar: A-B:10 μ m, C-L:50 μ m)

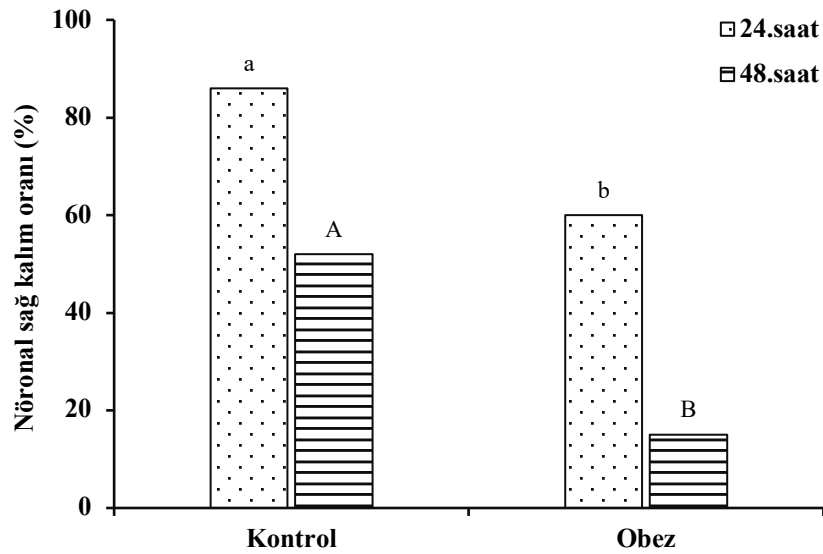




15. haftada Obez grubunun 24. ve 48. saatlerdeki sağ kalım oranlarının, Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha düşük olduğu bulundu ($p=0.001$) (Tablo 4.13, Şekil 4.46).

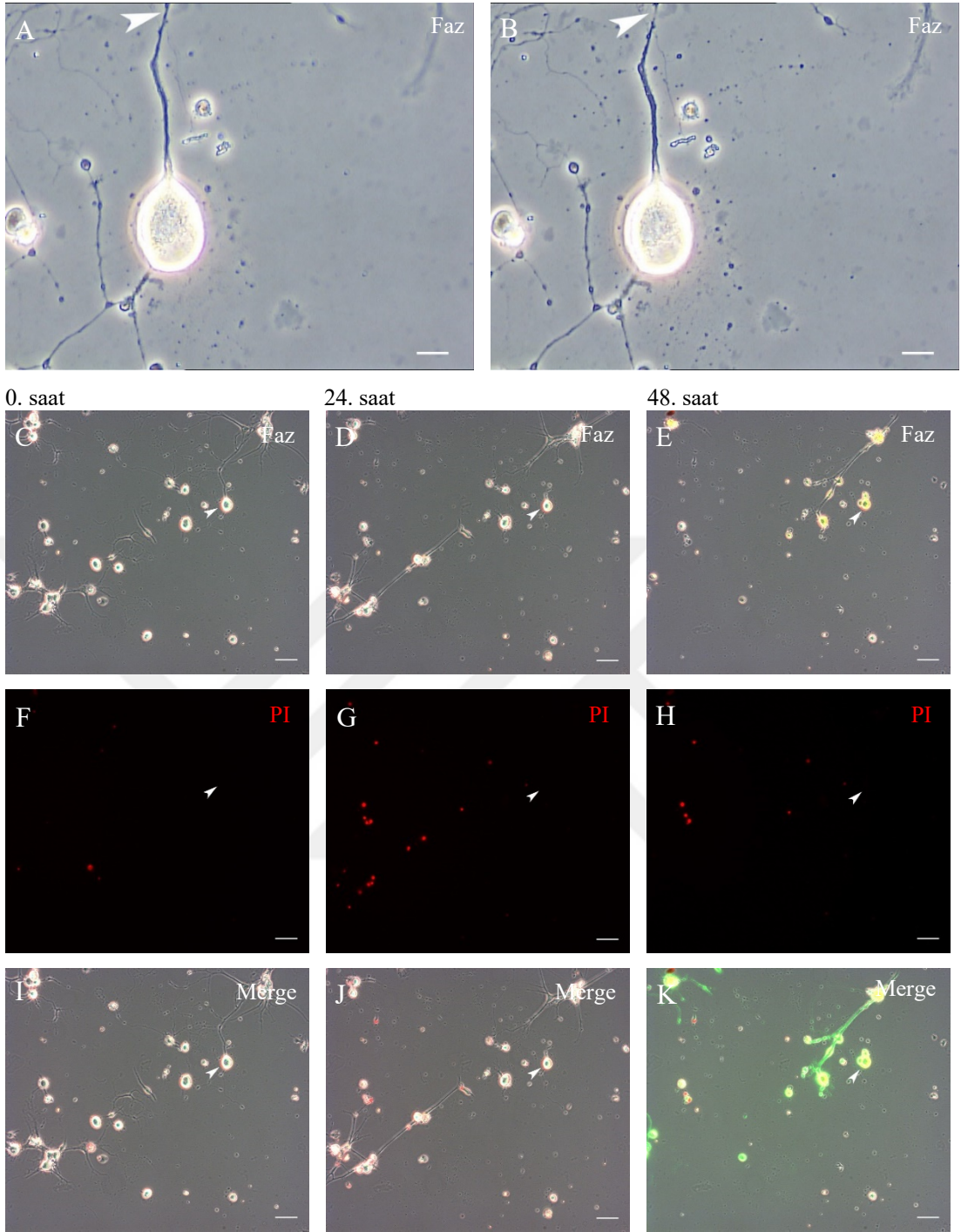
Tablo 4.13. 15. haftada Kontrol ve Obez grubunda aksotomi uygulanan nöronların 24. ve 48. saatlerde sağ kalım oranlarına ait istatistiksel karşılaştırma sonuçları.

	Kontrol 24.saat (%86)	Obez 24.saat (%60)	Kontrol 48.saat (%52)	Obez 48.saat (%15)
Kontrol 24.saat (%86)	1			
Obez 24.saat (%60)	0.001	1		
Kontrol 48.saat (%52)			1	
Obez 48.saat (%15)			0.001	1

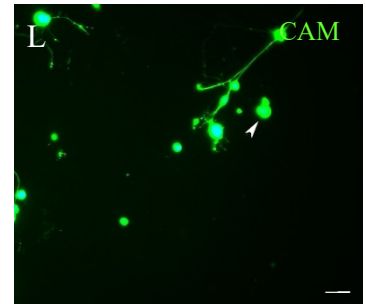


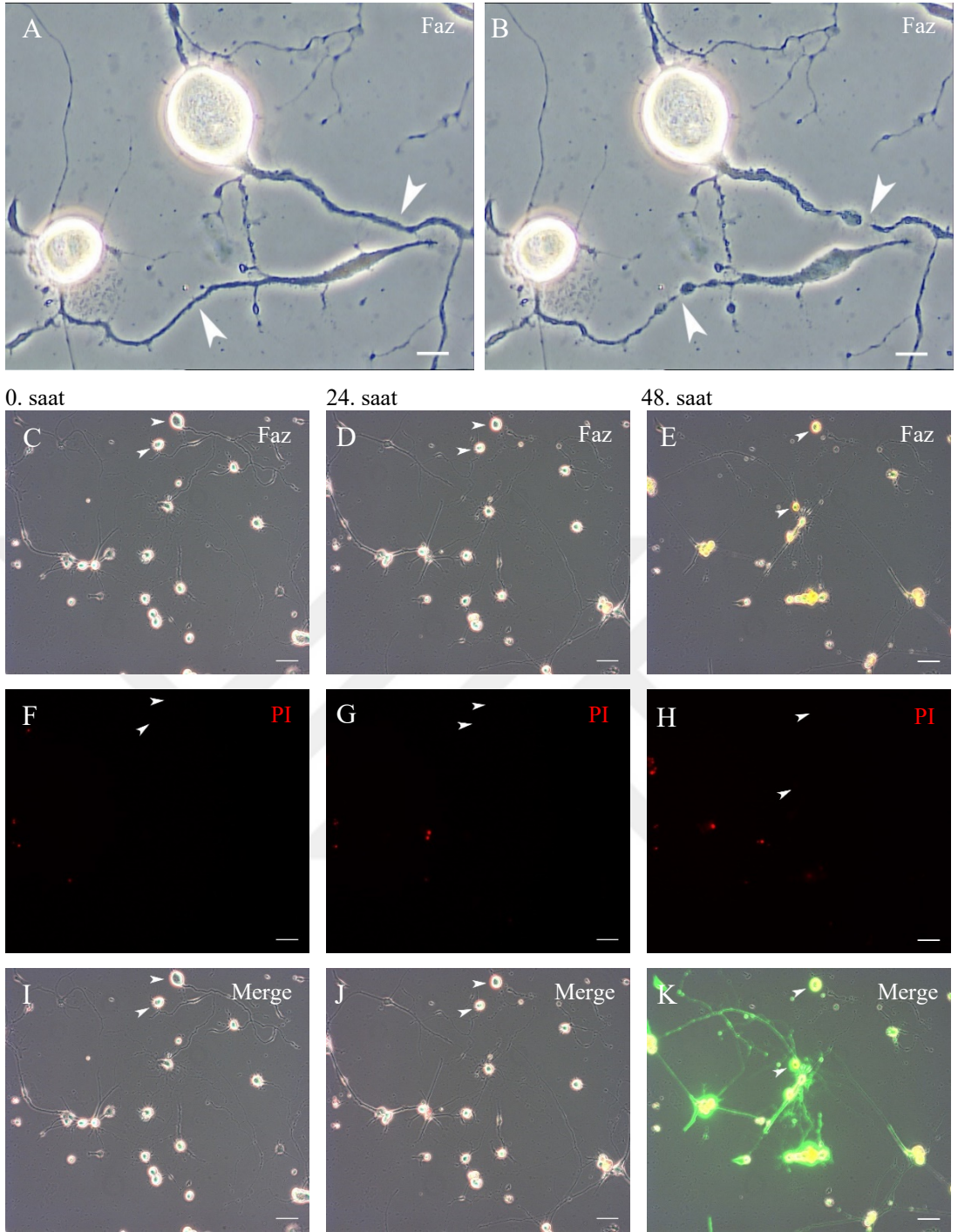
Şekil 4.46. Kontrol ve Obez grubunun 15. haftadaki aksotomi sonrası 24. ve 48. saatlerde nöronal sağ kalım oranları (%).^{a,b}24. saat, ^{A,B}48. saatte gruplar arası fark anlamlıdır ($p<0.05$).

30. haftada Kontrol, Obez, Obez + AA, Obez + Kap ve Obez + AA + Kap gruplarına ait nöronların mikroskopik görüntüleri Şekil 4.47-51’de, istatistiksel analizi Tablo 4.14’de, sağ kalım oranları ise Şekil 4.52’de verildi.

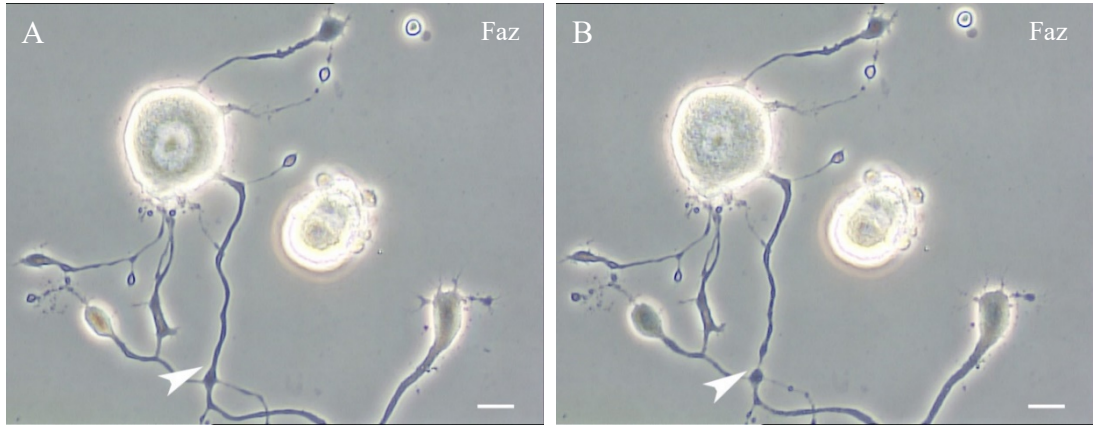


Şekil 4.47. Kontrol grubuna ait nöronların 30. haftadaki mikroskopik görüntüleri. A: Aksotomi öncesi. B: Aksotomi sonrası (PALM lazer mikroskopi). A ve B’de ok başı aksotomi bölgesini, C-L (zaman aralıklı mikroskopi) aralığındaki ok başı ise aksotomi yapılan nöronu göstermektedir. (PI: Propidyum iyodür, CAM: Calsein AM. Objektif büyütmesi A-B: 63X; C-L: 20X. Skala bar:A-B:10 μ m, C-L:50 μ m)

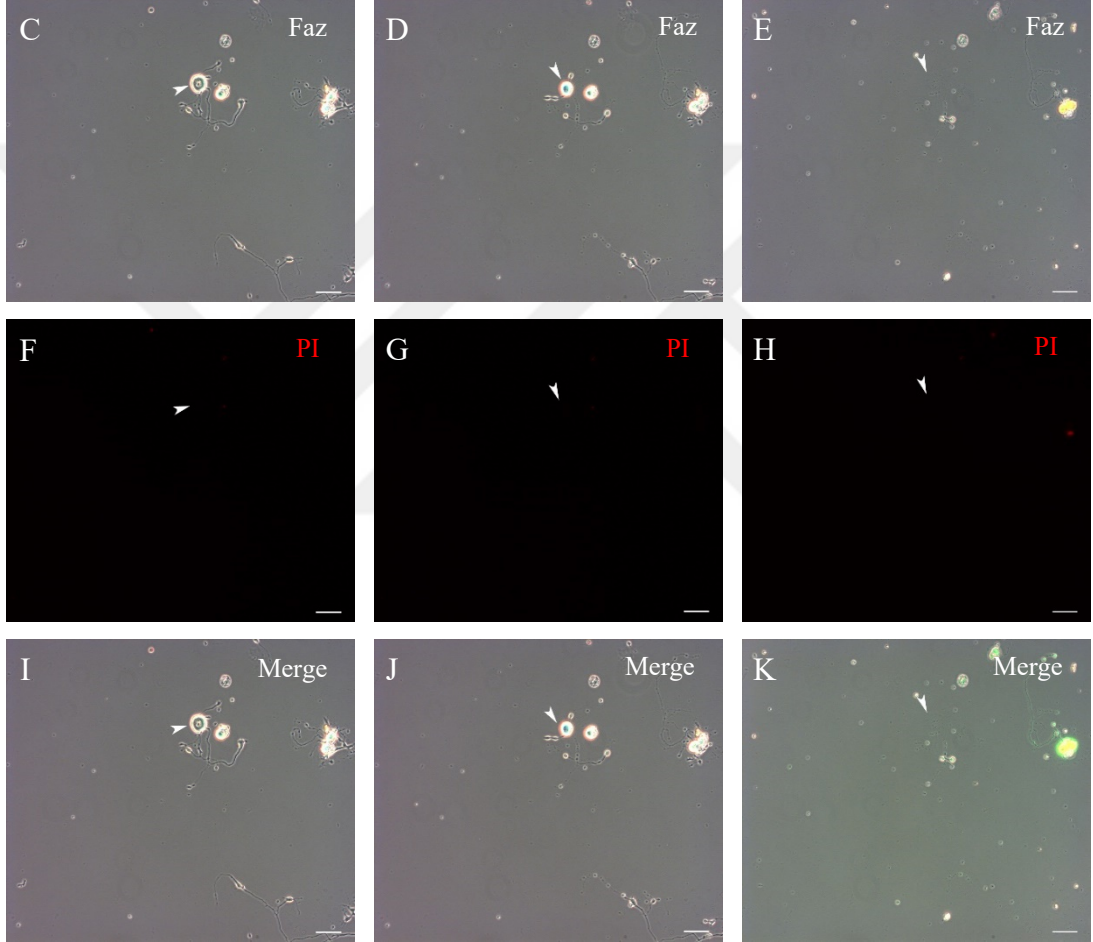




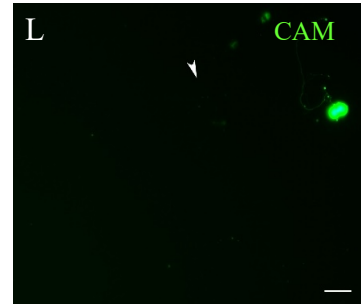
Şekil 4.48. Obez grubuna ait nöronların 30. haftadaki mikroskobik görüntüleri. A: Aksotomi öncesi. B: Aksotomi sonrası (PALM lazer mikroskopi). A ve B’de ok başı aksotomi bölgesini, C-L (zaman aralıklı mikroskopi) aralığındaki ok başı ise aksotomi yapılan nöronu göstermektedir. (PI: Propidyum iyodür, CAM: Calsein AM. Objektif büyütmesi A-B: 63X; C-L: 20X. Skala bar: A-B:10 μ m, C-L:50 μ m)

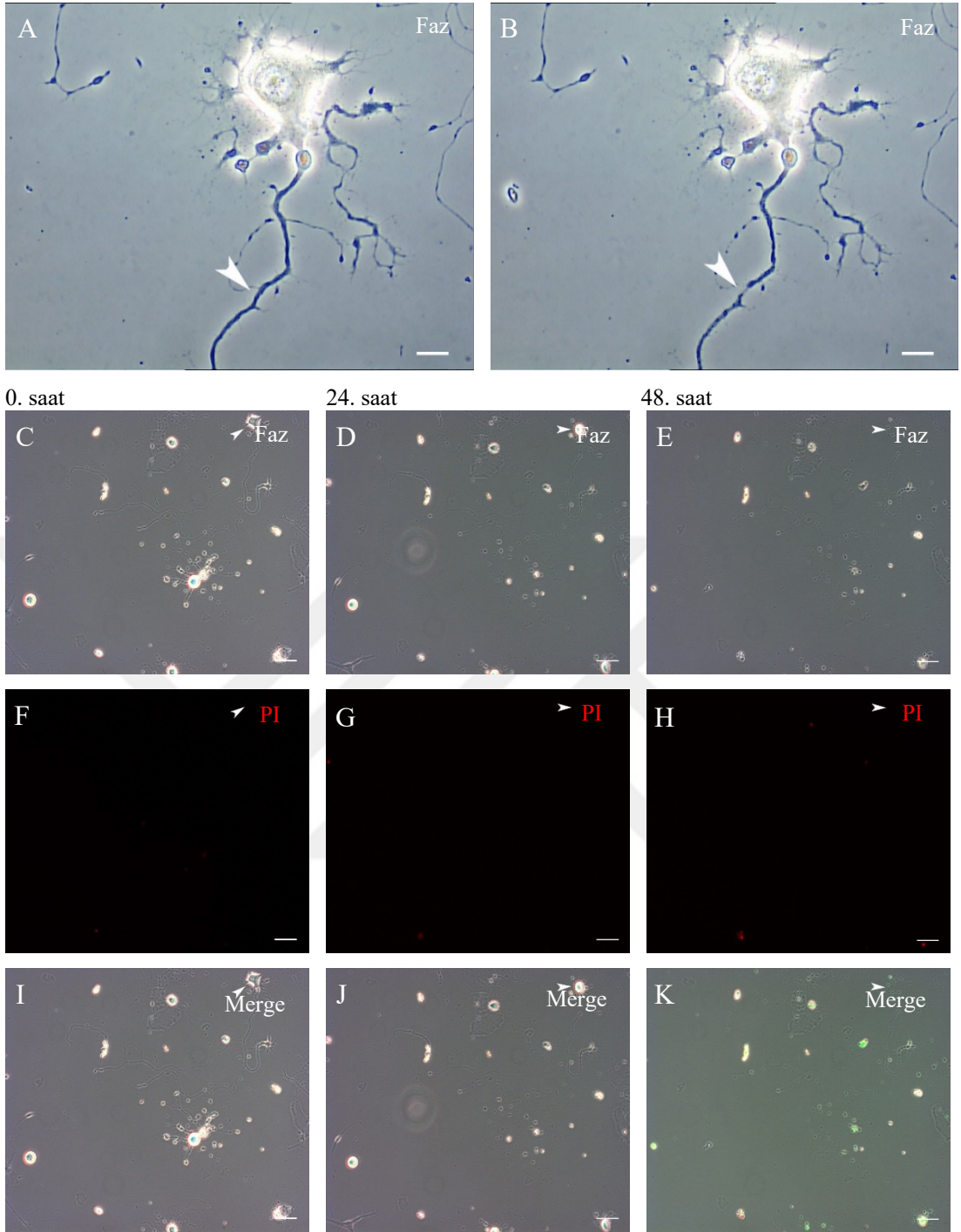


0. saat..... 24. saat..... 48. saat

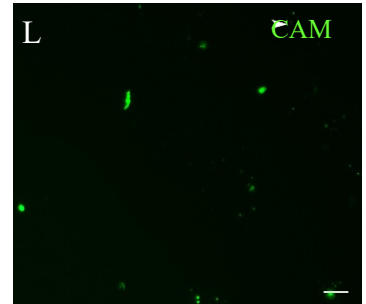


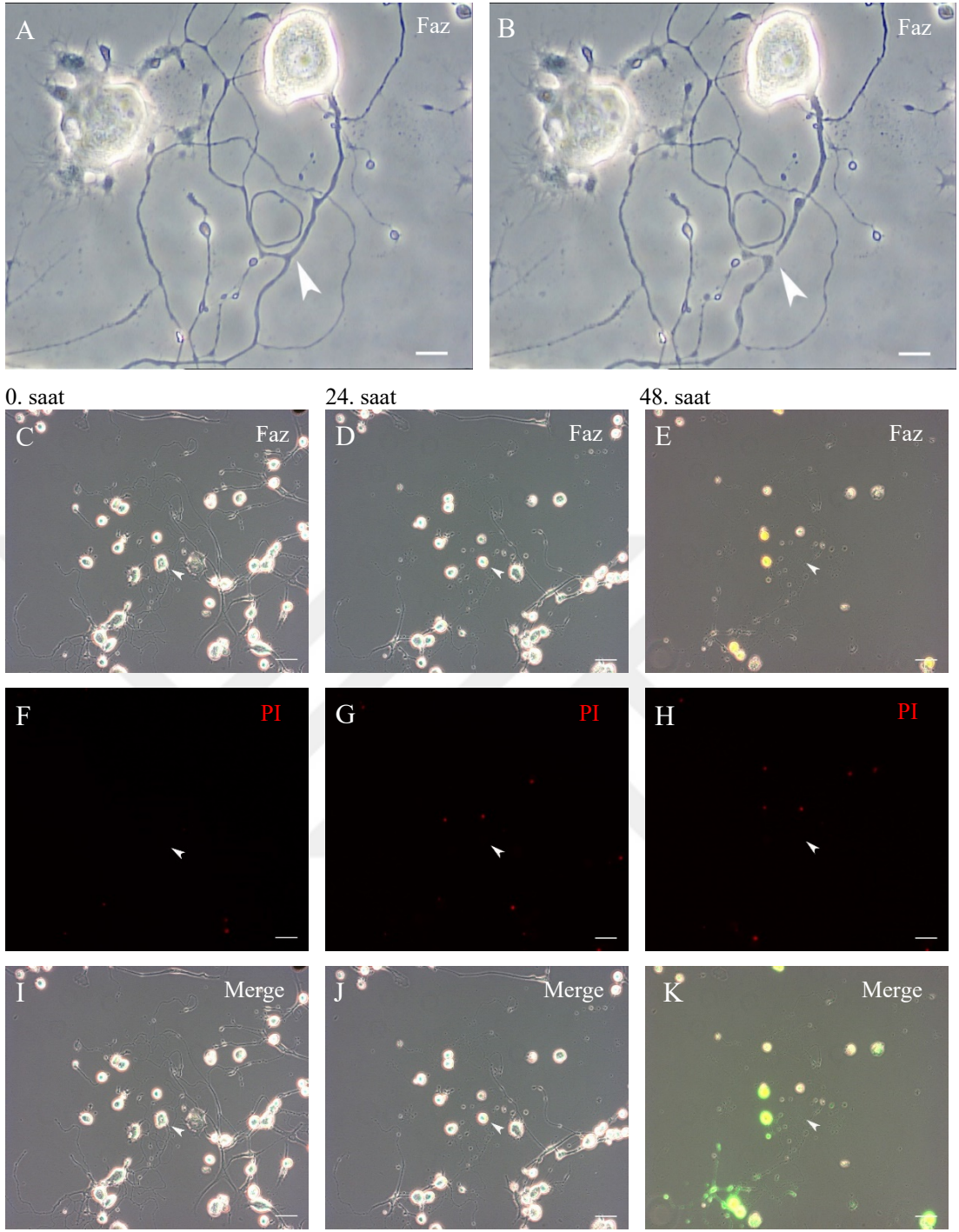
Şekil 4.49. Obez + AA grubuna ait nöronların 30. haftadaki mikroskopik görüntüleri. A: Aksotomi öncesi. B: Aksotomi sonrası (PALM lazer mikroskobu). A ve B’de ok başı aksotomi bölgesini, C-L (zaman aralıklı mikroskobu) aralığındaki ok başı ise aksotomi yapılan nöronu göstermektedir. (PI: Propidyum iyodür, CAM: Calsein AM. Objektif büyütmesi A-B: 63X; C-L: 20X. Skala bar: A-B:10 μ m, C-L: 50 μ m).





Şekil 4.50. Obez + Kap grubuna ait nöronların 30. haftadaki mikroskopik görüntüleri. A: Aksotomi öncesi. B: Aksotomi sonrası (PALM lazer mikroskobu). A ve B’de ok başı aksotomi bölgesini, C-L (zaman aralıklı mikroskobu) aralığındaki ok başı ise aksotomi yapılan nöronu göstermektedir. (PI: Propidyum iyodür, CAM: Calsein AM. Objektif büyütmesi A-B: 63X; C-L: 20X. Skala bar: A-B:10 μ m, C-L: 50 μ m).

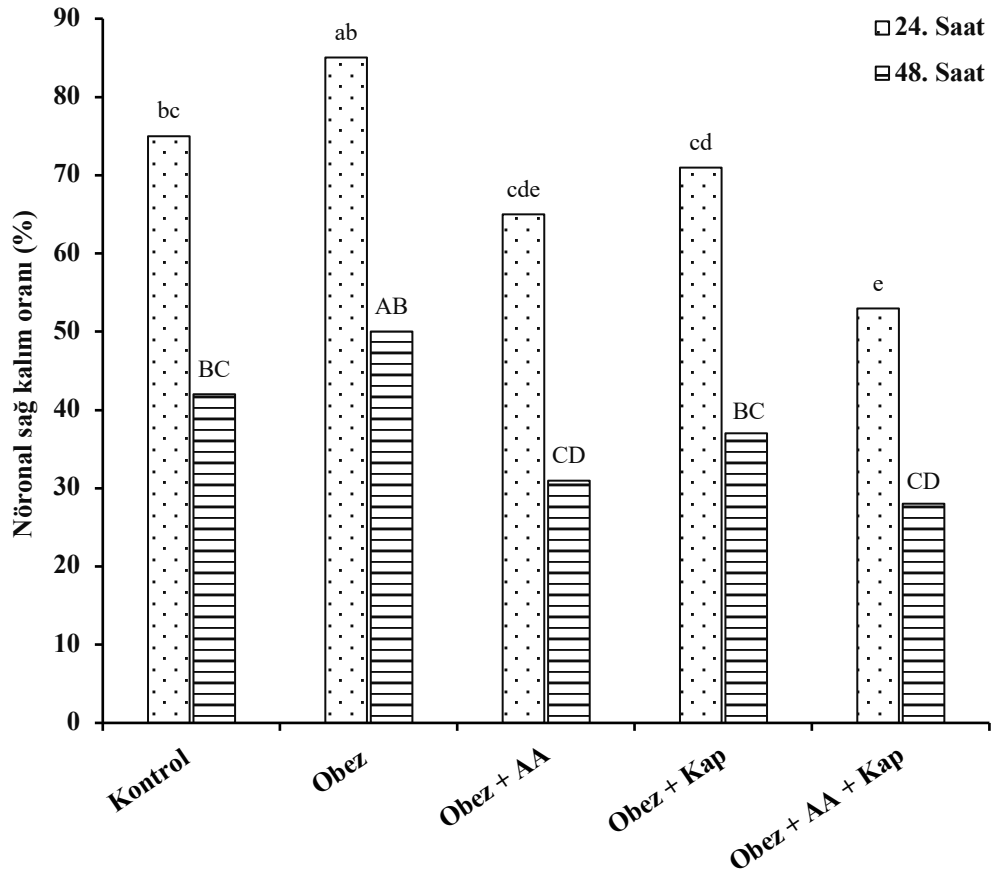




Şekil 4.51. Obez + AA + Kap grubuna ait nöronların 30. haftadaki mikroskopik görüntüleri. A: Aksotomi öncesi. B: Aksotomi sonrası (PALM lazer mikroskopi). A ve B’de ok başı aksotomi bölgesini, C-L (zaman aralıklı mikroskopi) aralığındaki ok başı ise aksotomi yapılan nöronu göstermektedir. (PI: Propidyum iyodür, CAM: Calsein AM. Objektif büyütmesi A-B: 63X; C-L: 20X. Skala bar: A-B:10 µm, C-L: 50 µm).

Tablo 4.14. 30. haftada aksotomi sonrası 24. ve 48. saatlerde nöronal sağ kalım oranlarının gruplara ve saatlere göre istatistiksel karşılaştırma sonuçları.

48.saat 24.saat	Kontrol (%42)	Obez (%50)	Obez + AA (%31)	Obez + Kap (%37)	Obez + AA + Kap (%28)
Kontrol (%75)	1	0.291	0.101	0.415	0.380
Obez (%85)	0.066	1	0.006	0.500	0.002
Obez + AA (%65)	0.104	0.001	1	0.349	0.579
Obez + Kap (%71)	0.532	0.008	0.269	1	0.147
Obez + AA + Kap (%53)	0.002	0.001	0.1	0.006	1



Şekil 4.52. Grupların 30. haftadaki aksotomi sonrası 24. ve 48. saatlerde nöronal sağ kalım oranları (%). ^{a,b,c,d,e}24. saat, ^{A,B,C,D}48. saatte gruplar arası fark anlamlıdır (p<0.05).

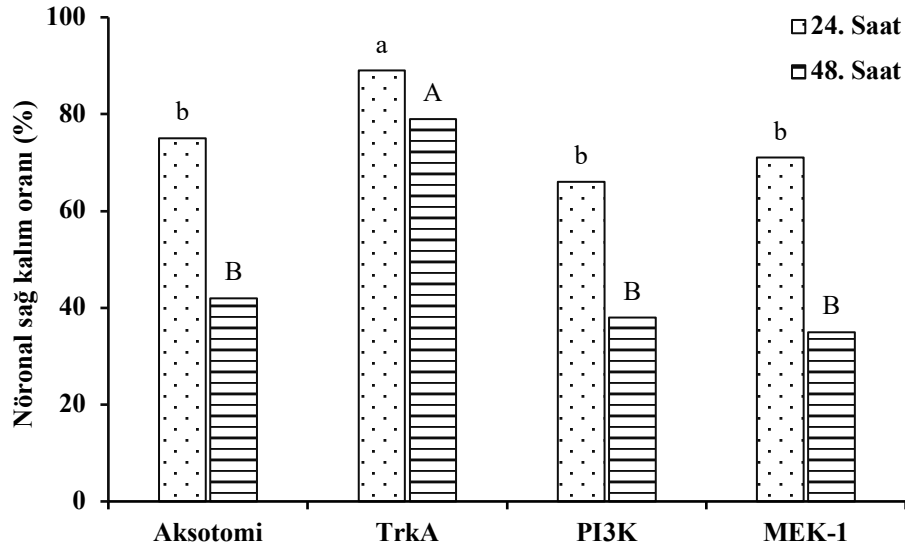
30. haftada 24. saat sağ kalım oranları bakımından Kontrol grubu ile Obez, Obez + AA, Obez + Kap grupları arasında anlamlı fark görülmedi (Tablo 4.16, Şekil 4.52). Obez + AA + Kap grubunun sağ kalım oranı, Kontrol, Obez, Obez + Kap

gruplarından daha düşüktü ($p<0.05$) (Tablo 4.14, Şekil 4.52). 48. saat sağ kalım oranları bakımından Kontrol grubu ile Obez, Obez + AA, Obez + Kap, Obez + AA + Kap grupları arasında fark olmadığı gözlemlendi. Tedavi grupları (Obez + AA, Obez + Kap, Obez + AA + Kap) arasında da anlamlı bir fark bulunamadı (Tablo 4.14, Şekil 4.52).

30. hafta Kontrol grubuna ait nöron kültürü medyumlarına inhibitörlerin (TrkA, PI3K ve MEK-1) eklenmesiyle aksotomi sonrası 24. ve 48. saatlerdeki sağ kalım oranlarına ait istatistiksel karşılaştırmalar Tablo 4.15’de, sağ kalım oranlarına ait grafik ise Şekil 4.53’de verilmiştir.

Tablo 4.15. Kontrol grubunun 30. hafta nöron kültürü medyumlarına inhibitör (TrkA, PI3K ve MEK-1) eklenmesiyle aksotomi sonrası 24. ve 48. saatlerde sağ kalım oranları için gruplara ve saatlere göre istatistiksel karşılaştırma sonuçları.

48.saat 24.saat	Aksotomi (%42)	TrkA (%79)	PI3K (%38)	MEK-1 (%35)
Aksotomi (%75)	1	0.001	0.493	0.3
TrkA (%89)	0.007	1	0.001	0.001
PI3K (%66)	0.171	0.001	1	0.730
MEK-1 (%71)	0.476	0.001	0.514	1



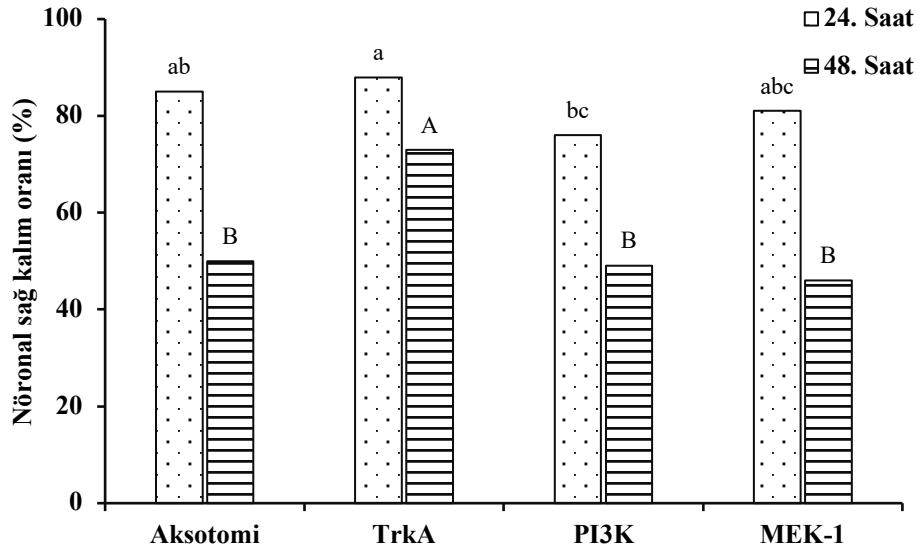
Şekil 4.53. Kontrol grubunun 30. hafta nöron kültürü medyumlarına inhibitör (TrkA, PI3K ve MEK-1) eklenmesiyle aksotomi sonrası 24. ve 48. saatlerdeki nöronal sağ kalım oranları (%). ^{a,b}24. saat, ^{A,B}48. saatte gruplar arası fark anlamlıdır ($p<0.05$).

30. hafta Kontrol grubu nöron kültürü medyumlarına TrkA inhibitörü eklenen grubun aksotomi sonrası 24. ve 48. saatlerdeki sağ kalım oranı, diğer inhibitör uygulanan gruplardan anlamlı seviyede daha yüksekti ($p<0.05$) (Tablo 4.15, Şekil 4.53). Diğer inhibitör uygulanan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı.

30. hafta Obez grubuna ait nöron kültürü medyumlarına inhibitörlerin (TrkA, PI3K ve MEK-1) eklenmesiyle aksotomi sonrası 24. ve 48. saatlerdeki sağ kalım oranlarına ait istatistiksel karşılaştırmalar Tablo 4.16'da, sağ kalım oranlarına ait grafik ise Şekil 4.54'te verilmiştir.

Tablo 4.16. Obez grubunun 30. hafta nöron kültürü medyumlarına inhibitör (TrkA, PI3K ve MEK-1) eklenmesiyle aksotomi sonrası 24. ve 48. saatlerde sağ kalım oranları için gruplara ve saatlere göre istatistiksel karşılaştırma sonuçları.

48.saat 24.saat	Aksotomi (%50)	TrkA (%73)	PI3K (%49)	MEK-1 (%46)
Aksotomi (%85)	1	0.001	0.886	0.584
TrkA (%88)	0.556	1	0.001	0.001
PI3K (%76)	0.087	0.019	1	0.69
MEK-1 (%81)	0.464	0.178	0.324	1



Şekil 4.54. Obez grubunun 30. hafta nöron kültürü medyumlarına inhibitör (TrkA, MEK-1 ve PI3K) eklenmesiyle aksotomi sonrası 24. ve 48. saatlerdeki nöronal sağ kalım oranları (%). ^{a,b,c}24. saat, ^{A,B}48. saatte gruplar arası fark anlamlıdır (p<0.05).

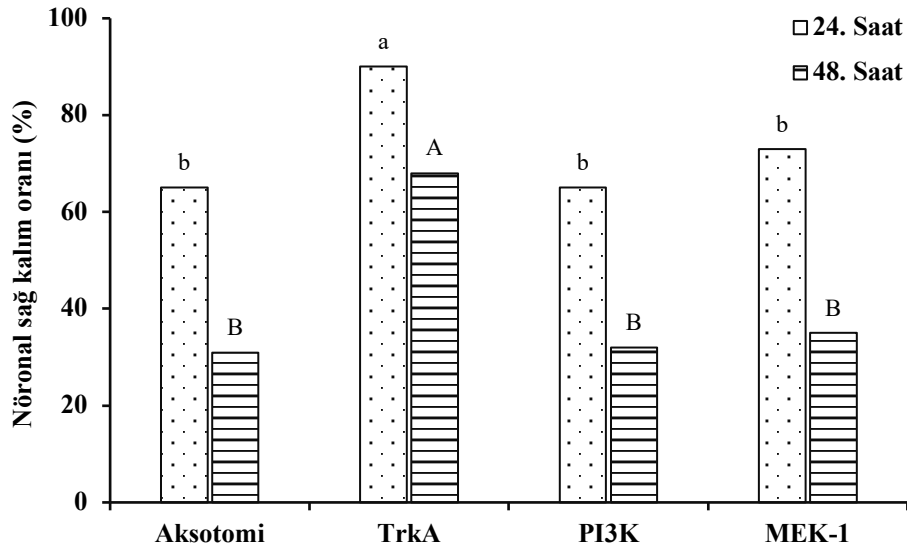
30. hafta Obez grubunda TrkA eklenmesiyle aksotomi sonrası 24. saatte nöron kültürü medyumlarındaki nöronların sağ kalım oranları MEK-1 eklenenlerden daha yüksekti (p<0.05). Diğer inhibitör eklenen gruplar arasında anlamlı fark yoktu. 48. saatte TrkA inhibitörüne karşı sağ kalım oranı diğer gruplardan daha yüksekti (p<0.05) (Tablo 4.16, Şekil 4.54). 48. saatte diğer inhibitör gruplar arasında anlamlı fark yoktu.

30. hafta Obez + AA grubuna ait nöron kültürü medyumlarına inhibitörlerin (TrkA, PI3K ve MEK-1) eklenmesiyle aksotomi sonrası 24. ve 48. saatlerdeki sağ

kalım oranlarına ait istatistiksel karşılaştırmalar Tablo 4.17’de, sağ kalım oranlarına ait grafik ise Şekil 4.55’te verilmiştir.

Tablo 4.17. Obez + AA grubunun 30. hafta nöron kültürü medyumlarına inhibitör (TrkA, PI3K ve MEK-1) eklenmesiyle aksotomi sonrası 24. ve 48. saatlerde sağ kalım oranları için gruplara ve saatlere göre istatistiksel karşılaştırma sonuçları.

48.saat 24.saat	Aksotomi (%31)	TrkA (%68)	PI3K (%32)	MEK-1 (%35)
Aksotomi (%65)	1	0.001	0.915	0.597
TrkA (%90)	0.001	1	0.001	0.001
PI3K (%65)	0.954	0.001	1	0.672
MEK-1 (%73)	0.184	0.001	0.199	1



Şekil 4.55. Obez + AA grubunun 30. hafta nöron kültürü medyumlarına inhibitör (TrkA, PI3K ve MEK-1) eklenmesiyle aksotomi sonrası 24. ve 48. saatlerdeki nöronal sağ kalım oranları (%). ^{a,b}24. saat, ^{A,B}48. saatte gruplar arası fark anlamlıdır (p<0.05).

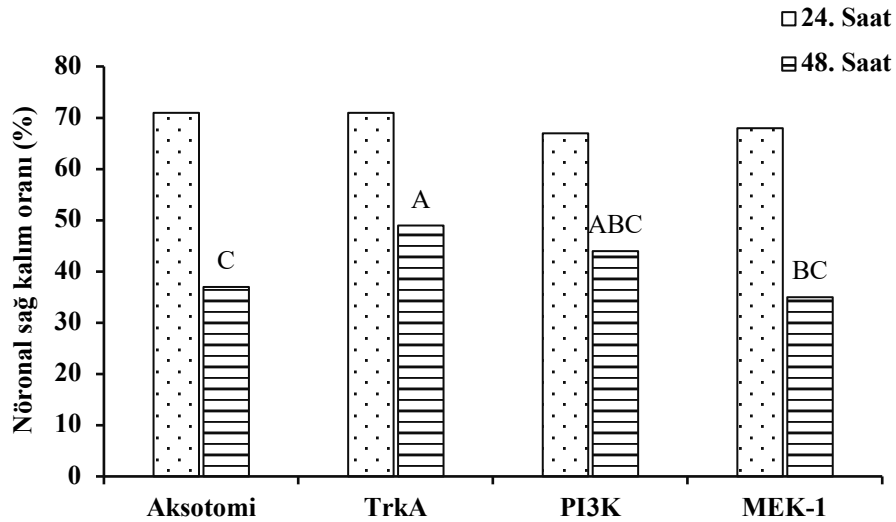
30. hafta Obez + AA grubunda TrkA eklenmesiyle aksotomi sonrası 24. ve 48. saatlerde nöron kültürü medyumlarındaki nöronların sağ kalım oranları diğer inhibitör eklenenlerden daha yüksekti (p<0.05) (Tablo 4.17, Şekil 4.55). Diğer inhibitör eklenen gruplar arasında anlamlı fark yoktu.

30. hafta Obez + Kap grubuna ait nöron kültürü medyumlarına inhibitörlerin (TrkA, PI3K ve MEK-1) eklenmesiyle aksotomi sonrası 24. ve 48. saatlerdeki sağ

kalım oranlarına ait istatistiksel karşılaştırmalar Tablo 4.18’de, sağ kalım oranlarına ait grafik ise Şekil 4.56’da verilmiştir.

Tablo 4.18. Obez + Kap grubunun 30. hafta nöron kültürü medyumlarına inhibitör (TrkA, PI3K ve MEK-1) eklenmesiyle aksotomi sonrası 24. ve 48. saatlerde sağ kalım oranları için gruplara ve saatlere göre istatistiksel karşılaştırma sonuçları.

48.saat 24. saat	Aksotomi (%37)	TrkA (%49)	PI3K (%44)	MEK-1 (%35)
Aksotomi (%71)	1	0.039	0.246	0.710
TrkA (%71)	1	1	0.448	0.020
PI3K (%67)	0.422	0.422	1	0.147
MEK-1 (%68)	0.547	0.547	0.848	1



Şekil 4.56. Obez + Kap grubunun 30. hafta nöron kültürü medyumlarına inhibitör (TrkA, PI3K ve MEK-1) eklenmesiyle aksotomi sonrası 24. ve 48. saatlerdeki nöronal sağ kalım oranları (%). ^{A,B,C}48. saatte gruplar arası fark anlamlıdır ($p<0.05$).

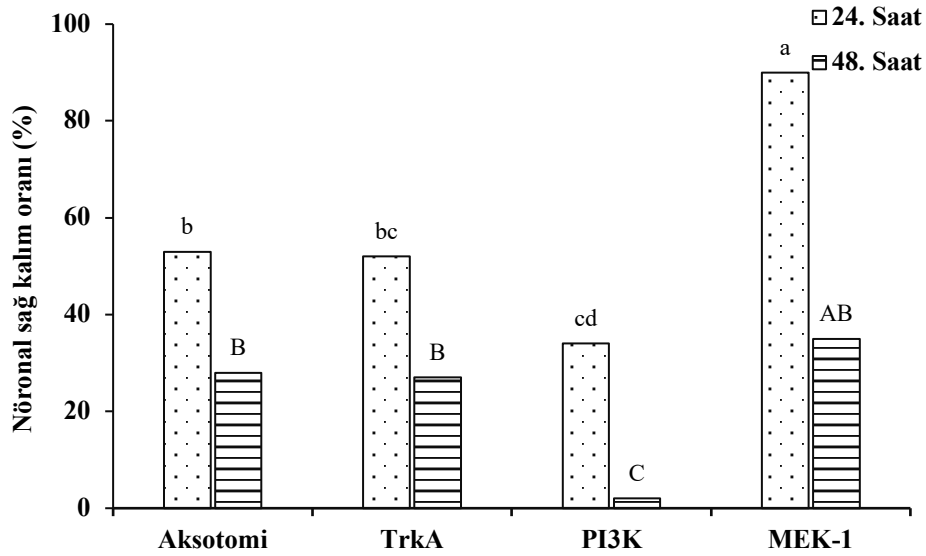
30. hafta Obez + Kap grubunda TrkA eklenmesiyle aksotomi sonrası 48. saatte nöron kültürü medyumlarındaki nöronların sağ kalım oranları PI3K eklenenlerden daha yüksekti ($p<0.05$) (Tablo 4.18, Şekil 4.56). Diğer inhibitör eklenen gruplar arasında anlamlı fark yoktu.

30. hafta Obez + AA + Kap grubuna ait nöron kültürü medyumlarına inhibitörlerin (TrkA, PI3K ve MEK-1) eklenmesiyle aksotomi sonrası 24. ve 48.

saatlerdeki sağ kalım oranlarına ait istatistiksel karşılaştırmalar Tablo 4.19’da, sağ kalım oranlarına ait grafik ise Şekil 4.57’de verilmiştir.

Tablo 4.19. Obez + AA + Kap grubunun 30. hafta nöron kültürü medyumlarına inhibitör (TrkA, PI3K ve MEK-1) eklenmesiyle aksotomi sonrası 24. ve 48. saatlerde sağ kalım oranları için gruplara ve saatlere göre tanımlayıcı istatistikleri ve karşılaştırma sonuçları.

48.saat 24.saat	Aksotomi (%28)	TrkA (%27)	PI3K (%2)	MEK-1 (%35)
Aksotomi (%53)	1	0.930	0.001	0.419
TrkA (%52)	0.937	1	0.001	0.407
PI3K (%34)	0.029	0.058	1	0.001
MEK-1 (%90)	0.001	0.001	0.001	1



Şekil 4.57. Obez + AA + Kap grubunun 30. hafta nöron kültürü medyumlarına inhibitör (TrkA, PI3K ve MEK-1) eklenmesiyle aksotomi sonrası 24. ve 48. saatlerdeki nöronal sağ kalım oranları (%). ^{a,b,c,d}24. saat, ^{A,B,C}48. saatte gruplar arası fark anlamlıdır (p<0.05).

30. hafta Obez + AA + Kap grubunda PI3K eklenmesiyle aksotomi sonrası 24. saatte nöron kültürü medyumlarındaki nöronların sağ kalım oranları diğer inhibitör eklenenlerden daha yüksekti (p<0.05). Diğer inhibitör eklenen gruplar arasında 24. saat ve 48. saatte sağ kalım oranları bakımından anlamlı fark yoktu. (Tablo 4.19, Şekil 4.57).

5. TARTIŞMA

Obezite, aşırı yağ birikimi ve kronik inflamasyon ile karakterize metabolik bir bozukluktur. Ayrıca, tip 2 diyabet, hiperlipidemi, hiperkolesterolemi, hipertansiyon, kardiyovasküler hastalık, obstrüktif uyku apne sendromu, kas-iskelet bozuklukları ve çeşitli kanser türleri gibi pek çok hastalığın gelişiminde önemli rol oynamaktadır (25-27). Yüksek yağlı yemle beslenen hayvanlarda anksiyete geliştiği görülmüştür (111). Buna karşın, yüksek yağlı diyetin anksiyeteye karşı koruyucu etkiye sahip olduğunu rapor eden çalışmalar da mevcuttur (112, 113).

Aralıklı açlık (AA), gün içinde veya haftanın belirli günlerinde enerji içeren yiyecek ve içecek tüketiminin kısıtlandığı veya hiç tüketilmediği birinci evre ile devamında besin tüketiminin normal devam ettiği ikinci evrenin yer aldığı iki evreli bir beslenme tipidir. AA diyeti vücut yağ oranını azaltır, kilo kaybını artırır, tip 2 diyabeti önler ve nörodejeneratif hastalıkların ilerleyişini yavaşlatır (7). Hipokampüste ve diğer beyin bölgelerinde nöronların mitokondriyal stres direncini artırır (114, 115). Ayrıca, sinaptik plastisiteyi teşvik ederken (116), bilişsel performansı artırır (117, 118), inflamasyonu azaltır, sağlıklı hücreleri korur, tümör büyümesini yavaşlatır ve kemoterapik ajanlarının etkinliğini artırır (119).

Kapsaisin, beyaz yağ dokusunun kahverengi yağ dokusuna dönüşmesini sağladığı için kilo kaybında önemli bir etkinliğe sahiptir (83). Termogenezi, TRPV1 kanal aktivasyonu yoluyla indükler. Kapsaisin, insanlarda anoreksijenik bir hormon olan GLP-1 konsantrasyonunu artırırken, oreksijenik hormon ghrelin konsantrasyonunu ise azaltmaktadır (84).

Bu çalışmada obezite, aralıklı açlık ve kapsaisinin dorsal kök gangliyon (duysal) nöronları, periferik duysal ve motor sinirler ile inerve ettikleri iskelet kas dokusundaki dejeneratif ve rejeneratif etkileri araştırıldı. Çalışma; diyetle bağlı deneysel obezite modelinde AA ve kapsaisin uygulamalarının hem *in vivo* (ağırlık, rotarod, hot plate, tail-flick, latans, MSİH, BKAP, β III-Tub, NFH, MBP, P0, S100, α -BNG) hem de *in vitro* (aksotomiye maruz bırakılmış DRG nöronlarının hücre kültürlerinde sağ kalım oranları ve ilgili reseptör mekanizmaları), etkilerinin ele alınmış olması bakımından özgün bir nitelik taşımaktadır.

Çalışmamızda 15. haftada Obez grubunda Kontrol grubuna göre en az % 20 daha fazla bir ağırlık artışı gerçekleşmesi obez modelin oluştuğunu gösterdi (120). 30. haftadaki gruplar arasında ağırlık artışı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi. İnsan çalışmalarında, aralıklı gün oruç diyetinin önemli miktarda ağırlık kaybına sebep olduğu, yağ kütlesi ve yağsız vücut kütlelerinde azalmalara yol açtığı bildirilmiştir (69). Diğer taraftan, kapsaisin de vücut ağırlığının azaltılması veya korunmasında etkili olduğu bildirilmiştir (84, 121). Diyetle kapsaisin eklenmesinin gıda alımını azalttığı ve doyumluk hissi oluşturarak, açlık hissini bastırdığı rapor edilmiştir (84, 121). Çalışmamızda ilk 15 hafta obez grupta daha yüksek canlı ağırlık artışı gerçekleşirken, ikinci 15 haftada daha az canlı ağırlık artışı gerçekleştiği görüldü. Aralıklı açlık ve kapsaisin uygulanan gruplarda canlı ağırlık artışları obez grubuna göre daha düşük kalmakla birlikte bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Çalışmamızda, Obez + AA ve Obez + AA + Kap gruplarında, Obez gruba göre motor performansın arttığı tespit edildi. Rotarod bulgularımız, Obez farelerde AA ve AA + Kap uygulamasının üst ve alt motor sinirler üzerinde terapötik etkili olabileceğini göstermektedir. AA diyeti uygulanan bir çalışmada; orta yaştaki sıçanların ömürlerinin %30-40 arttığı ve bu yaşam süresinin düzenli egzersizle daha da arttırılabileceği rapor edilmiştir (122).

Çalışmamızda, 15. haftada Obez grubun termal ağırlı uyaran (hot plate) ve ışık-ısı (tail-flick) kaynaklı uyarana cevap süresinin, kontrol grubuna göre anlamlı derecede geciktiği gözlemlendi. Bu sonuç, obezitenin periferik duysal nöropatiyi tetiklediğini göstermektedir. 30. haftadaki gruplar arasında termal ve ışık-ısı kaynaklı uyarana cevap süresinde istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi. Bu durum, farelerde periferik duysal sinirlerin içsel rejeneratif kapasitesinin uzun dönemde etkin olduğunu, kontrol grubu ile aynı fonksiyonel seviyeye geldiğine işaret etmektedir. 15. hafta Obez grubu ile 30. hafta Obez ve tedavi grupları karşılaştırıldığında, Obez + AA grubu, 15. hafta Obez grubuna göre termal ağırlı uyarana daha hızlı yanıt vermiştir. Yine farenin kuyruğuna ışık kaynağından uygulanan uyarana tedavi grupları daha hızlı cevap vermişlerdir. Bu sonuçlar, AA diyetinin periferik duysal nöropati tedavisinde etkili olabileceğini göstermektedir. AA diyeti ile yapılan çalışmalarda, nörodejeneratif hastalıklarda nöronal fonksiyon kaybını geciktirdiği ve hastalıkların ilerleyişini

yavaşlattığı gösterilmiştir (7). Dolayısıyla duysal uyaranlara yanıt bulgularımız literatür sonuçları ile uyumludur.

Çalışmamızda motor sinir fonksiyon testleri kapsamında EMG incelemesi gerçekleştirilmiştir. Başlangıç latans süresi bakımından Obez grubunda Kontrol ve AA grubuna göre anlamlı gecikme görüldü. AA grubu ile Kontrol grubu arasında anlamlı fark yoktu. Obez grubunda motor sinir ileti hızı, Kontrol ve AA grubuna göre azaldı. Bununla birlikte, AA grubu ile Kontrol grubu arasında ise anlamlı fark görülmedi. Bu bulgular, obezitenin miyelin hasarına yol açtığını böylece latansı geciktirdiğini ve sinir ileti hızını yavaşlattığına işaret etmektedir. Bileşik kas aksiyon potansiyeli bakımından gruplar arasında fark olmamakla birlikte, Obez grubunun aksiyon potansiyeli, Kontrol ve AA grubuna göre daha düşük olarak bulundu. Davidson ve ark. (2014) tarafından yüksek yağlı yemle beslenen sıçanlar üzerinde yapılan çalışmada, obezitenin duysal sinir iletim hızında, korneal subepitelyal sinirlerde ve kornea duyarlılığında azalmaya sebep olduğu, ancak motor sinir ileti hızında fark olmadığı bildirilmiştir (123). İnsanlarda gerçekleştirilen bir çalışmada topikal kapsaisin uygulamasının, derideki sinir liflerinin dejenerasyonuna sebep olduğu, soğuğa ve dokunsal uyaranlara duyarlılığı azalttığı belirtilmiştir (84). 20 hafta boyunca yüksek yağlı yemle beslenen farelerde, kontrol farelerine kıyasla motor sinir ileti hızının önemli ölçüde yavaşladığı bildirilmiştir (31). Yine diğer bir çalışmada yüksek yağlı yemle beslenen farelerde motor sinir ileti hızı ve intraepidermal sinir lifi yoğunluğu azalmıştır (124). Çalışma sonuçlarımızın belirtilen çalışma sonuçlarıyla uyumlu olduğu görülmektedir.

İmmünohistokimya analizleri kapsamında 15. haftada periferik sinir lifinde akson filamentleri (β III-Tub, NFH), miyelin proteinleri (MBP, P0), Schwann hücre proteini (S100) ve iskelet kas lifi asetilkolin reseptörü (α -BNG) immünofloresan teknikle konfokal mikroskopta görüntülendi. Obez grubunda β III-Tub, NFH, S100, MBP, P0, α -BNG piksel yoğunluklarının, Kontrol grubuna göre önemli derecede düşük olduğu görüldü. Bu sonuçlar, akson filamentlerinde, miyelin kılıfında, Schwann hücrelerinde ve asetilkolin reseptörlerinde obezite kaynaklı hasarlar oluştuğunu gösterdi. Rejenerasyonun araştırıldığı 30. haftada, β III-Tub, NFH, S100 piksel yoğunlukları bakımından gruplar arasında anlamlı fark görülmedi. MBP ve P0 piksel yoğunluklarının Kontrol grubu ve Obez + AA + Kap grubunda Obez grubundan daha yüksek olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte, Kontrol grubu ile Obez + AA grubu

arasında, benzer şekilde Kontrol grubu ile Obez + AA + Kap grubu arasında anlamlı bir fark görülmedi. α -BNG piksel yoğunluğu Kontrol grubu ve Obez + AA + Kap grubunda Obez grubundan daha yüksek bulunurken, Kontrol grubu ile Obez + AA ve Obez + Kap grupları arasında anlamlı fark görülmedi. Yine α -BNG bakımından 30. hafta Obez ve tedavi gruplarının piksel yoğunluğu ise 15. hafta Obez grubundan daha yüksekti. İmmünohistokimya sonuçlarımız, AA diyeti ile birlikte uygulanan kapsaisin tedavisinin, sinir lifinde miyelin kılıfı, kas lifinde asetilkolin reseptörlerini rejenere ettiğini gösterdi. Aksonal belirteçler bakımından gruplar arasında fark bulunamadı. Aralıklı açlık ve kapsaisinin akson rejenerasyonuna etkisini belirleyebilmek için, daha erken evrelerde immünohistokimyasal incelemelerin ve morfolojik sonuçları destekleyecek fonksiyonel testlerin yapılmasının faydalı olacağı kanaatindeyiz. İmmünohistokimya ile elde ettiğimiz morfolojik bulgularımız, duysal ve motor fonksiyon sonuçlarımızı destekledi. Davidson ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada, yüksek yağlı beslenmenin korneal sinir lifinde kısalma, korneal duyarlılıkta azalma ve sinir lifi β III-Tub yoğunluğunda azalmaya sebep olduğu bildirilmiştir (123). AA diyet uygulaması, kas ve karaciğer hücrelerinde insülin reseptörlerinin duyarlılığını artırmıştır (125). Yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde korneal sinir lifi yoğunluğu azalmıştır (124). Obez ve diyabetik farelerde gözlenen nöropati, nöromusküler kavşakta ve sinaptik bütünlükte eksikliğe sebep olurken, sinaptik belirteçlerin ve nörotrofik faktörlerin gen ekspresyonunda ise artışa yol açtığı bildirilmiştir (126).

15. haftada *in vitro* ortamda lazer mikrodiseksiyon tekniği ile DRG nöronlarında oluşturulan aksotomi hasarı sonrası hem 24. hem 48. saatlerde Obez grubunun nöronal sağ kalım oranlarının Kontrol grubuna göre anlamlı oranda düşük olduğu belirlendi. Bu sonuçlar, obezitenin 15 haftalık dönemde travma hasarlı periferik duysal nöronların Wallerian dejenerasyonunu tetiklediğini, böylece sağ kalım oranını azalttığına bir işaret olarak değerlendirilebilir.

30. haftada 24. saatteki nöronal sağ kalım oranları bakımından Kontrol grubu ile Obez, Obez + AA ve Obez + Kap grupları arasında anlamlı fark görülmedi. Obez + AA + Kap grubunun 24. saatteki nöronal sağ kalım oranının ise Kontrol, Obez, Obez + Kap gruplarından daha düşük olduğu görüldü. Bu sonuç, AA diyeti ile kapsaisinin kombinasyonunun (açlık stresi ile ağrı stresinin birlikte majör stres oluşturmaları

sebebiyle) duysal nöronların periferik travma hasarının üstesinden gelme kabiliyetini azaltmış olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. *In vitro* bir çalışmada, Kap duysal nöronlarda kaspaz bağımlı hücre hasarına ve ölüme yol açmıştır (84, 127). Kap'ın farklı dozlarının, duysal ve otonomik nöronlarda rejenerasyon ve dejenerasyona sebep olabileceği belirtilmiştir (128). 48. saatteki nöronal sağ kalım oranlarına bakıldığında Kontrol grubu ile Obez, Obez + AA, Obez + Kap ve Obez + AA + Kap grupları arasında anlamlı fark görülmedi. 30. haftadaki nöronal sağ kalım oranlarındaki artışın, obezitenin ilerleyen süreçlerinde periferik duysal nöronların travma stresi ile başa çıkma kabiliyetinin artmasına bağlı olarak gelişmiş olabileceği düşünülmektedir.

Aksotomi ile tetiklenen hücre ölüm sinyal yolağını ve nöronal sağ kalım mekanizmasını belirlemek için TrkA, PI3K ve MEK-1 inhibitörleri kullanıldı. Kontrol, Obez, Obez + AA, Obez + Kap gruplarında aksotomi sonrası 48. saatte TrkA reseptör inhibitörünün (K252a) sağ kalım oranı, diğer alt gruplardan daha yüksek bulundu. Bu sonuç TrkA reseptör sinyal yolağının inhibisyonu sayesinde aksotomi hasarlı periferik duysal nöronların sağ kalım oranının arttığını göstermektedir. Bir başka ifadeyle, TrkA reseptörü ile ilişkili Wallerian dejenerasyon (nekrotik ölüm) yolağı bulunduğu ve bu reseptörün aktivasyonu ile bir ölüm sinyal yolağının tetiklendiği anlaşılmaktadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. 15 hafta boyunca yüksek yağlı yemle (%45 yağlı) beslenen C57Bl/6 ırkı farelerde diyetle bağlı deneysel obezite modeli başarılı bir şekilde oluşturuldu.
2. Obez grubun canlı ağırlık artışı ilk 15 haftada Kontrol grubuna göre anlamlı oranda daha yüksek olmakla beraber ikinci 15 haftadaki artış daha düşük düzeylerde kalarak gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı.
3. Obezite ilk 15 haftalık dönemde periferik nöropatiye sebep oldu. Obezitenin ayrıca duysal sinirlerde hiperaljezi cevabının gecikmesine, motor sinirlerde latans gecikmesine ve sinir ileti hızının yavaşlamasına sebep olduğu bulundu. Bu bulgular obezitenin miyelin kaybına da sebep olabileceğini ortaya koymaktadır. AA ve AA + Kap uygulamasının, motor koordinasyonu ve motor performansı anlamlı derecede artırdığı bulunurken. AA'nın ayrıca, latansı ve motor sinir ileti hızını artırdığı gözlemlendi.
4. 15. haftadaki Obez grubun immünohistokimyasal boyamalardan elde edilen immünofloresan görüntülerinde, obezitenin periferik sinirlerin akson filamentlerinde, miyelin kılıfında, Schwann hücrelerinde ve iskelet kası asetilkolin reseptörlerinde hasarlar oluşturduğu görüldü. Fonksiyonel bulgularla saptanan periferik nöropati böylece morfolojik testlerle de doğrulandı. AA ile birlikte uygulanan kapsaisin tedavisinin sinir lifinde miyelin kılıfı, kas lifinde ise asetilkolin reseptörlerini rejenere ettiği tespit edildi.
5. 15. haftada *in vitro* ortamda DRG nöronların aksotomi sonrası sağ kalım sonuçları, obezitenin travma hasarlı periferik duysal nöronların sağ kalım oranını Wallerian dejenerasyonu ile azalttığı gözlemlendi. 30. hafta aksotomi sonuçları ise, vücudun daha uzun süreli obeziteye maruz kalması durumunda periferik duysal nöronların travma stresi ile başa çıkabilme kabiliyetinin arttığı, böylece sağ kalım oranlarının yükseldiği görüldü.
6. TrkA reseptör sinyal yolağının inhibisyonu, aksotomi hasarlı periferik duysal nöronların sağ kalım oranını artırdı. Bu bulgu, TrkA reseptörü ile ilişkili bir

Wallerian dejenerasyon (nekrotik ölüm) yolağının bulunduğu ve bu reseptörün aktivasyonu ile bir ölüm sinyal yolağının tetiklendiği düşünülmektedir.

7. Fonksiyonel testlerin, immünohistokimya analizlerin ve in vitro deneylerin, aralıklı açlık ve kapsaisin ile tedavi sürecinin daha erken evrelerinde tekrarlanması durumunda istatistiksel olarak daha anlamlı sonuçların elde edilebileceği düşünülmektedir.
8. Obez hayvan modelinde, yüksek yağlı yem diyeti ile besleme devam ederken aralıklı açlık ve kapsaisinin kombine olarak uygulanması canlı ağırlık kaybına olumlu herhangi bir katkı sağlamadı.
9. Bu çalışmada, obezite ile periferik nöropati arasındaki ilişki ortaya konuldu ancak bu ilişkinin fizyopatolojik mekanizması daha ileri ve daha kapsamlı araştırmalarla aydınlatılmalıdır.
10. Obezite ile indüklenen ve aksotomiyle tetiklenen hücre ölüm mekanizmasının (TrkA ve p75 ölüm sinyal kaskadları) ve aralıklı açlıkla tetiklenen sağ kalım mekanizmasının (TrkA, TrkB, TrkC sinyal kaskadları) daha ileri çalışmalarla araştırılmasını önermekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Biochemistry Do, Jessell MBT, Siegelbaum S, et al. *Principles of neural science*, McGraw-hill New York, 2000.
2. Lee S, Notterpek L. “Dietary restriction supports peripheral nerve health by enhancing endogenous protein quality control mechanisms”, *Exp Gerontol*, 2013, 48:1085-1090.
3. Stino AM, Smith AG. “Peripheral neuropathy in prediabetes and the metabolic syndrome”, *J Diabetes Investig*, 2017, 8:646-655.
4. Reinhold AK, Rittner HL. “Barrier function in the peripheral and central nervous system-a review”, *Pflugers Arch*, 2017, 469:123-134.
5. Cao J, Kong L, Meng F, Zhang Y, Shen Y. “Impact of obesity on lumbar spinal surgery outcomes”, *J Clin Neurosci*, 2016, 28:1-6.
6. Seo YG, Noh HM, Kim SY. “Weight loss effects of circuit training interventions: A systematic review and meta-analysis”, *Obes Rev*, 2019, 20:1642-1650.
7. Li GL, Xie C, Lu SY, Nichols RG, Tian Y, Li LC, et al. “Intermittent Fasting Promotes White Adipose Browning and Decreases Obesity by Shaping the Gut Microbiota”, *Cell Metabolism*, 2017, 26:672.
8. Hoffmann J, Janowitz D, Van der Auwera S, Wittfeld K, Nauck M, Friedrich N, et al. “Association between serum neuron-specific enolase, age, overweight, and structural MRI patterns in 901 subjects”, *Transl Psychiatry*, 2017, 7:1272.
9. Callaghan BC, Gao LL, Li YF, Zhou XH, Reynolds E, Banerjee M, et al. “Diabetes and obesity are the main metabolic drivers of peripheral neuropathy”, *Ann Clin Transl Neur*, 2018, 5:397-405.
10. Oh TJ, Lee JE, Choi SH, Jang HC. “Association between Body Fat and Diabetic Peripheral Neuropathy in Middle-Aged Adults with Type 2 Diabetes Mellitus: A Preliminary Report”, *J Obes Metab Syndr*, 2019, 28:112-117.

11. Andersen ST, Witte DR, Fleischer J, Andersen H, Lauritzen T, Jorgensen ME, et al. "Risk Factors for the Presence and Progression of Cardiovascular Autonomic Neuropathy in Type 2 Diabetes: ADDITION-Denmark", *Diabetes Care*, 2018, 41:2586-2594.
12. Tesfaye S, Chaturvedi N, Eaton SE, Ward JD, Manes C, Ionescu-Tirgoviste C, et al. "Vascular risk factors and diabetic neuropathy", *N Engl J Med*, 2005, 352:341-350.
13. van Nooten F, Treur M, Pantiri K, Stoker M, Charokopou M. "Capsaicin 8% Patch Versus Oral Neuropathic Pain Medications for the Treatment of Painful Diabetic Peripheral Neuropathy: A Systematic Literature Review and Network Meta-analysis", *Clin Ther*, 2017, 39:787-803 e718.
14. Blair HA. "Capsaicin 8% Dermal Patch: A Review in Peripheral Neuropathic Pain", *Drugs*, 2018, 78:1489-1500.
15. Callaghan B, Feldman E. "The metabolic syndrome and neuropathy: therapeutic challenges and opportunities", *Ann Neurol*, 2013, 74:397-403.
16. Kang JH, Kim CS, Han IS, Kawada T, Yu R. "Capsaicin, a spicy component of hot peppers, modulates adipokine gene expression and protein release from obese-mouse adipose tissues and isolated adipocytes, and suppresses the inflammatory responses of adipose tissue macrophages", *FEBS Lett*, 2007, 581:4389-4396.
17. Wang J, Tian WK, Wang SW, Wei WQ, Wu DD, Wang HG, et al. "Anti-inflammatory and retinal protective effects of capsaicin on ischaemia-induced injuries through the release of endogenous somatostatin", *Clin Exp Pharmacol P*, 2017, 44:803-814.
18. Mosqueda-Solis A, Sanchez J, Reynes B, Palou M, Portillo MP, Palou A, et al. "Hesperidin and capsaicin, but not the combination, prevent hepatic steatosis and other metabolic syndrome-related alterations in western diet-fed rats", *Sci Rep*, 2018, 8:15100.

19. Anand P, Elsaifa E, Privitera R, Naidoo K, Yiangou Y, Donatien P, et al. "Rational treatment of chemotherapy-induced peripheral neuropathy with capsaicin 8% patch: from pain relief towards disease modification", *J Pain Res*, 2019, 12:2039-2052.
20. Madorsky I, Opalach K, Waber A, Verrier JD, Solmo C, Foster T, et al. "Intermittent fasting alleviates the neuropathic phenotype in a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease", *Neurobiol Dis*, 2009, 34:146-154.
21. Jeong MA, Plunet W, Streijger F, Lee JH, Plemel JR, Park S, et al. "Intermittent fasting improves functional recovery after rat thoracic contusion spinal cord injury", *J Neurotrauma*, 2011, 28:479-492.
22. WHO WHO. Obesity and overweight. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. 23 september 2021.
23. Bariatrics R. Obesity Rates by Country 2017. <https://renewbariatrics.com/obesity-rank-by-countries/>. 23 september 2021.
24. Flegal KM, Ioannidis JPA, Doehner W. "Flawed methods and inappropriate conclusions for health policy on overweight and obesity: the Global BMI Mortality Collaboration meta-analysis", *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2019, 10:9-13.
25. Paes ST, Marins JC, Andreazzi AE. "[Metabolic effects of exercise on childhood obesity: a current view]", *Rev Paul Pediatr*, 2015, 33:122-129.
26. Boyraz O, Saracoglu M. "The effect of obesity on the assessment of diabetic peripheral neuropathy: a comparison of Michigan patient version test and Michigan physical assessment", *Diabetes Res Clin Pract*, 2010, 90:256-260.
27. Wang H, Wang B, Yin H, Zhang G, Yu L, Kong X, et al. "Reduced neurotrophic factor level is the early event before the functional neuronal deficiency in high-fat diet induced obese mice", *Metab Brain Dis*, 2017, 32:247-257.
28. Vernochet C, Damilano F, Mourier A, Bezy O, Mori MA, Smyth G, et al. "Adipose tissue mitochondrial dysfunction triggers a lipodystrophic syndrome

with insulin resistance, hepatosteatosi, and cardiovascular complications”, *FASEB J*, 2014, 28:4408-4419.

29. Harvie MN, Howell T. “Could Intermittent Energy Restriction and Intermittent Fasting Reduce Rates of Cancer in Obese, Overweight, and Normal-Weight Subjects? A Summary of Evidence”, *Adv Nutr*, 2016, 7:690-705.
30. Coppey L, Lu B, Gerard C, Yorek MA. “Effect of Inhibition of Angiotensin-Converting Enzyme and/or Neutral Endopeptidase on Neuropathy in High-Fat-Fed C57Bl/6J Mice”, *J Obes*, 2012, 2012:326806.
31. Yorek MS, Obrosova A, Shevalye H, Holmes A, Harper MM, Kardon RH, et al. “Effect of diet-induced obesity or type 1 or type 2 diabetes on corneal nerves and peripheral neuropathy in C57Bl/6J mice”, *J Peripher Nerv Syst*, 2015, 20:24-31.
32. Suter TACS, Jaworski A. “Cell migration and axon guidance at the border between central and peripheral nervous system”, *Science*, 2019, 365:881.
33. Chang RB. “Optogenetic Control of the Peripheral Nervous System”, *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2019, 9.
34. Catala M, Kubis N. “Gross anatomy and development of the peripheral nervous system”, *Handb Clin Neurol*, 2013, 115:29-41.
35. Arthur C. Guyton JEH. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology* 2017.
36. Barrell K, Smith AG. “Peripheral Neuropathy”, *Med Clin North Am*, 2019, 103:383-397.
37. Laszlo A, Lenart L, Illesy L, Fekete A, Nemcsik J. “The role of neurotrophins in psychopathology and cardiovascular diseases: psychosomatic connections”, *J Neural Transm (Vienna)*, 2019, 126:265-278.
38. Houlton J, Abumaria N, Hinkley SFR, Clarkson AN. “Therapeutic Potential of Neurotrophins for Repair After Brain Injury: A Helping Hand From Biomaterials”, *Front Neurosci*, 2019, 13:790.

39. Aloe L, Rocco ML, Balzamino BO, Micera A. "Nerve Growth Factor: A Focus on Neuroscience and Therapy", *Curr Neuropharmacol*, 2015, 13:294-303.
40. Kaval Oguz E. "Neuronal survival of DRG neurons after neurite transection in vitro promotes by nerve growth factor and brain derived neurotrophic factor", *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2018, 64:41-46.
41. Bove M, Monto F, Guillem-Llobat P, Ivorra MD, Noguera MA, Zambrano A, et al. "NT3/TrkC Pathway Modulates the Expression of UCP-1 and Adipocyte Size in Human and Rodent Adipose Tissue", *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, 12:630097.
42. Kalb R. "The protean actions of neurotrophins and their receptors on the life and death of neurons", *Trends Neurosci*, 2005, 28:5-11.
43. Kumar A, Pareek V, Faiq MA, Kumar P, Raza K, Prasoon P, et al. "Regulatory role of NGFs in neurocognitive functions", *Rev Neurosci*, 2017, 28:649-673.
44. Kaplan DR, Miller FD. "Neurotrophin signal transduction in the nervous system", *Current Opinion in Neurobiology*, 2000, 10:381-391.
45. Gallo G, Letourneau PC. "Regulation of growth cone actin filaments by guidance cues", *J Neurobiol*, 2004, 58:92-102.
46. Ghazizadeh V, Naziroglu M. "Electromagnetic radiation (Wi-Fi) and epilepsy induce calcium entry and apoptosis through activation of TRPV1 channel in hippocampus and dorsal root ganglion of rats", *Metabolic Brain Disease*, 2014, 29:787-799.
47. Khan N, Smith MT. "Neurotrophins and Neuropathic Pain: Role in Pathobiology", *Molecules*, 2015, 20:10657-10688.
48. Aloe L, Rocco ML, Bianchi P, Manni L. "Nerve growth factor: from the early discoveries to the potential clinical use", *J Transl Med*, 2012, 10.
49. Chen KS, Nishimura MC, Armanini MP, Crowley C, Spencer SD, Phillips HS. "Disruption of a single allele of the nerve growth factor gene results in atrophy

of basal forebrain cholinergic neurons and memory deficits”, *Journal of Neuroscience*, 1997, 17:7288-7296.

50. Ji RR, Kawasaki Y, Zhuang ZY, Wen YR, Zhang YQ. “Protein kinases as potential targets for the treatment of pathological pain”, *Handb Exp Pharmacol*, 2007:359-389.
51. Zhuang ZY, Gerner P, Woolf CJ, Ji RR. “ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model”, *Pain*, 2005, 114:149-159.
52. Pezet S, Malcangio M, McMahon SB. “BDNF: a neuromodulator in nociceptive pathways?”, *Brain Res Rev*, 2002, 40:240-249.
53. Xu JT, Tu HY, Xin WJ, Liu XG, Zhang GH, Zhai CH. “Activation of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B/Akt in dorsal root ganglia and spinal cord contributes to the neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in rats”, *Experimental Neurology*, 2007, 206:269-279.
54. Huang EJ, Reichardt LF. “Trk receptors: Roles in neuronal signal transduction”, *Annu Rev Biochem*, 2003, 72:609-642.
55. Canossa M, Griesbeck O, Berninger B, Campana G, Kolbeck R, Thoenen H. “Neurotrophin release by neurotrophins: Implications for activity-dependent neuronal plasticity”, *P Natl Acad Sci USA*, 1997, 94:13279-13286.
56. Narita M, Yajima Y, Aoki T, Ozaki S, Narita M, Mizoguchi H, et al. “Up-regulation of the TrkB receptor in mice injured by the partial ligation of the sciatic nerve”, *European Journal of Pharmacology*, 2000, 401:187-190.
- 57.Coderre TJ. “Contribution of Protein-Kinase-C to Central Sensitization and Persistent Pain Following Tissue-Injury”, *Neuroscience Letters*, 1992, 140:181-184.
58. Luther JA, Enes J, Birren SJ. “Neurotrophins regulate cholinergic synaptic transmission in cultured rat sympathetic neurons through a p75-dependent mechanism”, *J Neurophysiol*, 2013, 109:485-496.

59. Erickson KI, Voss MW, Prakash RS, Basak C, Szabo A, Chaddock L, et al. "Exercise training increases size of hippocampus and improves memory", *P Natl Acad Sci USA*, 2011, 108:3017-3022.
60. Zoladz JA, Pilc A, Majerczak J, Grandys M, Zapart-Bukowska J, Duda K. "Endurance Training Increases Plasma Brain-Derived Neurotrophic Factor Concentration in Young Healthy Men", *J Physiol Pharmacol*, 2008, 59:119-132.
61. Molteni R, Wu A, Vaynman S, Ying Z, Barnard RJ, 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, 123:429-440.
62. Mattson MP. "Energy intake, meal frequency, and health: A neurobiological perspective", *Annu Rev Nutr*, 2005, 25:237-260.
63. Branchi I, D'Andrea I, Sietzema J, Fiore M, Di Fausto V, Aloe L, et al. "Early social enrichment augments adult hippocampal BDNF levels and survival of BRDU-positive cells while increasing anxiety- and "depression"-like behavior", *Journal of Neuroscience Research*, 2006, 83:965-973.
64. Branchi I, D'Andrea I, Fiore M, Di Fausto V, Aloe L, Alleva E. "Early social enrichment shapes social behavior and nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor levels in the adult mouse brain", *Biol Psychiatry*, 2006, 60:690-696.
65. Rasmussen P, Brassard P, Adser H, Pedersen MV, Leick L, Hart E, et al. "Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise", *Exp Physiol*, 2009, 94:1062-1069.
66. Callaghan BC, Xia R, Reynolds E, Banerjee M, Burant C, Rothberg A, et al. "Better diagnostic accuracy of neuropathy in obesity: A new challenge for neurologists", *Clin Neurophysiol*, 2018, 129:654-662.
67. Kessler CS, Stange R, Schlenkermann M, Jeitler M, Michalsen A, Selle A, et al. "A nonrandomized controlled clinical pilot trial on 8 wk of intermittent fasting (24 h/wk)", *Nutrition*, 2018, 46:143-152.

68. Kessler CS, Stange R, Schlenkermann M, Jeitler M, Michalsen A, Selle A, et al. "A nonrandomized controlled clinical pilot trial on 8 wk of intermittent fasting (24 h/wk) (vol 46, pg 143, 2018)", *Nutrition*, 2020, 74.
69. Tripolt NJ, Stekovic S, Aberer F, Url J, Pferschy PN, Schroder S, et al. "Intermittent Fasting (Alternate Day Fasting) in Healthy, Non-obese Adults: Protocol for a Cohort Trial with an Embedded Randomized Controlled Pilot Trial", *Adv Ther*, 2018, 35:1265-1283.
70. Van Dyck L, Vanhorebeek I, Wilmer A, Schrijvers A, Derese I, Mebis L, et al. "Towards a fasting-mimicking diet for critically ill patients: the pilot randomized crossover ICU-FM-1 study", *Crit Care*, 2020, 24:249.
71. Martins Terra M, Schaeffer Fontoura T, Oliveira Nogueira A, Ferraz Lopes J, de Freitas Mathias PC, Andreazzi AE, et al. "Multigenerational effects of chronic maternal exposure to a high sugar/fat diet and physical training", *J Dev Orig Health Dis*, 2020, 11:159-167.
72. Jeong JH, Yu KS, Bak DH, Lee JH, Lee NS, Jeong YG, et al. "Intermittent fasting is neuroprotective in focal cerebral ischemia by minimizing autophagic flux disturbance and inhibiting apoptosis", *Exp Ther Med*, 2016, 12:3021-3028.
73. Fann DY, Santro T, Manzanero S, Widiapradja A, Cheng YL, Lee SY, et al. "Intermittent fasting attenuates inflammasome activity in ischemic stroke", *Exp Neurol*, 2014, 257:114-119.
74. Sohal RS, Forster MJ. "Caloric restriction and the aging process: a critique", *Free Radic Biol Med*, 2014, 73:366-382.
75. Gultekin F, Naziroglu M, Savas HB, Cig B. "Calorie restriction protects against apoptosis, mitochondrial oxidative stress and increased calcium signaling through inhibition of TRPV1 channel in the hippocampus and dorsal root ganglion of rats", *Metab Brain Dis*, 2018, 33:1761-1774.
76. Williams SM, Eleftheriadou A, Alam U, Cuthbertson DJ, Wilding JPH. "Cardiac Autonomic Neuropathy in Obesity, the Metabolic Syndrome and Prediabetes: A Narrative Review", *Diabetes Ther*, 2019, 10:1995-2021.

77. Blaszkiewicz M, Willows JW, Johnson CP, Townsend KL. "The Importance of Peripheral Nerves in Adipose Tissue for the Regulation of Energy Balance", *Biology-Basel*, 2019, 8.
78. Mattson MP. "Challenging oneself intermittently to improve health", *Dose Response*, 2014, 12:600-618.
79. Anson RM, Guo Z, de Cabo R, Iyun T, Rios M, Hagepanos A, et al. "Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100:6216-6220.
80. Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y. "In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker", *Mol Biol Cell*, 2004, 15:1101-1111.
81. Oshio LT, Andreazzi AE, Lopes JF, Sa JP, Bolotari M, Costa VMG, et al. "A paternal hypercaloric diet affects the metabolism and fertility of F1 and F2 Wistar rat generations", *J Dev Orig Health Dis*, 2020:1-11.
82. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. "The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway", *Nature*, 1997, 389:816-824.
83. Panchal SK, Bliss E, Brown L. "Capsaicin in Metabolic Syndrome", *Nutrients*, 2018, 10.
84. Fattori V, Hohmann MS, Rossaneis AC, Pinho-Ribeiro FA, Verri WA. "Capsaicin: Current Understanding of Its Mechanisms and Therapy of Pain and Other Pre-Clinical and Clinical Uses", *Molecules*, 2016, 21.
85. Basith S, Cui M, Hong S, Choi S. "Harnessing the Therapeutic Potential of Capsaicin and Its Analogues in Pain and Other Diseases", *Molecules*, 2016, 21.

86. Ahuja KD, Robertson IK, Geraghty DP, Ball MJ. "Effects of chili consumption on postprandial glucose, insulin, and energy metabolism", *Am J Clin Nutr*, 2006, 84:63-69.
87. Yuan LJ, Qin Y, Wang L, Zeng Y, Chang H, Wang J, et al. "Capsaicin-containing chili improved postprandial hyperglycemia, hyperinsulinemia, and fasting lipid disorders in women with gestational diabetes mellitus and lowered the incidence of large-for-gestational-age newborns", *Clin Nutr*, 2016, 35:388-393.
88. Chaiyasit K, Khovidhunkit W, Wittayaalertpanya S. "Pharmacokinetic and the effect of capsaicin in *Capsicum frutescens* on decreasing plasma glucose level", *J Med Assoc Thai*, 2009, 92:108-113.
89. Kang JH, Tsuyoshi G, Han IS, Kawada T, Kim YM, Yu R. "Dietary Capsaicin Reduces Obesity-induced Insulin Resistance and Hepatic Steatosis in Obese Mice Fed a High-fat Diet", *Obesity*, 2010, 18:780-787.
90. Lee JS, Kim SG, Kim HK, Baek SY, Kim CM. "Acute effects of capsaicin on proopiomelanocortin mRNA levels in the arcuate nucleus of Sprague-Dawley rats", *Psychiatry Investig*, 2012, 9:187-190.
91. Jeong JH, Lee DK, Liu SM, Chua SC, Schwartz GJ, Jo YH. "Activation of temperature-sensitive TRPV1-like receptors in ARC POMC neurons reduces food intake", *Plos Biol*, 2018, 16.
92. Wood JN, Winter J, James IF, Rang HP, Yeats J, Bevan S. "Capsaicin-induced ion fluxes in dorsal root ganglion cells in culture", *J Neurosci*, 1988, 8:3208-3220.
93. Oh U, Hwang SW, Kim D. "Capsaicin activates a nonselective cation channel in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurons", *J Neurosci*, 1996, 16:1659-1667.
94. Li J, Wang DH. "Function and regulation of the vanilloid receptor in rats fed a high salt diet", *J Hypertens*, 2003, 21:1525-1530.

95. Ma L, Zhong J, Zhao Z, Luo Z, Ma S, Sun J, et al. "Activation of TRPV1 reduces vascular lipid accumulation and attenuates atherosclerosis", *Cardiovasc Res*, 2011, 92:504-513.
96. Li BH, Yin YW, Liu Y, Pi Y, Guo L, Cao XJ, et al. "TRPV1 activation impedes foam cell formation by inducing autophagy in oxLDL-treated vascular smooth muscle cells", *Cell Death Dis*, 2014, 5:e1182.
97. Gotthardt JD, Bello NT. "Meal pattern alterations associated with intermittent fasting for weight loss are normalized after high-fat diet re-feeding", *Physiology & Behavior*, 2017, 174:49-56.
98. Thomas JA, 2nd, Antonelli JA, Lloyd JC, Masko EM, Poulton SH, Phillips TE, et al. "Effect of intermittent fasting on prostate cancer tumor growth in a mouse model", *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2010, 13:350-355.
99. Luszczki JJ, Florek-Luszczki M. "Synergistic interaction of pregabalin with the synthetic cannabinoid WIN 55,212-2 mesylate in the hot-plate test in mice: an isobolographic analysis", *Pharmacol Rep*, 2012, 64:723-732.
100. Zhang L, Johnson D, Johnson JA. "Deletion of Nrf2 impairs functional recovery, reduces clearance of myelin debris and decreases axonal remyelination after peripheral nerve injury", *Neurobiol Dis*, 2013, 54:329-338.
101. Bannon AW, Malmberg AB. "Models of nociception: hot-plate, tail-flick, and formalin tests in rodents", *Curr Protoc Neurosci*, 2007, Chapter 8:Unit 8 9.
102. Ladak A, Olson J, Tredget EE, Gordon T. "Differentiation of mesenchymal stem cells to support peripheral nerve regeneration in a rat model", *Exp Neurol*, 2011, 228:242-252.
103. Kalender AM, Dogan A, Bakan V, Yildiz H, Gokalp MA, Kalender M. "Effect of Zofenopril on regeneration of sciatic nerve crush injury in a rat model", *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj*, 2009, 4:6.

104. Navarro X. "Functional evaluation of peripheral nerve regeneration and target reinnervation in animal models: a critical overview", *Eur J Neurosci*, 2016, 43:271-286.
105. Ustun R, Oguz EK, Delilbasi C, Seker A, Taspinar F, Oncu MR, et al. "Neuromuscular degenerative effects of Ankaferd Blood Stopper((R)) in mouse sciatic nerve model", *Somatosens Mot Res*, 2017, 34:248-257.
106. Tuffaha SH, Budihardjo JD, Sarhane KA, Khusheim M, Song D, Broyles JM, et al. "Growth Hormone Therapy Accelerates Axonal Regeneration, Promotes Motor Reinnervation, and Reduces Muscle Atrophy following Peripheral Nerve Injury", *Plast Reconstr Surg*, 2016, 137:1771-1780.
107. Dun XP, Parkinson DB. "Visualizing peripheral nerve regeneration by whole mount staining", *Plos One*, 2015, 10:e0119168.
108. Ozturk G, Cengiz N, Erdogan E, Him A, Oguz EK, Yenidunya E, et al. "Two distinct types of dying back axonal degeneration in vitro", *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2013, 39:362-376.
109. Ustun R, Oguz EK, Seker A, Korkaya H. "Thymoquinone prevents cisplatin neurotoxicity in primary DRG neurons", *Neurotoxicology*, 2018, 69:68-76.
110. Ustun R, Oguz EK, Seker A, Korkaya H. "Thymoquinone protects DRG neurons from axotomy-induced cell death", *Neurol Res*, 2018, 40:930-937.
111. Del Rosario A, McDermott MM, Panee J. "Effects of a high-fat diet and bamboo extract supplement on anxiety- and depression-like neurobehaviours in mice", *Brit J Nutr*, 2012, 108:1143-1149.
112. Finger BC, Dinan TG, Cryan JF. "High-fat diet selectively protects against the effects of chronic social stress in the mouse", *Neuroscience*, 2011, 192:351-360.
113. Guimaraes ED, de Caires Junior LC, Musso CM, Macedo de Almeida M, Goncalves CF, Pettersen KG, et al. "Altered behavior of adult obese rats by monosodium l-glutamate neonatal treatment is related to hypercorticosteronemia

- and activation of hypothalamic ERK1 and ERK2”, *Nutr Neurosci*, 2017, 20:153-160.
114. Cheng A, Wan R, Yang JL, Kamimura N, Son TG, Ouyang X, et al. “Involvement of PGC-1alpha in the formation and maintenance of neuronal dendritic spines”, *Nat Commun*, 2012, 3:1250.
 115. Cheng A, Yang Y, Zhou Y, Maharana C, Lu D, Peng W, et al. “Mitochondrial SIRT3 Mediates Adaptive Responses of Neurons to Exercise and Metabolic and Excitatory Challenges”, *Cell Metab*, 2016, 23:128-142.
 116. Lee GD, Longo DL, Wang Y, Rifkind JM, Abdul-Raman L, Mamczarz JA, et al. “Transient improvement in cognitive function and synaptic plasticity in rats following cancer chemotherapy”, *Clin Cancer Res*, 2006, 12:198-205.
 117. Fontan-Lozano A, Saez-Cassanelli JL, Inda MC, de los Santos-Arteaga M, Sierra-Dominguez SA, Lopez-Lluch G, et al. “Caloric restriction increases learning consolidation and facilitates synaptic plasticity through mechanisms dependent on NR2B subunits of the NMDA receptor”, *J Neurosci*, 2007, 27:10185-10195.
 118. Singh R, Lakhanpal D, Kumar S, Sharma S, Kataria H, Kaur M, et al. “Late-onset intermittent fasting dietary restriction as a potential intervention to retard age-associated brain function impairments in male rats”, *Age (Dordr)*, 2012, 34:917-933.
 119. Longo VD, Panda S. “Fasting, Circadian Rhythms, and Time-Restricted Feeding in Healthy Lifespan”, *Cell Metab*, 2016, 23:1048-1059.
 120. Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'Alessio D, Tso P. “A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats”, *J Nutr*, 2003, 133:1081-1087.
 121. Ludy MJ, Moore GE, Mattes RD. “The effects of capsaicin and capsiate on energy balance: critical review and meta-analyses of studies in humans”, *Chem Senses*, 2012, 37:103-121.

122. Mattson MP, Longo VD, Harvie M. "Impact of intermittent fasting on health and disease processes", *Ageing Res Rev*, 2017, 39:46-58.
123. Davidson EP, Coppey LJ, Kardon RH, Yorek MA. "Differences and Similarities in Development of Corneal Nerve Damage and Peripheral Neuropathy and in Diet-Induced Obesity and Type 2 Diabetic Rats", *Invest Ophth Vis Sci*, 2014, 55:1222-1230.
124. Coppey LJ, Shevalye H, Obrosova A, Davidson EP, Yorek MA. "Determination of peripheral neuropathy in high-fat diet fed low-dose streptozotocin-treated female C57Bl/6J mice and Sprague-Dawley rats", *J Diabetes Investig*, 2018, 9:1033-1040.
125. Sequea DA, Sharma N, Arias EB, Cartee GD. "Calorie restriction enhances insulin-stimulated glucose uptake and Akt phosphorylation in both fast-twitch and slow-twitch skeletal muscle of 24-month-old rats", *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2012, 67:1279-1285.
126. Blazkiewicz M, Willows JW, Dubois AL, Waible S, DiBello K, Lyons LL, et al. "Neuropathy and neural plasticity in the subcutaneous white adipose depot", *Plos One*, 2019, 14.
127. Shin CY, Shin J, Kim BM, Wang MH, Jang JH, Surh YJ, et al. "Essential role of mitochondrial permeability transition in vanilloid receptor 1-dependent cell death of sensory neurons", *Mol Cell Neurosci*, 2003, 24:57-68.
128. Gibbons CH, Wang N, Freeman R. "Capsaicin induces degeneration of cutaneous autonomic nerve fibers", *Ann Neurol*, 2010, 68:888-898.