

**T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KONVANSİYONEL (ÜSTÜ AÇIK) VE BİREYSEL
HAVALANDIRMALI (IVC) KAFES SİSTEMLERİNDE
BARINDIRILAN FARELERİN, DAVRANIŞ, METABOLİK VE
AĞRILI UYARANLARA YANITLARININ KARŞILAŞTIRMALI
OLARAK İNCELENMESİ**

ASLI ÇELİK

ORCID: 0000-0002-2888-6080

LABORATUVAR HAYVANLARI BİLİMİ ANABİLİM DALI

Laboratuvar Hayvanları Bilimi Doktora Programı

DOKTORA TEZİ

İZMİR

EYLÜL 2021

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2012970153

**T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KONVANSİYONEL (ÜSTÜ AÇIK) VE BİREYSEL
HAVALANDIRMALI (IVC) KAFES SİSTEMLERİNDE
BARINDIRILAN FARELERİN, DAVRANIŞ, METABOLİK VE
AĞRILI UYARANLARA YANITLARININ KARŞILAŞTIRMALI
OLARAK İNCELENMESİ**

ASLI ÇELİK

ORCID: 0000-0002-2888-6080

LABORATUVAR HAYVANLARI BİLİMİ ANABİLİM DALI

Laboratuvar Hayvanları Bilimi Doktora Programı

DOKTORA TEZİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet Ensari GÜNELİ

ORCID: 0000-0002-0505-9824

Bu araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2019.KB.SAG.060 sayı ile desteklenmiştir.

**İZMİR
EYLÜL 2021**

TEZ KABUL ONAYI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı, Laboratuvar Hayvanları Bilimi Doktora Programı öğrencisi Aslı ÇELİK tarafından hazırlanan **‘Konvansiyonel (Üstü Açık) ve Bireysel Havalandırılmalı (IVC) Kafes Sistemlerinde Barındırılan Farelerin, Davranış, Metabolik ve Ağrılı Uyarılara Yanıtlarının Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi’** başlıklı tez çalışması 16/09/2021 günü 09:00-11:00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Mehmet Ensari GÜNELİ

Dokuz Eylül Üniversitesi, Laboratuvar Hayvanları Bilimi AD

Tezi onaylıyorum

ORCID ID numarası: 0000-0002-0505-9824

Üye: Prof. Dr. Osman YILMAZ

Dokuz Eylül Üniversitesi,
Laboratuvar Hayvanları Bilimi AD

Tezi onaylıyorum

ORCID ID: 0000-0001-7817-7576

Üye: Prof. Dr. Cem Şeref BEDİZ

Dokuz Eylül Üniversitesi
Fizyoloji AD

Tezi onaylıyorum

ORCID ID: 0000-0002-2491-4259

Üye: Prof. Dr. Muzaffer Aydın KETANİ

Dicle Üniversitesi
Histoloji Embriyoloji AD

Tezi onaylıyorum

ORCID ID: 0000-0002-1546-9747

Üye: Prof. Dr. Abdurrahman AKSOY

Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Farmakoloji ve Toksikoloji AD

Tezi onaylıyorum

ORCID ID: 0000-0001-9486-312X

Tez hakkında alınan jüri kararı Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
ETİK BEYANI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum **“Konvansiyonel (Üstü Açık) ve Bireysel Havalandırılmalı (IVC) Kafes Sistemlerinde Barındırılan Farelerin, Davranış, Metabolik ve Ağrılı Uyarılara Yanıtlarının Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi”** başlıklı Doktora tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışının olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Aslı Çelik

31.08.2021

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamın hipotezinden, bitirilme sürecine kadar her basamakta adım adım yanımda olan saygıdeğer tez danışmanım Prof. Dr. Mehmet Ensari GÜNELİ'ye, laboratuvar hayvanları biliminde akademik olarak yetişmemde, her daim, her konuda destek olan sayın hocam Prof. Dr. Osman YILMAZ'a, akademide disiplinli ve detaylı çalışmayı öğreten değerli hocam Prof. Dr. Meral KARAMAN'a hem deneysel çalışmalarımı yaparken yol göstericiliği, hem de dostluğu ile her zaman destek olan biricik arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi Meryem ÇALIŞIR'e, gerek davranış çalışmalarında, gerekse kişisel alanlarımda her zaman yanımda olan çalışma arkadaşım Öğr. Gör. Dr. H. Efsun KOLATAN'a, yoğun çalışmalarına rağmen her sorduğum soruyu cevaplayan, çözümsüz kaldığım yerlerde her zaman destek olan çok sevgili Öğr. Gör. Uzm. Dr. Sibel BÜYÜKÇOBAN'a, hayvanların bakımında, malzemeleri taşımamda desteklerini esirgemeyen uzun yıllardır birlikte çalıştığım Tevhide DEĞİRMENCİ ve Adem ULU'ya kısacası laboratuvar hayvanları bilimi ailesine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Davranış testlerinde nasıl çalışmamız gerektiği konusunda hem teorik hem de pratik konularda bilgilerini aktaran sayın Doç. Dr. Mehmet ATEŞ ve asistanı Dr. Başar KOÇ'a, biyokimyasal analizlerin yürütülmesinde detaylı olarak çalışmama katkıda bulunan saygıdeğer hocam Doç. Dr. Zahide ÇAVDAR'a ve canım arkadaşım Araş. Gör. Cemre URAL ÖZKAN'a, verilerin değerlendirilmesinde profesyonel olarak desteklerini esirgemeyen özverili değerli hocam Prof. Dr. Pembe KESKİNOĞLU'na, farelerin üretim sürecinde yem ve altlık stoklarımız bittiğinde katkı sağlayan Öğr. Gör. Dr. Umur KELEŞ'e saygıyla teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tezimle birlikte büyüttüğüm, hayatımın en kıymetlisi, bal oğlum Tuna DUBOVA'ya, varlıklarıyla, maddi ve manevi destekleri ile her daim yanımda olan canım ailem; annem Selma ÇELİK'e, babam Mehmet ÇELİK'e ve ablam Tuğçe NALBANT'a, destekleriyle her zaman yanımda olan oğlumun babası Emre DUBOVA'ya sevgilerimi ve şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

TABLolar DİZİNİ	i
ŞEKİLLER DİZİNİ	ii
GRAFİKLER DİZİNİ	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi	1
1.2. Araştırmanın Amacı	3
1.3. Araştırmanın Hipotezi	3
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Araştırmalarla İlgili Genel Bilgiler	4
2.2. <i>In Vivo</i> Çalışmalar	5
2.3. <i>In Vivo</i> Deneylerde Standardizasyon	6
2.4. <i>In Vivo</i> Araştırmalarda 3R Kuralı	11
2.5. Farelerin Genel Özellikleri	13
2.6. Farelerin Üretilmesi ve Yetiştirilmesi	15
2.7. Farelerin Barındırılma Koşulları	16
2.8. Farelerde Davranış	19
2.9. Stres ve Nöroendokrin Yolaklar	20
2.10. Stres ile Vücut Sıcaklığı ve Vücut Ağırlığı Değişimleri	22
2.11. Farelerde Strese Bağlı Gelişen Anksiyete ve Davranış Testleri	23
2.12. Ağrı ve Ağrı Deneyleri	27
3. ARAŞTIRMA GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. Araştırmanın Tipi	30
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	30
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi	30
3.4. Çalışma Materyali	31
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	33
3.6. Veri Toplama Araçları	33
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi	51
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	53
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	55
3.10. Etik Kurul Onayı	55
4. BULGULAR	56
4.1. Canlı Vücut Ağırlık Değişimleri	56
4.2. Vücut Sıcaklığı Değişimleri	59
4.3. Açık Alan Davranış Test (OFT) Sonuçları	61
4.4. Yükseltilmiş Artı Labirent Test (EPM) Sonuçları	64
4.5. Dışkılama Sayısı	67
4.6. Kuyruk Çekme Testi (<i>Tail-Flick Test</i>) Yanıtları	68

4.7. Sıcak Plaka Testi (<i>Hot-Plate Test</i>) Yanıtları	69
4.8. Adrenal Bez Ağırlığı Ölçümleri	70
4.9. Leptin, Ghrelin, ACTH ve KORT ELISA Analiz Sonuçları	73
5. TARTIŞMA	76
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	85
7. KAYNAKLAR	86
8. EKLER	98
EK 1: Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Onayı	98



TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1: Laboratuvar farelerinin barındırılmasında kullanılan kafes ebatları	18
Tablo 2: F2 farelerin üretilmesi ve deney kayıt tablosu	32
Tablo 3: Vücut ağırlığı ve vücut sıcaklığı ölçümlerinin kayıt tablosu	42
Tablo 4: <i>Tail-flick</i> yanıtlarının kayıt tablosu örneği	47
Tablo 5: <i>Hot-plate</i> yanıtlarının kayıt tablosu örneği	47
Tablo 6: <i>Naive</i> kontrol ve deney ve gruplarda test edilen parametrelerin karşılaştırma tablosu	56
Tablo 7: <i>Naive</i> kontrol ve deney grubundaki farelerin postnatal günlere göre vücut ağırlıkları	58
Tablo 8: <i>Naive</i> kontrol ve deney grubundaki farelerin postnatal günlere göre vücut sıcaklıkları	60
Tablo 9: Deney gruplarındaki farelerin OFT'deki davranış yanıtları	62
Tablo 10: Deney gruplarındaki farelerin EPM testindeki davranış yanıtları	65
Tablo 11: Deney gruplarındaki farelerin OFT ve EPM test alanlarındaki dışkılama sayısı	67
Tablo 12: Deney gruplarındaki farelerin kuyruk çekme (<i>tail-flick</i>) yanıtları	68
Tablo 13: Deney gruplarındaki farelerin <i>hot-plate</i> reaksiyon yanıtları	70
Tablo 14: <i>Naive</i> kontrol ve deney grubundaki farelerin adrenal bez ağırlıkları	72
Tablo 15: <i>Naive</i> kontrol ve deney grubundaki farelerin leptin, ghrelin, ACTH ve KORT ELISA analiz sonuçları	74

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1: Sağlık bilimlerinde araştırmaların sınıflandırılması	4
Şekil 2: <i>In vivo</i> hayvan araştırmalarının raporlanması (ARRIVE rehberi)	7
Şekil 3: Açık alan test düzeneği	25
Şekil 4: Yükseltilmiş artı labirent test düzeneği	26
Şekil 5: Hayvan sayısının belirlenmesinde kullanılan güç analizi test sonucu	31
Şekil 6: Grupların oluşturulma basamaklarının şematize edilmesi	35
Şekil 7: Deneysel çalışmanın zaman çizelgesi (55 gün)	37
Şekil 8: Kafes kimlik kartı	37
Şekil 9: Kafeslerin numaralandırma düzeni	38
Şekil 10: Konvansiyonel kafesler (OTC kafes sistemi)	39
Şekil 11: Bireysel havalandırılmalı kafesler (IVC kafes sistemi)	40
Şekil 12: Vücut sıcaklığı ölçümü	41
Şekil 13: Vücut ağırlığı ve vücut sıcaklığı ölçümlerinin yapılmasına ilişkin genel görünüm	41
Şekil 14: Farelerin davranış laboratuvarında testler öncesi adaptasyon Sürecini tamamlama alanı	42
Şekil 15: OFT alanı	43
Şekil 16: OFT iç (merkez) ve dış (kenar, köşe) alan tanımları	44
Şekil 17: 9x9 cm eşit alanlara bölünen OFT alanının iç ve dış bölgeleri	44
Şekil 18: OFT alanında serbest keşif yapan fare görünümü	44
Şekil 19: EPM test düzeneği	45
Şekil 20: EPM test alanı ölçüleri	46
Şekil 21: EPM alanının tanımlanması	46
Şekil 22: EPM alanında test edilen farenin görüntüsü	47
Şekil 23: Fare kuyruğunun kızılötesi ışın ile ısıya maruz bırakılması	48
Şekil 24: <i>Hot-plate</i> test- Sıcak plaka testi uygulaması	49
Şekil 25: <i>Vena cava caudalis</i> 'ten enjektör aracılığıyla kan alma	50
Şekil 26: Kan örneklerinin santrifüj edilmesi	50
Şekil 27: Adrenal bez ağırlıklarının hassas terazi ile ölçümü	51
Şekil 28: Sırasıyla leptin, ACTH, ghrelin ve KORT ELISA analizleri görseli	54

GRAFİKLER DİZİNİ

	Sayfa No
Grafik 1: OTC ve IVC'de barındırılan farelerin zamana bağlı postnatal vücut ağırlıklarının grafik ile gösterilmesi	58
Grafik 2: OTC ve IVC'de barındırılan farelerin zamana bağlı postnatal vücut sıcaklıklarının grafikle gösterilmesi	60
Grafik 3: Deney gruplarındaki farelerin OFT'deki davranış yanıtlarının grafik ile gösterilmesi	62
Grafik 4: Deney gruplarındaki farelerin EPM testindeki davranış yanıtlarının grafik ile gösterilmesi	66
Grafik 5: Deney gruplarındaki farelerin OFT ve EPM test alanlarındaki dışkılama sayısının grafikle gösterilmesi	68
Grafik 6: Deney gruplarındaki farelerin kuyruk çekme (<i>tail-flick</i>) yanıtlarının grafik ile gösterilmesi	69
Grafik 7: Deney gruplarındaki farelerin <i>hot-plate</i> reaksiyon yanıtlarının grafik ile gösterilmesi	70
Grafik 8: <i>Naive</i> kontrol ve deney grubundaki farelerin adrenal bez ağırlıklarının grafik ile gösterilmesi	72
Grafik 9: <i>Naive</i> kontrol ve deney grubundaki farelerin leptin, ghrelin, ACTH ve KORT ELISA analiz sonuçlarının grafikle gösterilmesi	75

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACTH	Adrenokortikotropik hormon
ARLAB	DEÜ Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı
CO ₂	Karbondioksit
DEÜ	Dokuz Eylül Üniversitesi
DEÜTF	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPM	Elevated plus maze-yükseltilmiş artı labirent testi
HEPA	High efficiency particulate arresting (yüksek etkinlikte partikül yakalayıcı)
HPA	Hypothalamic–pituitary–adrenal (hipotalamus-hipofiz-adrenal aks)
IASP	International Association for the Study of Pain
IVC	Individually ventilated cage (bireysel havalandırılmalı kafes)
KORT	Kortikosteron
m/s	metre/saniye
MSS	Merkezi sinir sistemi
OFT	Open field test- açık alan testi
OTC	Open top cage (konvansiyonel kafes)
P	Postnatal
SD	Standard deviation (standart sapma)
SPSS	Statistical package for the social sciences

KONVANSİYONEL (ÜSTÜ AÇIK) VE BİREYSEL HAVALANDIRMALI (IVC) KAFES SİSTEMLERİNDE BARINDIRILAN FARELERİN, DAVRANIŞ, METABOLİK VE AĞRILI UYARANLARA YANITLARININ KARŞILAŞTIRMALI OLARAK İNCELENMESİ

Doktora Tezi

Aslı Çelik

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı

ÖZET

Laboratuvar farelerinin barındırılması için türlerine özgü, refah koşullarını sağlayan farklı kafes sistemleri bulunmakta olup, yaygın olarak konvansiyonel (üstü açık - OTC) ve bireysel havalandırmalı (IVC) kafes sistemleri kullanılmaktadır. Hayvanların barındırılmasına bağlı olarak gelişebilecek stresin; davranış, metabolik ve ağırlı uyaranlara yanıtlarının değişkenlik gösterebileceğini düşünmekteyiz. Bu nedenle farklı kafeslerde barındırılan farelerde davranış, ağırlı yanıtlar, hormonal ve fizyolojik parametreleri karşılaştırmalı olarak incelenmesini amaçladık. Çalışmamızda toplam 48 adet F2 jenerasyon 8-10 haftalık erkek BALB/c albino fareler kullanıldı. OTC ve IVC kafes sistemlerinde barındırılan fareler, deney ve *naïve* kontrol grupları olarak toplam dört gruba ayrıldı. Deneysel süreç boyunca, tüm grupların vücut sıcaklığı ve vücut ağırlığı postnatal 63.- 105. günlerde ölçüldü. Deney gruplarına davranış analizleri için open field test ve elevated plus maze testleri ile ağırlı yanıtları araştırmak için hot-plate ve tail-flick termal nosiseptif testleri yapıldı. Bu testlerin sonunda genel anestezi altında sakrifiye edilen farelerden alınan kan ile plazmadan adrenokortikotropik hormon (ACTH), kortikosteron (KORT), ghrelin, leptin seviyeleri ELISA yöntemi ile değerlendirildi ve adren ağırlığı ölçüldü. Elde edilen veriler, Windows SPSS 24 istatistik programı kullanıldı ve karşılaştırmalar; t-testi, tek yönlü-ANOVA ve Mann Whitney U testi ile analiz edildi. IVC’de barındırılan farelerin vücut sıcaklığı, vücut ağırlığı, adrenal bez ağırlığı ve davranış testlerindeki stres seviyesi, OTC’de barındırılan farelere kıyasla yüksek bulundu. IVC grubundaki farelerde termal ağırlı uyaranlara yanıtlar, OTC gruptaki farelere kıyasla daha gecikmeli oldu. IVC deney ve naive kontrol gruplarındaki farelerin, OTC deney ve naive kontrol gruplarındaki farelere kıyasla plazma KORT, ACTH ve ghrelin seviyeleri yüksek, leptin seviyeleri düşük bulunmuştur. Bu araştırma verilerine göre, IVC kafeslerde barındırılan farelerin stres parametrelerinin yüksek olduğunu göstermekte olup, ağırlı yanıtlarda da değişim olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak deneysel çalışmalarda farklı yaşam alanlarının ve prosedürlerin farelerde yarattığı stresin çalışma sonuçlarını değiştirebileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Ağrı yanıtları, davranış testi, fare, bireysel havalandırmalı kafes (IVC), konvansiyonel kafes (OTC)

Tezin sayfa adedi: 121

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Ensari Güneli



**A COMPARATIVE STUDY OF THE RESPONSES TO BEHAVIORAL,
METABOLIC, AND PAINFUL STIMULI OF MICE HOUSED IN
CONVENTIONAL (OPEN-TOP) AND INDIVIDUALLY VENTILATED (IVC)
CAGE SYSTEMS**

PhD Thesis

Aşlı Çelik

**DOKUZ EYLÜL UNIVERSITY INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES
Department of Laboratory Animal Science**

ABSTRACT

Different cage systems provide species-specific, welfare conditions for the housing of laboratory rats, and conventional (open-top - OTC) and individually ventilated (IVC) cage systems are commonly used. Stress may develop due to the housing of animals; We think that responses to behavioral, metabolic, and painful stimuli may vary. For this reason, we aimed to comparatively examine behavior, painful responses, hormonal and physiological parameters in mice housed in different cages. A total of 48 F2 generation BALB/c albino 8-10 week old male mice were used in our study. Mice housed in OTC and IVC cage systems were divided into four groups as experimental and naive control groups. During the experimental period, the body temperature and body weight of all groups were measured on postnatal days 63-105. Open field tests and elevated plus maze tests were applied to the experimental groups for behavioral analysis, and hot-plate and tail-flick thermal nociceptive tests were performed to investigate painful responses. At the end of these tests, adrenocorticotrophic hormone (ACTH), corticosterone (CORT), ghrelin, leptin levels were evaluated by the ELISA method and adrenal weight was measured from blood and plasma taken from mice sacrificed under general anesthesia. Data obtained, Windows SPSS 24 statistical program was used and comparisons; Analyzed with t-test, one-way ANOVA and Mann Whitney U test. Mice housed in IVC had higher body temperature, body weight, adrenal gland weight, and stress level in behavioral tests compared to mice housed in OTC. Responses to thermal painful stimuli in mice in the IVC group were more delayed compared to mice in the OTC group. Compared to the mice in the IVC experimental and naive control groups, the plasma CORT, ACTH, and ghrelin levels were higher and leptin levels were lower than the mice in the OTC experimental and naive control groups. According to this research data, it shows that the stress parameters of mice housed in IVC cages are high and there is also a change in painful responses. As a result, it shows that the stress caused by the procedures and different habitats in the experimental studies can change the study results in mice.

Key Words: Behavioral testing, individually ventilated cage (IVC), mouse, convantional cage (OTC), pain responses

Page Number: 121

Advisor: Professor, Mehmet Ensari Güneli



1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Deneyisel araştırmalarda en çok kullanılan memeli sınıfı kemirgenler (rodentler) olup, en çok kullanılan türü ise farelerdir (*Mus musculus*). Fareler, memeliler sınıfında kısa ömürlü olmaları, kısa gebelik süresi, alt soylarının ve genetik çeşitliliğinin/modifikasyonlarının fazla olması, insana yakın benzerliklerinin (homoloji) olması ve kolay üretilip barındırılabilmeleri gibi birçok önemli özelliğı ile deneyisel *in vivo* araştırmalarında hayvan modeli olarak daha çok tercih edilmesini sağlamaktadır. Bu amaçla üretilen farelerin refahı hem hayvan için hem de deney sonuçlarına etkisi bakımından oldukça önemlidir (1,2).

Deney hayvanlarının refahı ile ilgili en önemli gelişmelerden birisi, 1959'da Russell ve Burch tarafından “3R” kuralı/terimi olarak ifade edilen *Replacement* (yerine koyma), *Reduction* (azaltma) ve *Refinement* (iyileştirme) kavramlarını geliştirmek olmuştur. 3R terimi: 1.*Replacement* (Yerine koyma); hayvan yerine hücre kültürü, bilgisayar modelleri, *in vitro* gibi alternatifleri tercih etmektir. 2.*Reduction* (Azaltma); bir çalışmada bilimsel ve istatistiksel standartlarla tutarlı minimum sayıda hayvan kullanılmasını ifade eder. 3.*Refinement* (İyileştirme); hayvan stresini, ağrılarını azaltmak ve hayvan refahını artırmak için barınma ve deneyisel prosedürleri iyileştirmeyi içeren yöntemleri ifade eder. Böylelikle laboratuvar hayvanlarında insancıl metotların gelişimi üzerine sistematik bir gelişim/iyileştirme süreci başlamıştır. Bu bilgiler ışığında, deneylerde kullanılmak üzere laboratuvar koşullarında üretilen hayvanların barındırılması, üçüncü R teriminde yani iyileştirme içerisinde önem kazanmıştır (3,4).

Laboratuvar hayvanlarının üretildiğı ve yetiştirildiğı çevre koşulları oldukça önemli olup, hayvan türlerine özgü refah koşullarını sağlayan özel kafes sistemlerinde barındırılır. Dünyada fare barındırılması için farklı kafes sistemleri bulunmakla birlikte, yaygın olarak konvansiyonel (üstü açık) - *open top cage*-OTC) ve bireysel havalandırılmalı- *individually ventilated cage* (IVC) kafes sistemleri kullanılmaktadır (3). OTC sisteminde mikroçevre (kafes-içi), makroçevrenin (kafes-dışı ortam)

şartlarına göre kafes üstündeki açık tel ızgaralar aracılığıyla belirlenir/ayrılır. IVC sistemde ise mikroçevre koşulları; ortam basıncı, bağıl nem, sıcaklık ve hava sirkülasyonu, hava besleme üniteleri (*blower*- kule, yatay, merkezi) ve HEPA filtreler aracılığıyla sağlanmaktadır. Her iki sistemin kendi içerisinde avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. IVC sisteminde nem oranı, karbondioksit (CO₂) miktarı, amonyak seviyesi, kafes değişim sıklığı, ortamdaki alerjenler azalırken, genel havalandırma ve diğer parametrelerle ilişkisi maliyetler azalırken, OTC sistemde bu durumun tam tersi gözlemlenmekte ve OTC sisteminin dezavantajı olarak belirtilmektedir. Aynı zamanda IVC sistemdeki bu bariyerler hayvanların patojenlere karşı korunmasını da sağlamakta ve genel havalandırma sayısı ve diğer parametrelerle ilişkili olarak da maliyetleri azaltmaktadır (5–7). Ancak OTC sisteminin bu dezavantajları yanında avantajları da bulunmaktadır. IVC sistemde hava yenilenmesine, soğuk hava akışı, kafesler arası gürültü, filtreleme sistemi nedeniyle oluşan titreşimler, kafes/ altlık değişim sıklığındaki azalmaya bağlı olarak insan-hayvan etkileşiminin azalması sonucu hayvanlarda stres gözlenirken, OTC sistemde bu olumsuz etkiler pek gözlenmemektedir (8–10).

Canlılar iç ve dış dengelerin sağlanması için çevresiyle etkileşim içerisinde (homeostasis). Homeostasisin sürdürülebilmesi için hayvanların barındırılmasında stres faktörlerinin en az seviyede tutulması gerekir. Stres faktörlerinin aktive olması ile merkezi sinir sistemi uyarılır, bazı organ ve sistemlerde değişimler ortaya çıkar. Değişimler otonom sinir sistemi ve endokrin sistem yoluyla perifer organlarda fizyolojik yanıtları oluşturur (11). Deney hayvanlarında barınma farklılıkları gibi birçok durum stres oluşturmaktadır. Strese bağlı olarak farelerde vücut ısısında ve ağırlığında artış (12), azalan leptin (13) ve artan ghrelin (14) gibi metabolik hormonlar, kortikosteron (KORT) gibi artan stres hormon belirteçleri düzeyleri (15) gözlenmektedir.

Barındırma farklılığı hayvanlarda davranış değişikliğine yol açmaktadır. Birçok çalışmada strese bağlı olarak hayvan davranış farklılıklarını analiz etmek amacıyla çeşitli testler kullanılmaktadır. Hayvan stresinin ölçülmesinde en sık kullanılan davranış testleri Yükseltmiş Artı Labirent Testi (*Elevated Plus Maze*, EPM) ve Açık Alan Testidir (*Open Field Test*, OFT) (16). Aynı zamanda memeli organizmasında

ağrı düzeyi birçok faktöre bağlı olarak değişmekle birlikte, çeşitli sebeplerle oluşacak stres faktörlerinden etkilenmektedir. Deneysel olarak oluşturulmuş stres modellemelerinde hot-plate ve tail-flick gibi ağrı eşiğini ölçen testlerde hayvanların ağrı eşiklerinde artışların olduğu izlenmiştir (17–19). Dolayısıyla yukarıda ifade ettiğimiz şekilde, barındırma gibi önemli faktörlerin hayvanlarda stres yaratabileceği, buna bağlı olarak da davranış ve ağrı testlerinde önemli bir faktör olabileceğini düşünüyoruz. Bu çalışmanın bu perspektifle incelenmesinin davranış ve ağrı çalışması yapacak araştırmacıların bu hususları göz önünde bulundurarak daha güvenilir veriler elde etmesi açısından önemli olacaktır.

Ülkemizde ve dünyada laboratuvar hayvanlarından kemirgenler (rodentler) standart hayvan kafeslerinde yetiştirilmektedir. Laboratuvarların düzeylerine ve ihtiyaçlarına göre olan bu standart kafesler, OTC ve IVC kafes sistemleri olarak karşımıza çıkmaktadır (20–22). Yukarıdaki bilgiler ışığında; bu iki farklı sistemin hayvanların davranış, metabolik ve ağrılı uyaranlara yanıtlarının değişkenlik gösterdiğini düşünmekteyiz. Bu sistemler arasındaki varyasyonu belirleyip, hayvan refahının iki sistemden hangisinde daha iyi olduğunu saptamak ve bu sayede hem hayvanların refahını, hem de araştırmaların sonuçlarının standardizasyonunu sağlamaktır.

1.2. Araştırmanın Amacı

Konvansiyonel (üstü açık) ve bireysel havalandırmalı (IVC) kafes sistemlerinde barındırılan farelerin, davranış, metabolik ve ağrılı uyaranlara yanıtlarının karşılaştırmalı olarak incelenmesini amaçladık.

1.3. Araştırmanın Hipotezi

Farklı kafes sistemlerinde barındırılan farelerin; davranışsal özellikleri, vücut ağırlıkları, hormonal aktiviteleri ve ağrı eşiği yanıtları farklıdır. IVC kafeslerde barındırılan fareler OTC’de barındırılanlara göre stres (davranışsal ve hormonal), ağırlık, ağrılı uyaranlara yanıtları artar.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Araştırmalarla İlgili Genel Bilgiler

Araştırma, yeni bilgiler ortaya koymak amacıyla bir konu hakkında detaylı çalışmaların bütünüdür (23). Biyomedikal araştırmalar, birincil ve ikincil araştırmalar olarak sınıflandırılır. Birincil araştırmalar; araştırma projelerini, ikincil araştırmalar; meta-analizleri ve derlemeleri (mevcut çalışmalarını gözden geçirme) kapsamaktadır. Ayrıca biyomedikal birincil araştırmalar çalışma türüne göre üç ana başlıkta incelenmektedir: Temel (deneysel), klinik ve epidemiyolojik araştırma (Şekil 1). Klinik ve epidemiyolojik çalışmalar, girişimsel/girişimsel olmayan olarak alt sınıflara ayrılır. Temel araştırmalar *in vivo* deneyler (hayvan deneyleri), *in vitro* (hücre çalışmaları gibi), biyokimyasal, genetik, fizyolojik araştırmaları, ilaç ve malzemelerin özelliklerine ilişkin araştırmaları içerir.

Biyomedikal Araştırmalar							
Birincil Araştırmalar						İkincil Araştırmalar	
Temel Araştırmalar		Klinik Araştırmalar		Epidemiyolojik Araştırmalar		Meta-analizler	Derlemeler
Teorik	Uygulamalı	Deneysel	Gözlemsel	Deneysel	Gözlemsel		
Metot Geliştirme (Fizik, Kimya, Biyoloji, Biyoinformatik, Biyometrik, Fizyoloji)	<i>In Vivo</i>	Klinik (Faz Çalışmaları)	Terapi	Müdahale	Kohort		
	<i>In Vitro</i>		Prognostik		Vaka Kontrol		
	Gen Mühendisliği		Tanı		Kesitsel		
	Biyokimya		Vaka Takdimi		Ekolojik		
	Materyal Geliştirme		İkincil Veri Analizi		İzleme, Gözetim		
	Genetik		İlaçlarla Gözlemsel		Kayıt Verileri		
			Olgu				

Şekil 1: Sağlık bilimlerinde araştırmaların sınıflandırılması (24).

2.2. *In Vivo* Deneyler

In vivo deneyler, canlı organizmalarda, genellikle hayvanlarda test edilen bir değişkenin biyolojik etkilerini incelemek için yapılan çalışmalardır (25). Doğadaki yaşamsal faaliyetlerin anlaşılması, biyolojik tepkilerin ölçülmesi gibi birçok nedenden dolayı hayvan modelleri eski çağlardan beri kullanılmaktadır. Zamanla bilimsel yöntem teknikleri gelişmesi ve artan literatür bilgisi ile hayvan modelleri daha bilinçli/sistematiik bir şekilde kullanılmaya başlandı. Yakın fizyolojik özellikler ve genler dolayısıyla, araştırmacıların *in vivo* çalışmalar açısından tercih nedeni omurgalı hayvanlar olmuştur (26). Davranış, aşı çalışmaları, organ nakilleri, ilaç geliştirme, kanser mekanizması ve tedavi yöntemleri, cerrahi teknikler gibi birçok alanda yapılan *in vivo* çalışmalar ile bilim ve tıp alanında gelişmeler hayvan kullanımının gerekliliğini ve önemini göstermektedir. Özellikle biyomedikal araştırmalarda, komplike bir sistemde, noninvaziv ve invaziv girişimlerin etkinliği incelenmesi bakımından alternatif yöntemler yerine, *in vivo* çalışmalar ön plana çıkmaktadır (3).

Avrupa Parlamentosu ve Konseyi 2010/63/EU bilimsel amaçlarla kullanılan hayvanların korunmasına ilişkin yönergesine göre laboratuvar hayvanları şu şekilde belirtilmiştir: Fare (*Mus musculus*), sıçan (*Rattus norvegicus*), kobay (*Cavia porcellus*), Suriye (altın) hamsteri (*Mesocricetus auratus*), Çin hamsteri (*Cricetulus griseus*), Moğol gerbili (*Meriones unguiculatus*), tavşan (*Oryctolagus cuniculus*), köpek (*Canis familiaris*), kedi (*Felis catus*), insan olmayan tüm primat türleri, kurbağa (*Xenopus (laevis, tropikalis)*), rana (*temporaria, pipiens*)) ve zebra balığı (*Danio rerio*)'dır (27). Bilimsel araştırmalarda kullanılan hayvanlar; az sayıda omurgasız, çoğunluğu omurgalı ve memeli laboratuvar hayvanlarıdır. Laboratuvar hayvanlarının %80'inden fazlasını kemirgenler oluşturmaktadır. Kemirgenlerden fareler ise kullanılma oranı olarak, %70'inden fazlasını oluşturmaktadır (28). Özellikle son yirmi yılda fare ile ilgili yapılan *in vivo* araştırmaların makalelerin sayısı 60.000'in üzerinde yer almaktadır. Fare dışındaki laboratuvar hayvanlarından, domuz ve zebra balığı gibi türler de çok kullanılmaktadır. Ayrıca bir zamanlar yaygın olarak kullanılan laboratuvar hayvanlarından kobay, tavşan ve yaban gelinciği gibi memelilerin gittikçe kullanım sayısı azalmıştır. Laboratuvarda kullanılan hayvan türlerindeki bu farklılaşmanın nedeni hem bazı hayvan modellerinin diğerlerine göre artan faydası,

hem de belirli bir bilimsel amacı gerçekleştirmek için mümkün olan en düşük seviyedeki omurgalıların kullanılması ile hayvan araştırmalarının iyileştirilmesini ortaya koymaktadır (29).

2.3. *In Vivo* Deneylerde Standardizasyon

In vivo deneylerin standardizasyonu; kullanılan hayvanların, çevresel ve prosedürlerin sabit tutulması veya kontrollü olarak yapılmasıdır. Standardizasyonun amacı, deneyler/prosedürler tekrarlandığında aynı veya benzer sonuçların elde edilmesini sağlamaktır. Standardize edilmiş *in vivo* çalışmalar, deney içi ve deneyler arası varyasyonu azaltacağı gibi, kullanılan hayvan sayısını da azaltmaya yaramaktadır. Deneysel hayvan araştırmalarının sonuçları raporlanırken; prosedürlerin yanı sıra, deney hayvanları ve çevresel faktörler de detaylı olarak belirtilir. Deney içi ve deneyler arası varyasyonların sebebi; hayvanların cinsiyet farklılıkları, farklı soy/altsoya sahip olması, genotipik farklılıklar, mikrobiyolojik standartlarının farklı olması, laboratuvar koşulları, barınma ve sosyal etkiler gibi özetlenebilir. *In vivo* çalışmalarda genotip ve çevresel faktörlerin arasındaki karmaşık etkileşimleri göz ardı etmeden, çalışmaların hipotezleri test edilir. Çalışmaların tekrarlanabilirliği ve sonuçların geçerliliği için, belirtilen parametrelerin tasarlanması ve tanımlanması yapılmaktadır (11,30).

Laboratuvar Faresinin Barındırılması ve Standardizasyondaki Önemi

Kemirgenlerin laboratuvar koşullarında barındırılabilmesi için, laboratuvarların kapasitesine, misyonuna, ekonomisine ve laboratuvarlarda barındırılan kemirgenlerin genetik/mikrobiyolojik konumlarına göre farklı kafes tipleri kullanılmaktadır (31). Açık kafes sistemleri (*open top cage*-OTC/konvansiyonel/üstü açık/statik), üstü filtreli kafes sistemleri (statik), üstü filtreli laminar akışlı kafes sistemleri, hava besleme ünitesine bağlı bireysel havalandırılmalı kafes sistemleri (*individually ventilated cages*-IVC), izolatöre bağlı çalışan kafes sistemleri (izolatör içerisinde açık kafes) gibi kafes/sistemler kemirgenlerin laboratuvarında barındırılmasında kullanılmaktadır (32). Barınma koşullarının kemirgenlerin davranışı ve fizyolojisi üzerinde farklı etkileri olduğu bilinmektedir (33). Son dönemlerde yeni kurulan laboratuvarlarda daha çok IVC kafesler tercih edilmektedir. IVC kafeslerde barındırılan hayvanların,

enfeksiyonun yayılmasını önlediği, kafes içindeki amonyak seviyesini ve alerjenleri azalttığı, bağışıklık ve sağlık konumlarını belli standartlarda tutmaya yaradığı, nitelikli havayı kafes içerisine sağladığı bilinmektedir (34–36). Aynı zamanda çalışanı ve de araştırmacıya da korumaktadır. IVC kafesleri üreten ticari firmalara göre kafes içerisindeki havalandırma yeri, havalandırma sayısı ve kafes içi basınçlarında farklılar olabilmektedir. IVC kafeslerdeki bu değişkenler nedeniyle, laboratuvar hayvanlarının genotiplerine ve cinsiyetlerine göre davranışsal ve fizyolojik farklı etkileri bulunmaktadır (9,34,37–40).

Laboratuvar hayvanlarının bakım ve barındırılmasındaki standardizasyonun önemi; çevresel faktörlerden kaynaklanabilecek etkiler ile deney sonuçlarındaki farklılıklarının önüne geçerek, nitelikli *in vivo* çalışmaların yapılmasını sağlamaktır (30,31,41). *In vivo* çalışmalarda standardizasyon için, hayvanlar çeşitli deney gruplarına randomize ayrılır ve randomizasyon yöntemi belirtilir. Ayrıca veriler randomize toplanır ve değerlendirilir veya dışlanma kriterleri ile raporlanır. Deneysel prosedürler kör çalışılarak yürütülür ve sonuçlar kör değerlendirilir. Örneklem büyüklüğü, çalışmanın başında deneysel tasarımda hesaplanarak, uygun istatistiksel yöntem kullanılarak belirtilir. Verilerin değerlendirilmesinde çalışmaya dahil edilecek veya çalışma dışı bırakılacak parametreler planlanarak çalışmaya başlanır. Çalışma esnasında çıkan sorunlar veya elde edilemeyen veriler raporlanır. Hayvan araştırmalarının standardize edilmesi tanımlanması amacıyla bir grup araştırmacı çalışmaların planlanması, raporlanması gibi konuları kapsayan rehber niteliğinde makale yayınlamışlar (*The ARRIVE guidelines (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments)*). Bu rehberin türkçeleştirilmiş içeriği tablo olarak Şekil 2’de gösterilmiştir (42–45).

BAŞLIK	1	Makalenin içeriğini özetleyen yalın bir dille tanım yapılır.
ÖZET	2	Literatürün sistematik özeti, kullanılan hayvanın türü/ alt türü ayrıntıları, temel yöntemler, temel bulgular ve çalışmanın sonuçları dahil olmak üzere araştırma hedefleri belirtilir.
GİRİŞ		

Literatür İçeriği	3	Çalışmanın nedenlerini anlamak, deneysel yaklaşımı açıklamak için yeterli bilimsel araştırmaların (önceki çalışmalara ilişkin referanslar) ortaya konulması. Kullanılan hayvan türlerinin/modelin bilimsel hedeflere nasıl ve neden hitap edebileceğini ve çalışmanın insan biyolojisi ile ilişkisinin açıklanması.
Amaç ve Hedefler	4	Çalışmanın birincil ve ikincil amaçlarını veya test edilen belirli hipotezleri açıkça tanımlanması.
YÖNTEMLER		
Etik Onay Belgeleri	5	Araştırmayı kapsayan etik izinleri, hayvanların bakımı ve kullanımına ilişkin ulusal veya kurumsal yönergelerin niteliğini belirtilir.
DeneySEL Tasarım	6	Her deney için, aşağıdakileri içeren deneysel tasarımının kısa ayrıntıları verilir: Deney ve kontrol gruplarının sayısı. Hayvanların randomizasyon prosedürü ve sonuçları değerlendirirken (kimin ve ne zaman kör olduğunun belirtilmesi) önyargıyı en aza indirmek için uygulanan prosedürler. Deney birimi (örn. tek bir hayvan, hayvan grubu veya kafesi). Bir zaman çizelgesi veya akış şeması ile çalışma tasarımlarının nasıl gerçekleştirildiğini göstermek gereklidir.
DeneySEL Prosedürler	7	Deney ve kontrol grupları için gerçekleştirilen tüm prosedürlerin ayrıntılarının belirtilmesi gerekir: Nasıl (ilaç formülasyonu ve dozu, uygulama yeri ve yolu, anestezi ve analjezi, cerrahi prosedür, ötenazi yöntemi). Kullanılan özel ekipmanların ve/veya ajanların tedarikçi ayrıntıları belirtilir. Ne zaman (gün/saat/dönem). Nerede (Kafes, laboratuvar).

		Neden (spesifik madde seçiminin gerekçesi, uygulama yolu, kullanılan ilaç dozu).
Laboratuvar Hayvanları	8	Tür, soy, alt soy (suş), cinsiyet, ortalama yaşı ve ortalama ağırlık detayları belirtilir. Hayvanların kaynağı, uluslararası suş terminolojisi, genetik modifikasyon durumu (nakavt veya transgenik gibi), genotip, sağlık/bağışıklık durumu, ilaç veya test <i>naive</i>, önceki prosedürler vb. gibi bilgiler belirtilir.
Bakım ve Barındırma Koşulları	9	Laboratuvar hayvanlarının barınma özellikleri (tesis tipi, spesifik patojen içermeyen [SPF]; kafes veya barınma tipi; altlık malzemesi; kafeslerdeki hayvan sayısı), Barınma koşulları (üreme programı, aydınlık/karanlık döngüsü, sıcaklık, yem türü, yem ve suya erişim, çevresel zenginleştirme), Deney öncesinde, sırasında veya sonrasında gerçekleştirilen refahla ilgili değerlendirmeler ve prosedürler detaylı olarak belirtilir.
Örnek Boyutu	10	Her deneyde kullanılan toplam hayvan sayısı (N) ve her deney grubundaki hayvan sayısı (n), Kullanılan herhangi bir örnek boyutu hesaplamasının ayrıntıları, Eğer varsa, her deneyin bağımsız tekrarlarının sayısını belirtilir.
Hayvanların Deney Gruplarına Atanması	11	Deney gruplarının randomizasyonu veya yapıldıysa eşleştirme nasıl yapıldığı bildirilir. Farklı deney gruplarındaki hayvanların tedavi edildiği ve değerlendirildiği sıra tanımlanır.
DeneySEL Sonuçlar	12	Değerlendirilen birincil ve ikincil deneySEL sonuçları açıkça tanımlanır.
İstatistiksel Yöntemler	13	Her analiz için kullanılan istatistiksel yöntemlerin ayrıntıları, Her veri için analiz birimi (tek hayvan, hayvan grubu vb.),

		Verilerin istatistiksel analiz varsayımlarını karşılayıp karşılamadığını değerlendirmek için kullanılan yöntemler belirtilir.
SONUÇLAR		
Kayıt edilen Veriler	14	Her deney grubu için, tedavi veya test öncesinde hayvanların ilgili özelliklerini ve sağlık durumu tablo halinde belirtilir.
Analiz Edilen Veriler	15	Analize dahil edilen her gruptaki hayvan sayısı bildirilir. Analize herhangi bir hayvan veya veri dahil edilmemişse nedeni yazılır.
Sonuçlar	16	Gerçekleştirilen her analiz için sonuçlar ayrı ayrı raporlanır. Standart hata, standart sapma veya güven aralığı detayları belirtilir.
Çalışma Sınırlılıkları	17	Her deney grubundaki tüm önemli olumsuz olguların ayrıntılarını verilir. Olumsuz olayları azaltmak için deneysel protokollerde yapılan değişiklikleri açıklanır.
TARTIŞMA		
Yorum/bilimsel çıkarımlar	18	Çalışmanın amaçları ve hipotezleri, literatürdeki diğer ilgili çalışmaları dikkate alarak, sonuçlar yorumlanır. Olası yanlılık kaynakları, hayvan modelinin herhangi bir sınırlaması ve sonuçlarla ilişkili belirsizlik varsa belirtilip, çalışma sınırlamaları hakkında yorum yapılır. Araştırmada hayvanların kullanımının değiştirilmesi, iyileştirilmesi veya azaltılması (3R'ler) için deneysel yöntemlerin veya bulguların sonuçları açıklanır.
Genellenebilirlik/ çeviri	19	Çalışmanın bulgularının, insan biyolojisi ile herhangi bir ilgisi de dahil olmak üzere, diğer türlere veya sistemlere çevrilmesinin uygun olup olmadığı ve nasıl olduğu hakkında yorum yapılır.

Finansman

20

Çalışmanın destek kaynakları (hibe numarası ile) ve destek verenin/verenlerin çalışmadaki rolleri belirtilerek, açıklanır.

Şekil 2: *In vivo* hayvan araştırmalarının raporlanması (ARRIVE rehberi) (45).

Deney sonuçlarına olan güven nitelikli *in vivo* çalışmalar ile artmaktadır. *In vivo* çalışmaların güvenilirliğinin artabilmesi için istatistiksel doğrulama gereksinimlerine ihtiyaç bulunmaktadır. İstatistiksel doğrulamada dört temel unsur bulunmaktadır. Bunlar: deneysel tasarım ve veri analiz yöntemi, hayvanların uygun şekilde randomizasyonu (rastgele), uygun istatistiksel güç ve örneklem büyüklüğü hesaplanması, test çalışmaları boyunca yeterli tekrarlanabilirlik sağlanmasıdır (46). *In vivo* çalışmalarda hayvan modelleri yapılırken, deneylerin tasarlanması, değerlendirme kriterleri, çalışma sonuçlarının yorumlanması ve raporlama teknikleri dikkatli bir şekilde yapılmalıdır. *In vivo* çalışmalarındaki deneysel tasarım ve bulguların doğru şekilde veri analizlerinin yapılmaması, çalışma sonuçları olumlu bilgilere dayansa da, klinik araştırmalara uyarlanması mümkün olmamaktadır. Eksik veya yanlış tanımlanmış deneysel tasarımlar, grup randomizasyonlarındaki hatalar, körleme çalışmamak, örneklem büyüklüklerinin yanlış hesaplanması gibi makro hatalar, verilerin analizlerinde yanlış sonuçlar çıkmasının yanı sıra, deney tekrarlanmasını da olanaksız kılar. Temel araştırmaların klinik araştırmalara uygulanması için *in vivo* çalışmaların deneysel tasarımdan itibaren sistematik olarak her basamakta standardizasyonun yapılması ile mümkündür (42,47,48).

2.4. *In Vivo* Hayvan Araştırmalarında 3R Kuralı ve Önemi

Hayvan refahı, hayvanların türlerine özgü temel sağlık ve fizyolojisini devam ettirebilmesi, türüne özgü yaşam koşullarında ve doğal davranışlar sergileyebildiği ortamda hayatını sürdürebilmesi gibi birçok bileşenden oluşan bütünsel bir kavramdır (49,50). Laboratuvar hayvanları kullanan kurumlardaki hayvanların refahı için yerel veya uluslararası mevzuatlar, rehberler ve akreditasyonlar eşliğinde hayvanların refahını kapsayan laboratuvar uygulamaları düzenlenmektedir. Hayvanların refahı ile ilgili bu kapsam içerisinde; laboratuvar hayvanlarının barındırıldığı ve çalışmaların yürütüldüğü laboratuvarların fiziki yapısı ve işleyiş şeklinin nasıl olması gerektiğini

belirten detayları içermektedir. Ayrıca sağlık profesyonellerinin (yönetici, veteriner hekim, teknisyen, tekniker, hayvan bakıcısı), araştırmacıların ve teknik personellerin laboratuvar hayvanları kullanım alanlarında hayvan refahı için bakım ve barındırma koşullarında prosedür öncesi/esnasında/sonrasındaki yaklaşım şekli ile bu laboratuvarlarda çalışmaları sürdüren bu kişilerin eğitim nitelikleri ile ilgili bilgiler bulunmaktadır (31,51–54).

Deneyisel araştırmalarda kullanılan hayvanların yerine alternatif yöntemlerin kullanılması, hayvan sayısının azaltılması ve refah seviyesinin artırılması ile ilgili Russell ve Burch 1959 yılında yayınladıkları “İnsani Deneyisel Tekniği İlkeleri (*The Principles of Humane Experimental Technique*)” kitabında detaylı olarak hayvan deneyleri ile ilgili “3R kuralı” ana temasını oluşturmuşlardır. 3R kuralı: 1. *Replacement* (yerine koyma), 2. *Reduction* (azaltma) ve 3. *Refinement* (iyileştirme)’dır. 3R kuralının amacı modern tıp hızla ilerlerken, uygulamalı bilimsel araştırmalarda kullanılan hayvanların mümkün olan en insani koşullar altında çalışmaların yapılmasının sağlanmasıdır (4).

3R kuralının birincisi *Replacement* (yerine koyma/yer değiştirme tekniği) terimi, deneyisel çalışmaların bilinçli omurgalı canlı hayvanlar yerine, duyarlı olmayacak materyal/canlı üzerinde bilimsel yöntemin gerçekleştirilmesi olarak ifade edilmiştir. Canlı hayvanlar yerine; tamamıyla yerine koyma ya da kısmi yerine koyma teknikleri kullanılabilir. Tamamıyla yerine koyma; hücre kültürü, gönüllü insanlar ile yapılan çalışmalar, matematiksel ve bilgisayar modellerinin kullanımı bu kategori içerisinde yer alan örneklerden bazılarıdır. Kısmi yer değiştirme ise, bilimsel hipoteze bağlı olarak, acı çekebilecekleri düşünölmeyen bazı hayvanların kullanımını içerir. Buna *Drosophila*, nematod solucanları ve sosyal amipler gibi omurgasızlar ve omurgalıların olgunlaşmamış formları dahildir. Kısmi değiştirme, yalnızca bu amaç için öldürölen hayvanlardan alınan birincil hücrelerin veya dokuların kullanımını da içerir (yani, acıya neden olan bilimsel bir prosedürde kullanılmamış). Kısacası *Replacement*, alternatif metotların kullanımıyla hayvan çalışmalarının sayısı azaltılmaktadır (55–59).

İkinci R kuralı, *Reduction* (azaltma) olarak belirtilmiştir (4). Azaltma, bilimsel amaçlarla tutarlı olarak deney veya çalışma başına kullanılan hayvan sayısını en aza

indiren yöntemleri ifade eder. Hayvanlarla yapılan çalışmaların, sağlam ve tekrarlanabilir bulgular sağlamak için uygun şekilde tasarlanması ve analiz edilmesi, azaltma için esastır. Araştırma grupları, kuruluşlar arasında veri ve kaynakların (örneğin hayvanlar, dokular ve ekipman) paylaşılması da azalmaya katkıda bulunabilir. Çok az hayvan kullanılırsa önemli biyolojik etkilerin gözden kaçabileceği göz önünde bulundurularak, çalışmanın bilimsel hedeflerine ulaşılmasıyla tutarlı olarak hayvan sayısı minimuma düşürülmelidir (48,59,60).

Üçüncü R kuralı ise, *Refinement* (iyileştirme)'tır (4). Biraz daha göreceli olabilen *Refinement* kavramı, temelinde hayvanlarda en az stres seviyesi oluşturulabilecek koşulların sağlanmasıdır. Bu koşulları sağlamak için deneysel çalışmalarda prosedürlere göre şiddet sınıflandırmaları ile desteklenerek çalışmalar planlanır. Çalışmalarda prosedür sayısını azaltmak, araştırma için ideal hayvan türü seçimini yapmak ve araştırma prosedürlerindeki şiddeti azaltacak düzenlemelerin yapılması *Refinement* kuralını destekler. Ayrıca hayvan bakımı, barındırılması, taşınması ve kullanımında iyileştirmeleri sağlayan bir dizi yöntemde bu kuralın içinde yer almaktadır. Araştırmaların hipotezlerinden uzaklaşmadan, sonuçlarda farklılık yaratmayacak şekilde planlanacak olan çalışmaların, hayvanlara en az düzeyde sıkıntı veya stres yaratabilecek koşulları sağlamak insani yönden önemlilik kazanmaktadır (57,59).

Klinik öncesi yapılan hayvan çalışmaları ve translasyonel tıpta hayvanların çalışmalara dahil edilmesinin gerekliliği 3R kuralının içerisinde değerlendirilerek yapılır. Bilimin ihtiyaçları ve hayvan refahı arasındaki dengenin sağlanması etik açıdan daha da önem kazandığı son yıllarda, 3R kuralı çerçevesinde hayvan kullanım gerekliliklerinin ve sonuçlarının bilime katkısı irdelenerek, hayvan çalışması yapılmaktadır. Araştırmacılar çalışmalarını yürütürken etik açıdan sorgulayarak, bilimsel araştırmalarda hayvan kullanımına yönelik tüm detayları düşünerek hareket etmekten kaçınmamalıdır (3,59,61,62).

2.5. Farelerin Genel Özellikleri

Fareler, hayvanlar aleminden, kemirgen sınıfından, *Myomorpha* takımında, *Muridae* alt familyasında yer almaktadır. *Mus* ailesinde yer alan laboratuvar fareleri,

ev faresi olarak bilinen, *Mus musculus* türüdür (3,11,63) . Laboratuvar farelerinin yetiştiriciliğinde, inbred, random bred, outbred, hibrit, rekombinant inbred, rekombinant konjenik, konjenik, yabani inbred ve mutant soylar (transgenik fareler gibi), genetik açıdan farklı standartlara sahip fareler üretilir. Araştırmalarda sıklıkla kullanılan fare soyları şu şekildedir;

- a) Dört jenerasyon yakın akraba ilişkisi olmayan çiftleştirme ile elde edilen outbred stoklar arasında Swiss Webster,
- b) CD-1 ve ICR fareler, yirmi jenerasyon kardeşkardeş çiftleşmesiyle elde edilen inbred soylardan C57BL, BALB/c ve C3H fare suşları,
- c) İki inbred soyun çaprazlanarak üretilen hibrit soylardan B6D2F1, CD2F1,
- d) Rastgele damızlık alınan F2 fare jenerasyonundan yirmi jenerasyon inbred yetiştiricilikle elde edilen rekombinant inbred soylara SWXJ9/BmJ fareler,
- e) Spontan veya manipulasyonla elde edilen (radyasyon, kimyasal gibi) mutant soylardan diyabetli, obez fareler örnek verilebilir (3,64).

Fare soyları biyomedikal araştırmaların farklı alanlarında kullanılmaktadır. Genetik çeşitlilik yanı sıra, yaşam ve gebelik sürelerinin kısa olması, anatomik ve fizyolojik açıdan detaylı olarak bilgi sahibi olunması, bakımlarının kolay, maliyetinin düşük olması ve soy takibinin kapsamlı bir şekilde yapılabilmesi gibi avantajları nedeniyle fareler araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Fareler, davranış, ilaç araştırmaları, aşı geliştirme, immünoloji, onkoloji, bulaşıcı hastalıklar, ürün güvenilirliği çalışmalarında yaygın olarak kullanılırlar (3,11).

Farelerin temel bazı biyolojik özellikleri; yetişkin vücut ağırlıkları 20-40 g, yaşam süreleri 1,5-3 yıl, vücut sıcaklıkları 36,5-38 °C, kalp atımları 325-780 atım/dakika, solunum sayısı 60-220 soluma/dakika, puberta yaşı 5-6 hafta, genellikle üretimde kullanılmaya başlama yaşı 8-10 hafta, östrüs döngüsü 4(2-9) gün, östrüs süresi 14 saat, gebelik süresi 19 (18-21) gün, bir batında doğan yavru sayısı 6-12 adet, sütten kesme ağırlığı 10 g, sütten kesme yaşı 21-28 gün, kromozom sayısı 40 kadardır (3,11).

2.6. Farelerin Üretilmesi ve Yetiştirilmesi

Dişi fareler mevsime bağlı olmayan poliöstrüs gösteren memeliler sınıfında yer almaktadır. Maksimum üretkenlik için üreme, hayvanlar cinsel olgunluğa eriştikten hemen sonra (6-8 hafta, 20-30 g) başlamalı ve dişinin üreme ömrü boyunca devam ettirilmelidir. Farelerin üretilmesinde monogami (bir erkek, bir dişi) ve poligami (bir erkek, çok dişi) çiftleştirme sistemleri kullanılmaktadır. Farelerin üretilmesinde monogami uygulaması çok sayıda yavruya ihtiyaç duyulmadığında, poligami ise üst düzeyde fare üretimi sağlamak için kullanılmaktadır (51).

Dişi fareler normal şartlarda 4-5 gün östrüs siklusu gösterirler. Östrüs siklusunda proöstrüs, östrüs, metöstrüs ve diöstrüs evreleri bulunmaktadır. Dişi fareler, erkek farelerden ayrı barındırılması ile haftalarca hiçbir aktivitenin gözlenmediği anöstrüs evrasini gösterirler. Östrüs ve ovulasyonun ender şekillendiği bu etkiye “Lee-Boot etkisi” denilmektedir. Bu etki altındaki dişi fare gruplarına erkek farelerin katılması ile östrüs senkronizasyonu başlar. Yeni bir östrüs döngüsünün başlaması ile “Whitten etkisi” olarak adlandırılan fenomen başlamış olur. Başarılı bir çiftleşme ile gebe kalan bir dişi fare, 4 gün içerisinde başka bir erkek ile çiftleşir veya feromon etkisine maruz kalırsa; embriyo implantasyonu ortadan kalkar ve gebelik oluşmaz. Bu etki de “Bruce etkisi” olarak bilinmektedir. Bu etkilerin nedeni, erkek farelerdeki feromonlar nedeniyle oluşmaktadır. Çiftleşmeden sonra 12-24 saat içerisinde dişi farede vajinal plak (tıkaç) gözlenmesi, başarılı bir çiftleşmenin gerçekleştiğini göstermektedir. Başarılı çiftleşme sonrası fare gebe kaldıysa vücut ağırlığı ve meme bezlerinin büyüklüğünde artış olur. Anne karnındaki yavrular gebeliğin ortalarında abdominal palpasyon ile palpe edilebilir (3,11,65–67).

Farelerde gebelik süresi 19-21 gündür. Başarılı olmayan çiftleşmeler, östrüs ve yumurtlamanın olmadığı 14 gün süren yalancı gebelikle sonuçlanır. Gebe annelerin yavrularına yuva yapabilmeleri ve termoregülasyonlarını sağlayabilmeleri için yuva materyali verilmelidir. Yavru sayıları ortalama 6-12 adet arasında değişiklik gösterir ve prematüre olarak doğarlar. Yavrulu annelerde kanibalizmi (kendi türünü yeme davranışı) önlemek için doğumdan sonra en az 2 gün farelere rahatsızlık verilmemelidir. Yaklaşık 10. gün fare yavruları ince tüylerle kaplıdır, kulakları açıktır ve 12. günde gözeleri açılmış olur. 2 haftalık fare yavruları katı yem ve su ile

beslenmeye başlar. Sütten kesme yaşı 21 gün olarak kabul edilse de süre 28 güne kadar uzayabilmektedir. Sütten kesilen fareler cinsiyetine göre ayrılarak, anneden ayrı bir kafese alınır. Sütten kesilen farelerin cinsiyet ayrımında anüs ile genital organ arasındaki mesafe kısa ise dişi, uzun ise erkektir. Üretimde kullanıma veya araştırmaya verilmek üzere hazır olan fareler sınıflandırılarak barındırılır (51,68,69).

2.7. Farelerin Barındırılma Koşulları

Farelerin bakım ve barındırılmasında kullanılan alanlar ve malzemelerde, farelerin fiziksel, fizyolojik ve davranışsal ihtiyaçları dikkate alınarak koşullar sağlanır. Ortam sıcaklığı, bağıl nem, havalandırma sayısı ve kalitesi, aydınlatma (ışık şiddeti, gündüz/gece uygulama saatleri), ses seviyesi, titreşimler, güvenlik, kafes zenginleştirme ürünleri, yem, altlık, su niteliği kafeslerin malzemesi, hayvan başına düşen alan gibi parametreler farelerin laboratuvarında barındırılma koşullarını oluşturur (31,70).

Hayvanların sirkadiyen ritimleri, barındırılacakları makroçevre ve mikroçevre sıcaklık ile nispi nem oranı hayvanların türlerine özgü uyum sağladıkları değerler içerisinde olması hayvan refahı açısından önemlidir. Fareler için için makroçevre özellikleri şu şekildedir: aydınlatma süresi 12/12, 14/10 gündüz/gece (saat) periyodu, ışık şiddeti 60-400 lüks, ses düzeyi yaklaşık 50 dB, sıcaklık 20-26 °C ve rölatif nem %50 ±10 arasındadır. Mikroçevreyi kapsayan kafes, kafes teli, kafes zenginleştirme ekipmanları, altlık materyali, yem ve su gibi farelerin birebir temasta olduğu ürünler standart olmalıdır. Mikroçevre koşullarının standartlarının bozulmaması için günlük olarak yem (4-8 g) ve su (5-8 mL) ihtiyaçları kontrol edilir, altlık malzemesi ise en az 14 günde bir değiştirilir. Deney sonuçlarının sağlıklı olabilmesi için, standart bakım ve barındırma koşullarının laboratuvar hayvanlarında uygulanması esastır (31,71).

Farelerin barındırıldığı odalarda kafeslerin konulduğu raklar (raflar), kafesler ve kafes aksesuarları bulunmaktadır. Kafesler polikarbonat, polipropilen, fiberglas ürünlerden elde edilmiş dayanıklı, sağlam otoklavlanabilir olabileceği gibi, polisitren gibi dayanıksız plastiklerden üretilmiş kafesler de olmaktadır. Kafes kapakları, temizliğinin kolay olması ve paslanmayı önlemek için paslanmaz çelikten kafes telleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Kafesler fareleri kuru ve temiz tutmalı, ideal ortam

sıcaklığı sağlamalı, davranışlarını normal sergileyebilmeli, yem ve suya rahat erişim sağlanmalıdır. Mikroizolasyon (MI) kafesi, kafesi üzerinde iç filtreli plastik bir üst kullanan kafes sisteminin geliştirilmiş halidir. MI kafesler ortamının daha fazla kontrol edilmesini sağlayarak, hayvanı herhangi bir ajan kontaminasyonundan korur. MI kafesleri statik (hava besleme ünitesi kullanmadan/hava olmadan) veya hava besleme ünitesi desteği ile havalandırılmalı kafesler olarak kullanılabilir. IVC kafesler insanların alerjen maruziyetini azaltması ve fareleri mikrobiyolojik ajanlardan koruması gibi avantajları nedeniyle daha son dönemlerde çok tercih edilmektedir. Solunum yoluyla bulaşma riski olan ölümcül enfeksiyona neden olabilecek biyolojik ajanlarla enfekte fareler ya da daha yüksek korunması gereken immünsüpresif fareler için yarı sert veya esnek plastik yapıdaki izolatörlerde barındırılır. İzolatör, pozitif basınç altında tutulan şeffaf, plastik malzemeden yapılmış bir odadır. Araştırmacı/personel, steril bir ortam sağlamak için izolatörün uzantısı olarak kollu eldivenler aracılığıyla izolatörün içinde çalışır (3,31,67,70).

Farelerin barınmasında primer ihtiyaç olan ürün kafeslerdir. OTC kafesler polikarbonat yapıda ve üstü açık, tel ızgara kapaklı kafeslerdir ve makroçevre havalandırması 8-20 değişim/saat olarak sağlanmaktadır (71,72). Teknolojik gelişmelerle ve farklı ihtiyaçlara cevap verebilmesi açısından IVC sistemleri fare barındırılmasında kullanım alanına girmiştir. IVC sistem fareler için koruma sağlarken, sürekli hava değişimi ile statik MI kafeslerinde sıklıkla bulunan amonyak ve karbondioksit seviyelerini azaltır. Bu yeni sistemler mikroçevre havalandırmasını sağlayabildiklerinden, hayvan odalarındaki alerjen ve koku seviyesini önemli ölçüde azaltmaktadır. Bu sayede kafes altlık değişim süresini uzatmasına imkan sağlamaktadır (3,71,73).

IVC sistemlerde mikroçevreye aktarılan hava hızı ve değişim süreleri kafes üreticilerine göre değişmektedir. IVC sistemlerde 50 - 120 saat/değişim tipleri bulunmaktadır. Bu aralıktaki hava değişiminin sağlanması için, kafes içine havanın nispeten yüksek bir hızda hava verilmesi gerekir. Kafes tasarımlarına göre hayvanın bulunduğu konuma göre-kafese gelen hava hızı 0,2 metre/saniye (m/s)'den az veya 1,0 m/s'den fazla olabilir. Kafes içi 0,5 m/s'ye kadar fizyolojik değişim gözlenmemektedir. Hava değişim miktarı ve hızı arttıkça, hayvanlarda fizyolojik

değişim gözlenmektedir (74,75). IVC sistemlerin hayvanlarda yarattığı bu fizyolojik değişimlerin yanı sıra, strese bağlı davranış değişiklikleri eşlik edebilir. Bunun sonucunda deneysel verilerin güvenilirliği ve kıyaslanmaları deneylerde kullanılan kafes sistemleri göz önüne alınarak gerçekleştirilmelidir. Özellikle IVC sistemler arasındaki varyasyonun araştırmalarda detaylı olarak belirtilmesi gerekir. Bu varyasyonların hayvan davranışı ve araştırma verileri üzerinde farklı etkileri olabileceği dikkate alınmalıdır (37).

Kafeslerdeki fare sayısı, vücut ağırlıkları gözetilerek fare başına düşen alan hesaplanarak, aşırı kalabalık olmayacak şekilde barındırılır. Sosyal davranış sergileyen fareler, üretim veya kullanım özelliklerine göre gruplar halinde barındırılır. Bu gruplandırmalar yapılırken farelerin barındırıldığı kafeslerin ebatları önemli rol oynamaktadır. Kafes ebatları laboratuvar farelerinin refahı gözetilerek belirlenen kafes standartlarında olmaktadır (Tablo 1) (27,31,53) .

Tablo 1: Laboratuvar farelerinin barındırılmasında kullanılan kafes ebatları (27).

	Canlı ağırlık (g)	Minimum bölme büyüklüğü (cm ²)	Hayvan başına taban alanı (cm ²)	Minimum bölme yüksekliği (cm)
Prosedürler	20'ye kadar	330	60	12
sırasında veya	20 ile 25	330	70	12
dışında	25 ile 30 arasında	330	80	12
	30'un üzerinde	330	100	12
Damızlık		330		12
		bir monogam çift (soyıcı/soyadı) veya trio (soyıcı) için. Her ilave dişi artı aynı batında doğan yavrular için 18 cm ² eklenecektir.		
Üreticilerdeki stok (*)	20'den az	950	40	12
Bölme büyüklüğü 950 cm ²				
Bölme büyüklüğü 1500 cm ²	20'den az	1500	30	12

(*) Sütten kesilme sonrasında fareler hayvanların yeterli zenginleştirme imkanlarına sahip daha geniş bölmelerde barındırılması şarttır. Fakat hayvanlarda saldırganlık, hastalık ve ölüm oranlarında artış, stereotip ve diğer davranış bozuklukları, kilo kaybı veya diğer fizyolojik ve davranış stresi tepkileri gibi barınak şartlarının hayvanların refahında kötüleşmeye yol açmaması koşuluyla, sütten kesim sonrası prosedüre verilene kadar kısa bir süre için bu yüksek stoklama yoğunluklarında tutulabilir.

Farelerin dinlendiği, idrar ve gaitalarının emilimini sağlayan kafes zemininde kafes altlıkları bulunur. Kafes altlıkları genellikle talaş, mısır koçanı, kağıt parçaları gibi materyallerden yapılır. Altlıklarda mikrobiyolojik veya kimyasal kontaminasyon olmamasına dikkat edilmesi, hijyenik olması gerekmektedir. Düzenli olarak altlık materyallerinin değişimi yapılır. Özellikle damızlık olarak yetiştirilen dişi farelerde yuva yapmaları için ek materyaller kafes içerisine konulur. Ayrıca yuva materyalleri yenidoğan fare yavrularının termoregülasyonunu da sağlamaya yardımcı olur (11,31,67).

Kafes, kafes teli, altlık, yem, su gibi farelerin temel ihtiyaçlarını karşılayan, fareler üzerinde primer etkili olan mikroçevre koşullarından, kafes içi zenginleştirme malzemelerinin de kullanılması, farelerin sinir sistemi gelişimlerini ve öğrenmelerini olumlu yönde etkiler. Kafes zenginleştirme malzemeleri kağıt, karton, tahta, polikarbon plastik materyallerden olabilmektedir. Kafeslerde, kafes içi zenginleştirme kullanılan fare gruplarında stres seviyelerinin daha düşük olması, araştırma sonuçlarının daha benzer olması ve bu sayede 3R ilkesindeki hayvan sayısını azaltma *Reduction* ilkesini sağlar (11,76–78).

2.8. Farelerde Davranış

Fareler duyu organlarının (koku, işitme, dokunma, görme gibi) sinyalleri aracılığıyla iletişim kurabilen, sosyal hayvanlardır. Doğada üreme kabiliyeti yüksek olan fareler, hiyerarşinin de önemli olduğu gruplar halinde yaşarlar. Bu gruplar yakın akrabalı çiftleşme ile kendi grupları içerisinde yaşamlarına devam eder, farklı gruplar arası değişim çok gözlenmemektedir. Gece aktif olan farelerin, doğal yaşam koşullarında çevre ile uyumları yüksektir. Yaşadıkları alanda oyuk açma, yuva yapma davranışları gösterirler. Farelerin doğal davranışları arasında feromonların etkisi yüksektir. Ani davranışsal tepkilere yol açabilecek feromonların olması yanı sıra, uzun sürede endokrin sistemlerini etkileyebilecek feromonlarda olmaktadır. Feromonların

etkisi genel olarak ebeveyn-yavru tanınmanın yanı sıra, bireysel veya grupların kimliğini ileten sinyallerin sağlamasını yapmaktadır. Fare feromonları, idrarla, plantar, tükürük, gözyaşı, prepusyal ve meme bezleriyle atılır.

Farenin davranış biyolojisi oldukça karmaşıktır ve genetik, fizyolojik, sosyal ve çevresel değişkenlere bağlıdır. Bunların tümü laboratuvar farelerinin en iyi nasıl yönetilebileceğini etkilemektedir. Farelerin normal davranışları laboratuvar koşullarında tam olarak sağlanamasa da, yuva yapma, oyuk açma, yiyecek arama ve koku alma ortamları gibi temel ihtiyaçları bu parametreler göz önünde bulundurularak sağlanmalıdır (51).

Her canlı kendi türüne özgü fizyolojik standartlarını ortam koşullarında belli bir süre sabit tutmaktadır. Bu biyolojik temel mekanizmanın adı homeostazistir. Hayvanlar homeostazisini stabil tutamadığı durumlarda stres ortaya çıkar. Homeostazisi etkileyen koşullardan bir tanesi çevresel faktörlerdir. Çevresel faktörlerin değişkenlikleri, hayvanlardaki fizyolojik dengelerde farklı varyasyonlara neden olmaktadır (11).

Kemirgenler, geniş bir çevre sıcaklıkları aralığında sabit bir vücut sıcaklığını korumak için beyindeki hormonal aktivite ile vücuttaki termoregülasyonu sağlamaya çalışmaktadır. Farelerin sıcaklık homeostazisini sağlaması için yaşam alanının (makroçevre), yaşam alanı içinin (mikroçevre) koşulları standart olmalı ve stresin etkisi termoregülasyona bağlı sıcaklık değişimlerine neden olacağı için, en az seviyede stres faktörleri olmalıdır (12,79).

2.9. Stres ve Nöroendokrin Yolaklar

Canlılardaki homeostasisin düzenlenmesinde nöroendokrin kol olan, fizyolojik yanıtları etkileyen, merkezi kısımları beyin sapı ve hipotalamusta yer alan hipotalamo-hipofiz-adrenal aks/eksen (*hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA axis*)'dir. Nosiseptif ağrı ve stresle ilişkili çalışmalarda HPA aksı aktivitesinde değişimler gözlenmektedir (80). Stresle birlikte HPA aks değişimlerine bağlı hipotalamusta bulunan paraventriküler çekirdeğinden nörohormonlar uyarılır. Bu uyarıma bağlı kortikotropik hücreleri üzerindeki spesifik reseptörlerle etkileşimi, adrenokortikotropik hormonun

(ACTH) salgılanmasını tetikleyerek fizyolojik yanıt oluşur. Bunun yanı sıra HPA aksın diğer üyelerinden, doğal yolla oluşan glukokortikoidler de aracı metabolizmanın düzenlenmesi, fizyolojik yanıt oluşumunda önemli rol oynar (81). Bu hormon glukokortikoid hormonların salınımını başlatmak için, adrenal korteks üzerinde hareket eder. Dolaşıma geçen glukokortikoidler depolanan enerjinin mobilizasyonunu başlatır ve çok sayıda sempatik sistem aracılı etkiyi güçlendirir (82,83). Dolaşımdaki ACTH, steroid hormonu olan insanlarda kortizol, farelerde KORT sentezini ve adrenal bezden salgılanmasını uyarır. KORT strese karşı davranışsal ve fizyolojik yanıtları aktive eder (84). Yükselen steroid hormonlarının etkisiyle negatif etki başlar, kortikotropin salgılatıcı hormon ve ACTH'ın daha fazla salınmasını engeller. Bu tepki ile HPA ekseninin homeostazisi sağlandığı düşünülmektedir (85,86).

Laboratuvarda yetiştirilen hayvanların refahı için, stres seviyesi en az düzeyde tutulmalıdır (50). Stres, bağışıklığı etkilediği gibi, üreme ve davranış üzerine de olumsuz etkileri de olduğu bilinmektedir (87). Stresli hayvanlarda adrenal fonksiyonun düzenlenmesinde HPA eksenin önemli bir rolü vardır. Stresli hayvanlarda endokrin yanıtlar oluşmaktadır. Strese maruz bırakılan hayvanlarda adrenal hipertrofi 48 saat sonra gözlemlenmektedir (88). Adrenal aktivitenin artmasıyla, glukokortikoidlerin konsantrasyonlarında değişiklikler de gözlenir. Strese bağlı bu değişimler, çeşitli vücut sıvıları ve dışkı örnekleri ile ölçülebilmektedir (89). Farelerin idrar ve dışkıları aracılığıyla atılan başlıca glukokortikoid KORT aracılığı ile ölçülür (90). KORT seviyesi stresle birlikte yükselirken, adrenal bez ağırlığı da artabilmektedir (91). Dışkıda bulunan KORT miktarları cinsiyete göre farklılık göstermekle birlikte, zaman dilimleri açısından cinsiyete göre değişiklik bulunmamaktadır (92). Özellikle dişi fareler strese maruz kaldıklarında, HPA eksen aktivitesinde önemli değişiklikler oluşurken, erkek farelerde bu aktivite az olmasına karşın, davranış testleri ile yüksek anksiyeteleri olduğu gösterilmiştir (93).

Stresle beraber, fizyolojik cevabın oluştuğu metabolik diğer aktivite değişimleri leptin ve ghrelin seviyelerinde olduğu belirtilmiştir. Leptin, az miktarda mideden ve esas olarak yağ dokusundan salgılanan, vücutta tokluk sinyalleri sağlayan bir proteindir. Leptinin hipotalamusta ve vücutta iki farklı reseptör tipi bulunmaktadır. Bu durum hem merkezi, hem de periferde etkinliğinin farklı olduğunu göstermektedir

(94). Girişimsel cerrahilerden sonra kortizol seviyesi artarken, leptin seviyesinin azaldığı gözlemlenmektedir. Glukokortikoidlerin leptin sekresyonunu uyarması ile stresle leptin seviyesini arttırdığı düşünülse de, HPA eksenini ile leptin seviyesi arasındaki ilişki tam olarak tanımlanamamıştır. Strese bağlı farklı proteinlerin de salgılanmasında değişiklik olduğu düşünülmektedir. Leptin seviyesi, stresin yoğunluğu ve maruz kalma süresine göre değişkenlik göstermektedir. Uzun süreli strese maruz kalma sırasında leptinde azalma olmaktadır. Leptin seviyesi stresin süresi ve yoğunluğuna göre artıp, azalabilmektedir. Leptinin, strese yanıt mekanizması halen tam olarak anlaşılamamıştır (95–97).

Ghrelin, sıçan midesinden izole edilmiş, büyüme hormonunun düzenleyicisi ve 28 aminoasitlik peptittir (98). Mideden salgılanan peptit hormonu ghrelin, kemirgenlerde beslenmeyi ve kalori durumunu düzenleyen hipotalamik merkezlerin sinyalleşmesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (99) (100). Kemirgenlerde açlık ile ghrelin hormonu seviyesi artar, gıda alımı ile azalmaktadır (101). Açlık hormonu olarak anılan ghrelin, strese bağlı seviyesinde değişiklik göstermektedir. Akut ve kronik stres ile ilgili yapılan deneysel hayvan modellerinde ghrelin hormonunun arttığı bildirilmiştir (102) (103). Ghrelin'in hipotalamustaki etkisi, leptinin tam tersidir (104). Holubova ve ark'nın 2016 yılında yaptıkları deneysel maternal stres çalışmasında, strese maruz kalan sıçanlarda leptin seviyesinde anlamlı bir azalma gösterilirken, ghrelin seviyelerinde anlamlı olmasa da belirgin bir artma izlenmiştir (105).

2.10. Stres ile Vücut Sıcaklığı ve Vücut Ağırlığı Değişimleri

Enerji homeostazının düzenlenmesinde hipotalamus görev almaktadır. İştah ve kilo artması/azalması gibi yolları aktive eden nöroendokrin yolların yanıtları da hipotalamusta gerçekleşir (106). Hipotalamusta nöropeptit etkileşimleri ile bilinen ghrelin ve leptin hormonlarının nöroendokrin fonksiyon kontrollerine katılarak besin alımı ve vücut ağırlığı değişimlerinde rol oynamaktadır (101) (107) (108). Strese bağlı olarak gıda alımı ile ilgili olan hormonlardan ghrelin ve leptin seviyesi, strese maruz bırakılan hayvanlarda akut stres döneminde azalmakta, kronik stres döneminde ise artmaktadır. Ayrıca stresli hayvanlarda, stresin göstergesi olarak kullanılan

kortikosteroid seviyesi yüksek olmakla birlikte, vücut ağırlığında azalma gözlemlenmektedir (109).

Hayvanlarda strese maruz kalma durumunda vücut sıcaklığı değişimleri de gözlemlenmektedir. Stresin seviyesine göre vücut sıcaklığında artış (hipertermi) durumu ile karşılaşılır. Kafes kapağının açılması, tutma, enjeksiyon gibi basit manipülasyonlar ile hayvanlarda 37-39 °C'ye ulaşan hipertermi oluşmaktadır. Deneysel stres modellerinde de hipertermi gerçekleştiği bilinmektedir (110) (111).

Laboratuvar hayvanlarının barınma koşulları laboratuvarların işleyişine göre, laboratuvar içindeki aktiviteye göre değişkenlik göstermektedir. Uluslararası ve ulusal laboratuvar hayvanları merkezlerinde benzer/farklı barınma koşulları mevcuttur. Geçmişte OTC kafes sistemleri barınma ekipmanları daha çok kullanılırken, günümüzde IVC kafes sistemleri ve ekipmanları tercih edilmektedir. Bu iki farklı bakım ve barındırma koşullarında hayvanlarda farklı stres seviyesi olduğu belirtilmiştir (7) (21). Dolayısıyla barınma koşullarına bağlı olarak gelişebilecek stresin, leptin ve ghrelin düzeylerinde değişime sebebiyet vereceğini düşünmekteyiz. Bununla ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

2.11. Farelerde Strese Bağlı Gelişen Anksiyeteyi Değerlendirmede Kullanılan Davranış Testleri

Stresin, anksiyete (kaygı) ile ilgili davranışları etkilediği sonuçları anlamak ve anksiyete bozukluklarında tedavilerin bulunması amacıyla anksiyolitik ilaç araştırmaları için deneysel hayvan çalışmalarında, davranış testleri ve hayvan modelleri kullanılmaktadır (112). Anksiyete modelleri; yeni çevre, ödül-ceza yöntemi ve ceza uygulamaları olarak 3 ana başlıkta incelenmektedir.

Yeni çevre nedeniyle anksiyete oluşturulması ve değerlendirilmesinde kullanılan testler:

- Yükseltilmiş Artı Labirent Testi (*Elevated Plus Maze Test-EPM*)
- Yükseltilmiş T-labirent (*Elevated T-maze*) Testi
- Açık Alan Testi (*Open Field Test-OFT*)
- Merdiven Testi (*Staircase Test*)

- Sosyal İzolasyon Testi (*Social Isolation Test*)
- Yeni Çevrenin Beslenmeyi Baskılaması (*Novelty Supressed Feeding*)
- Sosyal Etkileşim Testi (*Social Interaction Test*)
- Delikli Kutu Testi (*Holeboard Test*)
- Yabancı Kokuya Maruz Bırakma (*Predatory Odor*)

Ödül-ceza yöntemi ile anksiyete oluşturulması ve değerlendirilmesinde kullanılan testler:

- Şartlı Zıtlasma Testi (*Operant Conflict Test*)

Ceza uygulamaları yöntemi ile anksiyete oluşturulması ve değerlendirilmesinde kullanılan testler:

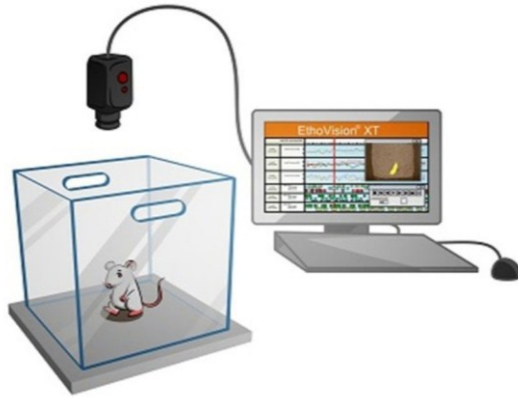
- Savunmaya Yönelik Gömme Testi (*Defensive Burying Test*)
- Pasif sakınma Testi (*Passive Avoidance Test*)
- Ayak Şoku Testi (*Foot Shock Test*)
- Sıcak Plaka Testi (*Hot Plate Test*)
- Dört Tabaka Testi (*Four Plate Test*) deneysel araştırmanın kriterlerine göre anksiyete testleri yapılmaktadır (113).

Çalışmamızda hayvanlarda barındırmaya bağlı, hayvanlardaki davranış paternlerini değerlendirmek amacıyla OFT ve EPM testleri yapılmıştır.

Açık Alan Testi (Open Field Test, OFT)

Açık alan testi, hayvanların psikomotor bütünlüğü gösteren lokomotor aktivitesinin ve anksiyete seviyesinin ölçüldüğü test düzeneğidir. Hayvanların açık alandaki keşiflerindeki hareketleri gözlemlenir (114). Rodentlere ilişkin ilk açık alan testi, Hall CS tarafından 1934 yılında sıçanlarda yapılmıştır. Duygusal açıdan yoğun duygu durumu yaşayan sıçanlar daha çok dışkılama ve idrara çıkma davranışı gösterirken, daha az duygusal olan sıçanlar en az sayıda ya da hiç dışkılamama ve idrara çıkamama davranışı göstermişlerdir. Bu deneysel araştırma ile bireysel farklılıkların geçerli olduğunu göstermişlerdir (115).

İlk araştırmalar sıçanlar üzerinde yapılmasına rağmen, bu test fareler üzerinde de yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Farelerde açık alan testi, lokomotor aktivitenin niceliğini ve niteliğinin ölçülebildiği davranış testidir. Farelerdeki açık alan testi; bir dizi davranışlarının ölçümlerinin yapıldığı, muhafazalı dikdörtgen, kare, daire şeklindeki açık alanda farelerin gözlemlendiği ve davranış verilerinin elde edildiği test alanıdır. Farelerin açık bir alanda davranışlarını sergilemesi için, çalışmaların tasarımına göre değişen 25 - 250 cm² ebatlarındaki açık alanda, başlangıçta açık merkez alanına bırakılan farenin 2-10 dakika zaman aralığında fare davranışları gözlemlenmesi gerekir. Açık alan test zemin alanının boyutlarındaki farklılıklar, test alanının renk farklılıkları (siyah, beyaz, saydam), yaş gibi özellikleri veri sonuçlarında fark yaratmazken, duvar yüksekliği, cinsiyet, 300 lüks üzerindeki ışık şiddetinin sonuçlarda farklılık gösterdiği bilinmektedir (16). Eskiden açık alan testinde yapılan testlerden elde edilen veriler manuel olarak kayıt altına alınmaktaydı (115). Günümüzde ise teknolojik açıdan araştırmacıya kolaylık sağlayan video kameralı altyapı sistemleri ve yazılımları mevcuttur (Şekil 3) (116,117). Bu yeni yazılımlar ve video kayıtları sayesinde hayvanların davranışlarını, anksiyete düzeylerini, hareket süresi ve mesafesi, tigmotaksisi (dikey yüzeylere yakın kalma eğilimi), dışkı miktarı (anksiyetede bir ölçü) gibi aktivite seviyeleri ölçülmektedir (9,118).

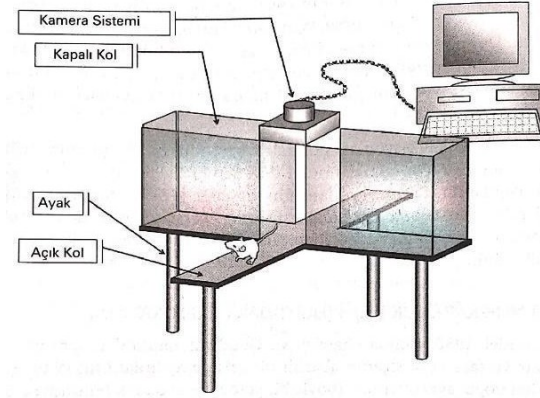


Şekil 3: Açık alan test düzeneği ³³

Yükseltilmiş Artı Labirent Testi (Elevated Plus Maze, EPM)

Yükseltilmiş artı labirent testi, kemirgenlerde anksiyete ile ilişkili yaygın olarak kullanılan bir davranış analiz test düzeneğidir. Nörolojik ve psikiyatrik hastalıkların hayvan modelleri konusundaki araştırmalarda değerlendirme aracı olarak yükseltilmiş artı labirent testi yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bu testin maliyetinin düşük, uygulaması kolay ve geçerli sonuçlar elde edilebilmesi bakımından geçmişten günümüze çok fazla tercih edilen bir test düzeneğidir (16).

Bu testle ilgili ilk çalışmalar Montgomery ve Monkman tarafından 1955 yılında Y şeklindeki test alanında sıçanların keşif ve korku davranışları incelenmiştir (119). 1985 yılında Pellow S ve arkadaşları tarafından sıçanlarda davranışsal, fizyolojik ve farmakolojik yönden doğrulanmış iki açık kol ve iki kapalı koldan oluşan yükseltilmiş bir labirent tanımlanmıştır (120). İlerleyen süreçte farelerde ilk araştırma ise 1987’de Lister RG tarafından swiss albino suşu erkek farelerde gerçekleştirilmiştir (121). Bilişsel fonksiyonların ölçülmesinde kullanılan bu test, hayvanların detaylı hareketlerinin incelenmesi için günümüz teknolojisinde düzeneğin üzerine yerleştirilen kamera aracılığı ile davranış takibi yapılmaktadır (Şekil 4) (122,123).



Şekil 4: Yükseltilmiş artı labirent test düzeneği (122)

Kemirgenler, yükseltilmiş artı labirentin dört kolunun kesişme noktası olan merkeze yerleştirilir ve davranışları 5 dakika süreyle kaydedilir (123). Farelerde anksiyete düzeyi, farelerin kapalı ve açık kollara girişlerin sayısı ve açık kollardaki

alandan geçirilen zamanın uzunluğu ile ifade edilir (16,124). Hayvanlar genellikle kapalı kollarda vakit geçirmeyi tercih ederler. Özellikle ansiyolitik ajan kullanılan hayvanlarda, anksiyete seviyesi düşük olduğu için açık kollarda daha çok bulunurken, anksiyete seviyesi yüksek olanlar daha çok kapalı kolları tercih etmektedir (113,125).

Yükseltilmiş artı labirent testinde genel olarak değerlendirilen parametreler şu şekilde analiz edilmektedir:

Açık kol frekansı: dört patinin tamamı ile açık, açık kollara fare giriş sıklığı, kapalı kol frekansı: dört patinin tümü ile kapalı, kapalı kollara fare giriş sıklığı, merkez alan frekansı: dört patinin tümü ile merkezi platforma fare giriş sıklığı, açık kollarda bulunma süresi, kapalı kollarda geçirdiği toplam süre, farenin merkezi platformda geçirdiği toplam süre (124).

2.12. Ağrı ve Ağrı Deneyleri

Uluslararası ağrı araştırmaları derneği (*International Association for the Study of Pain=IASP*) 1979’da ağrıyı “kişinin bedensel ya da varoluşsal bütünlüğüne yönelik tehdidi ifade eden karşılıklı olarak kabul edilebilir bedensel bir deneyimdir” olarak tanımlamıştır. IASP 2018’de “fili veya potansiyel doku hasarı ile ilişkili algısal ve duygusal rahatsızlık veren duygu durumudur” tanımıyla ekleme yapmıştır (126).

Ağrı mekanizmasında periferal olarak, nosiseptif adı verilen duyu organlarında nosiseptif (ağrıya bağlı) sinyaller üretilir. Ciltte miyelinli A δ (delta) lifleri (iletim hızı: 4-30 m/s) veya miyelinsiz C-lifleri (iletim hızı: 0.4-2m/s) iki çeşit afferent lifin varlığı, kısa kutanöz nosiseptif uyarıların neden çift ağrı hissi üretebildiğini açıklamaktadır (merkezi sinir sistemi -MSS’e doğru bilgi taşıma). Ağrı genellikle otonomik cevaplarının aktivasyonunda anlaşılmaktadır. Bu anlamda ağrı, stresi göstermektedir. Ağrının yaratmış olduğu strese bağlı sempatik sinir sisteminin artan aktivitesinin neden olduğu viseral reaksiyonlar, kalp atış hızı, kan basıncı, solunum tipi, gözbebeği boyutu, terleme ya da mide-bağırsak motilitesinde değişikliklere neden olabilir. Ağrının ve stresin yarattığı etkiyi ölçülebilir olarak gösterebilmek için, plazma ACTH, kortikosteroidler ve katekolaminler gibi biyokimyasal işaretler de kullanılır (127–130).

Ağrının Sınıflandırılması

1. Başlama süresine göre, 2. mekanizmalarına göre, 3.kaynaklandığı bölgeye göre ağrı sınıflaması (131).

Hayvanlarda, kimyasal ağrı, mekanik ağrı (*von frey* testi, kuyruk sıkıştırma, *paw withdrawal*- patinin geri çekilmesi ile yapılan çalışma), elektrik şoku ile zararlı uyarılara verilen tepkiyi ölçme, termal ağrı testleri, ağrı endeksini ölçmek için; *hot plate*, *tail flick* (özellikle analjezik aktivite test edilmesinde) nosiseptif testler kullanılmaktadır (18,80,132).

Ağrı testlerinde en fazla kullanılan hayvanlar fare ve sıçanlardır. Analjezi ölçümünde kullanılan rodent modelleri için uygulanan testler termal, elektrik, kimyasal veya mekanik uyarıcılar ile yapılır (122,132). Nosiseptif testler dışarıdan verilen termal bir uyarana bağlı yanıtın ölçülmesi amacıyla yapılır. Bu yanıt verme hayvanlardaki ağrı eşiğine göre değişkenlik göstermektedir. Ağrı eşiğinin ölçümlerinde hayvanların refahı göz önünde tutularak, yanıt verme gecikmesi olması durumunda “*cut-off*” sınırlaması her bir farklı test için bulunmaktadır (133). Bu motor tepkiler spinal reflekslerden, davranış yanıtlarında değişikliklere kadar değişen nöral temelli tepkilerdir (134) .

Tail-Flick Test- Kuyruk Çekme Testi

D’Amour ve Smith 1941 yılında fare ve sıçanların kuyruklarına uyguladığı ısı uyararı prosedürü ile kuyruğun tepkisini ölçerek literatüre ilk katkıyı sağlamışlardır (135). Kuyruk çekme testi, ağrı eşiği değerlendirilmesinde kullanılan akut nosiseptif testlerden biridir. Su banyosunda kuyruğun tutulması veya kızıl ötesi ışın veren bir cihaz aracılığıyla kuyruk çekme süresi kayıt altına alınarak yapılan bir testtir (136,137). Her iki testte de hayvanların sabitlenmesi/tutulmaları dezavantaj gibi olsa da, kısa süreli bir prosedür olması avantaj sağlamaktadır (138).

Hot-Plate Test- Sıcak Plaka Testi

Sıcak plaka testi ağrı duyarlılığını değerlendirmek için kullanılan termal nosiseptif bir testtir. Hayvanlar zemini 50-56 °C’de sıcak plakaya sahip, pleksiglas

silindiri ile sınırlandırılmış bir alanda kısa süreli olarak tutulur. Arka pati yalama ve / veya çekme veya zıplama süresi ya *cut off* gecikme zamanı kaydedilir. Termal uyarana verdikleri ağrı yanıtından hemen sonra alandan uzaklaştırılır. Sıcak plaka testi akut, termal duyarlılığı değerlendirmenin hızlı yapıldığı ve nispeten ekonomik bir testtir. Sıcak plaka testi hayvanların test alanını öğrenme ihtimalinden dolayı tekrarlanan ölçümlere karşı oldukça hassastır (133,139). Öğrenilen davranışsal tepkiden dolayı, tekrarlanan ölçümlerde reaksiyon sürelerinin azaldığı göz önünde tutulur (138). Hayvanların ekstremit ve kuyruğunun aynı anda uyarılması ile reaksiyon değişimleri gözlenen bu testte, farelerde, sıçanlara göre daha belirleyici davranışsal yanıtlar olmuştur (134). Albino sıçanlardaki bu on iki farklı karmaşık davranışlar, 1993 yılında Espejo EF ve Mir D tarafından belirlenerek, tanımlanmıştır (140).

Nosiseptif testlerden ilk geliştirilen *tail-flick* test spinal bir refleks yanıtları olarak belirleyici bir testtir. Daha sonradan keşfedilen *hot-plate* test ise seçme eylemine bağlı daha yüksek yapılara entegrasyon ile cevap verdiğini göstermektedir (141).

3. ARAŞTIRMA GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırma deneysel niteliktedir.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırmanın hayvan deneyleri iş paketi Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (DEÜTF) Multidisiplin Laboratuvarı Deney Hayvanları Birimi'nde Aralık 2019-Ağustos 2020 arasında yapılmıştır. Biyokimyasal analizlerin gerçekleştirilmesi DEÜTF Araştırma Laboratuvarı (ARLAB)'da Eylül-Kasım 2020 tarihlerinde gerçekleştirilmiştir.

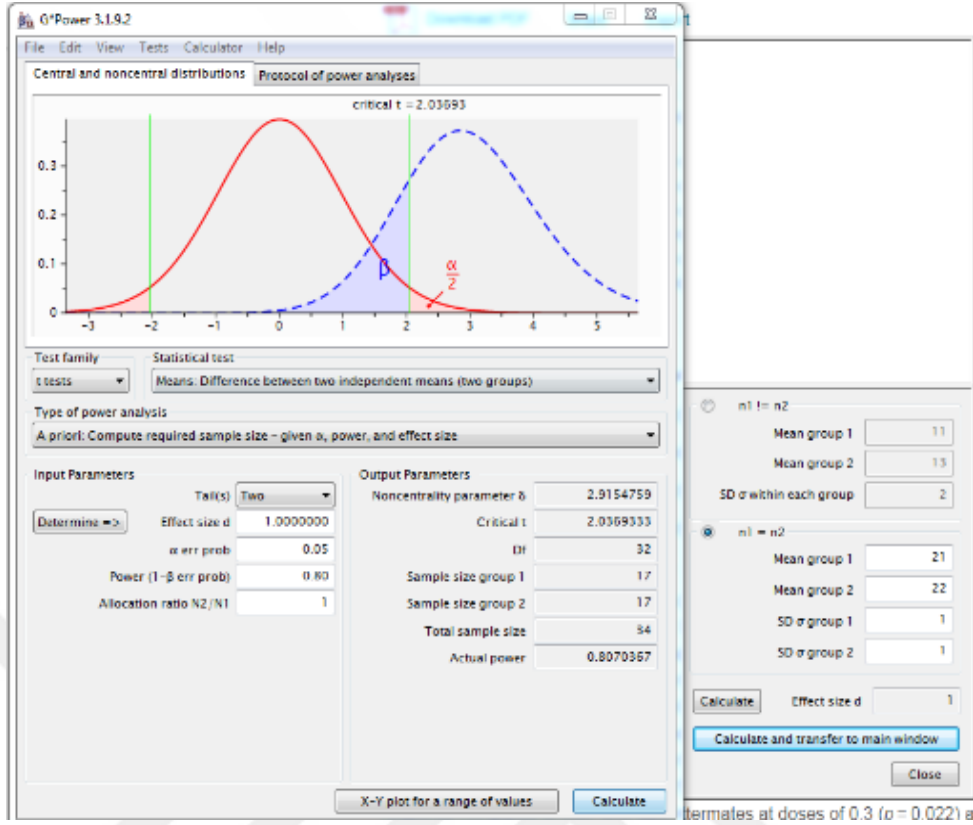
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Bu çalışma deneysel hayvan çalışmasıdır. Çalışmada toplam 48 adet F2 jenerasyon 8-10 haftalık BALB/c albino erkek fareler kullanılmıştır.

Hayvan Sayısının Belirlenmesi

Güç Analizi (power analysis)

Hayvan sayısının belirlenmesi için güç analiz testi (G*Power 3.1.9.2.) kullanıldı. Bu analiz için gerekli olan ortalama ve standart sapma (SD) gibi parametreler temel olarak Kostomitsopoulos ve arkadaşlarının 2011'de yaptığı çalışmadan elde edildi. (142). Hayvan sayısı test grupları için 17 adet olacak şekilde belirlendi (n=17). Ancak kafesteki hayvan sayılarının eşit olabilmesi için her kafeste dört hayvan olacak şekilde barındırılacağı için toplam 16 olarak belirlendi. Böylelikle kafeslerdeki farklı hayvan sayısına bağlı hiyerarşik düzen standardize edilerek ekstra olumsuz faktörlerin önüne geçilmiş oldu. Analiz sonucu aşağıdaki gibidir (Şekil 5).



Şekil 5: Hayvan sayısının belirlenmesinde kullanılan güç analizi test sonucu. (G*Power 3.1.9.2.)

3.4. Çalışma Materyali

OTC stok kafes sisteminde barındırılan yaklaşık 90 günlük fareler (postnatal, P) dişi ve erkek olarak ayrı kafeslere alındı (F0). Daha sonra bu fareler; bir dişi bir erkek (monogami) olacak şekilde katım kafeslerine alınarak hayvanlar çiftleştirildi ve birinci jenerasyon yavrular elde edildi (F1). Çiftleşme sonrası erkekler kafeslerinden alınarak gebe kalan annelerin yaklaşık 21 ± 1 gebelik süreçleri takip edildi. Doğum sonrası P30 günlük emzirme dönemini geçiren yavrular IVC ve OTC kafeslere alınarak, erkek ve dişi kafesler şeklinde tasnif edildi. Yaklaşık P90 günlük olduklarında tekrar katım kafeslerine alınarak monogami çiftleştirilme ile ikinci jenerasyon fareler elde edildi (F2). Böylelikle F2 jenerasyon ile anne karnından-deneysel prosedürlerin sonuna kadar OTC ve IVC kafeslerde barınmaları, sistem koşullarına adaptasyonları sağlanmış oldu. F2 jenerasyonda bulunan tüm farelerin cinsiyet ayrımı yapılarak yalnızca erkek fareler tüm deneysel prosedürler için kullanıldı. Jenerasyon akışı Şekil 6'da şematize edilmiştir.

Deneysel prosedürler için F2 jenerasyon erkek fareler P63 günlük olduğunda, çalışma başlangıcı olarak kabul edildi (yaklaşık 8-10 haftalık). Her bir fare için F0'dan F2'ye kadar olan üretim ve deney süreci titizlikle takip edildi, veriler kayıt altına alındı (Tablo 2). Deney (OTC ve IVC) ve *naive* kontrol (OTC ve IVC hiç dokunulmamış) gruplar randomize olarak belirlendi.

Tablo 2: F2 farelerin üretilmesi ve deney kayıt tablosu

Üretim Şekli (OTC veya IVC)	
Damızlık: Dişi x Erkek kimlik no	F0 ve F1 jenerasyon veri kayıtları
Anne doğum tarihi	
Anne vücut ağırlığı ölçümü	
Yavru doğum tarihi	
Yavru sayısı ve cinsiyetleri	
Yavru vücut ağırlığı ölçümü	
1. Kafes no, kafeslenme tarihi	
2. Kafes no, kafeslenme tarihi	
Çiftleşme başlangıç tarihi- bitiş tarihi	
F2 jenerasyon erkek fare kimlik no	F2 jenerasyon veri kayıtları
P0 Doğum tarihi	
P30 Sütten kesme tarihi	
Vücut ağırlığı ölçümü: P30 (Sütten kesme), P58, P66, P76, P86, P103,	
Vücut sıcaklığı ölçümü: P58, P66, P76, P86	
P70 Kafes içi kuyruk işaretleme	
Davranış testleri: P70 OFT, P77 EPM (test adı, saati, dışkı sayısı)	
Ağrı Testleri: P84 tail-flick, P85 hot-plate	
P105 Sakrifikasyon, örnek alma (kan, adren, beyin), adren bezi ıslak doku ağırlığı	

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bağımsız değişken: Kafes sistemleri (OTC ve IVC),

Bağımlı değişken: Davranış, vücut ağırlığı, vücut sıcaklığı, hormonal aktivite (leptin, ghrelin, ACTH ve KORT), adren ağırlığı, ağrı eşiği düzeyi.

3.6. Veri Toplama Araçları

Hayvanlar Temini ve Barındırma Koşulları

Çalışmamızda toplam 48 adet F2 jenerasyon 8-10 haftalık BALB/c albino erkek fareler kullanıldı. DEÜTF Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan etik onay alındı. Fareler Multidisiplin Laboratuvarı Deney Hayvanları Birimi'nden temin edildi.

Farelerin barındırıldığı oda ve laboratuvar koşulları; 24 ± 2 °C oda sıcaklığı, % 50 ± 10 bağıl nem, 12:12-saat gece-gündüz döngüsü (otomatik aydınlatma 07.00 - 19.00 gündüz), gece görüşünü desteklemek için kırmızı ışık, gündüz ışık yoğunluğu en fazla 200 lüks, havalandırma 10 değişim/saat, ses seviyesi en fazla 75 dB (3,71).

Laboratuvar trafiği dikkate alınarak, OTC ve IVC gruplar için giriş çıkışları kontrollü ayrı odalar kullanıldı. Bir araştırmacı ve bir hayvan bakıcısı dışında oda ile fiziki temasa izin verilmedi. Odanın makroçevre koşulları (sıcaklık, nem, ses, ışık şiddeti) ile ilgili bilgiler hergün düzenli olarak kontrol edildi ve kayıt altına alındı.

Tüm gruplara eşit koşulların sağlanabilmesi için kafes içi beslenme ve bakım kriterleri;

Beslenme: Gama ışınlı, en az %20 ham protein, en az %4.5 ham yağ, en çok %4.5 ham selüloz, en fazla %9 ham kül, en az %1 lizin, en az %0,45 metiyonin, en az %0,3 sistin, en az 15.000 IU/kg vitamin A, en az 2.200 IU/kg vitamin D kimyasal özelliklere sahip, 12 mm çaplı standart irradiye yem pelet formda (ARDEN Araştırma&Deney Araştırma Deneysel Tıp Malzemeleri, Ankara) ve çalışma boyunca hayvanlar yeme ve suya *ad-libitum* olarak erişim sağlandı.

Altılık: 3-4 mm ebatlarında %2'den fazla nem içermeyen, nem emici, küf-kötü koku içermeyen, mısır koçanı granüle edilerek elde edilen mısır granülü altılık

(ARDEN Araştırma & Deney Araştırma Deneysel Tıp Malzemeleri, Ankara) kullanıldı. Haftada 1 gün kafes ve altlık değişimi aynı kişi tarafından gerçekleştirildi.

Sağlık kontrolleri: Günde bir kez aynı kişi tarafından görsel olarak yapıldı.

Hayvanların refahı ve yaşam standartları, TC Tarım ve Orman Bakanlığı'nın Aralık 2011'de resmi gazetede yayımladığı "Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlar için Kullanılan Hayvanların Refah ve Korunmasına Dair Yönetmelik" in beşinci bölüm, Ek-1, Ek-2, Ek-9 dikkate alınarak gerçekleştirildi (53).

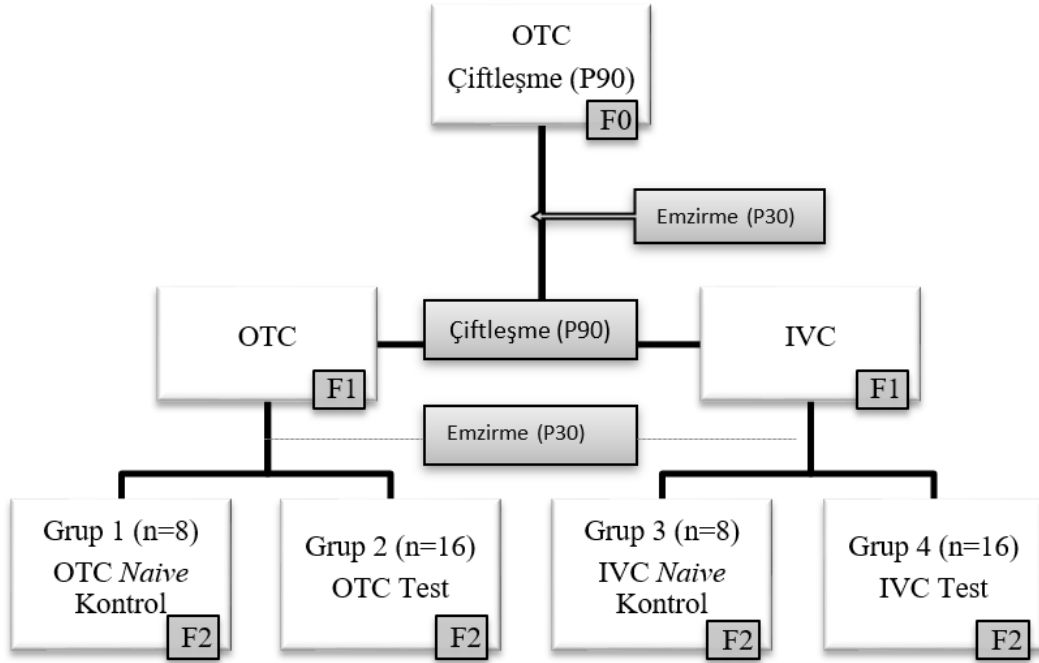
F2 Jenerasyon ve Grupların Oluşturulması

F0: OTC kafeslerde barındırılan BALB/c damızlık dişi ve erkek fareler konvansiyonel stok hayvanlardan randomize olarak seçildi ve bu parentler F0 olarak tanımlandı.

F1: F0 hayvanlar P90.gününde (P90, 12 haftalık yaş) monogami (birebir, 1:1) yöntemiyle çiftleştirildi. Gebe hayvanların yarısı OTC, diğer yarısı IVC sisteminde barındırıldı. Kafes zenginleştirme ve yuva yapma materyali olarak pamuk kullanıldı. Doğum yapan annelerin yavrularını emzirme dönemi 30 gün (P30) olarak belirlendi ve F1 jenerasyon olarak tanımlandı. Emzirme sürecini tamamlayan anneler ve katım döneminde kullanılan damızlık erkek fareler laboratuvara geri iade edildi.

F2: P30 gün olan F1 fareler pelet yemle beslendiklerinden emin olunduktan sonra, dişi ve erkek olarak ayrıldı. Kafeslerin ayrılma sürecinde OTC'de doğan fareler OTC'de, IVC'de doğan fareler yine IVC'de P30-P90 günü tamamlaması beklendi. P90 günlük fareler poligami (haremsiz çiftleştirme 4:1) yöntemiyle çiftleştirildi. Gebe hayvanlar bulundukları barınma sistemine göre kafeslere bireysel olarak ayrıldı. 21 günlük gebelik süresi sonucunda F2 jenerasyonlar üretilmiş oldu. Kafes zenginleştirme ve yuva yapma materyali olarak pamuk kullanıldı. Doğan yavrular P30 gün olduklarında cinsiyet ayrımı yapıldı ve doğdukları sistemlere uygun olarak her kafeste en fazla dört adet olacak şekilde kafeslere tanzim edildi. Emzirme sürecini tamamlayan anneler, damızlık erkekler, F2 jenerasyondan elde edilen dişi fareler laboratuvara iade edildi.

Her kafeste en fazla dört adet olarak barındırılan F2 jenerasyon erkek fareler, P63 g nl k en çalışmaya alındı (şekil 6) .



şekil 6: Grupların oluşturulma basamaklarının şematize edilmesi.

Gruplar:

Grup 1 (n=8): OTC Naive Kontrol Grubu (Hiçbir işleme/teste maruz kalmayan)

- Bu gruptaki F2 jenerasyon erkek fareler, prenatal dönemden itibaren P105'inci güne kadar sadece OTC kafes sisteminde barındırıldı.

Grup 2 (n=16): OTC Deney Grubu

- Bu gruptaki F2 jenerasyon erkek fareler, prenatal dönemden itibaren P105inci güne kadar OTC kafes sisteminde barındırıldı. Sırasıyla aşağıdaki günlerde testler yapıldı.
- P70'de OFT, P77'de EPM, P84'de tail-flick, P85'de hot-plate testlerine tabi tutuldu ve veriler kayıt altına alındı.

Grup 3 (n=8): IVC Naive Kontrol Grubu (Hiçbir işleme /teste maruz kalmayan)

- Bu gruptaki F2 jenerasyon erkek fareler, prenatal dönemden itibaren P105inci güne kadar sadece IVC kafes sisteminde barındırıldı.

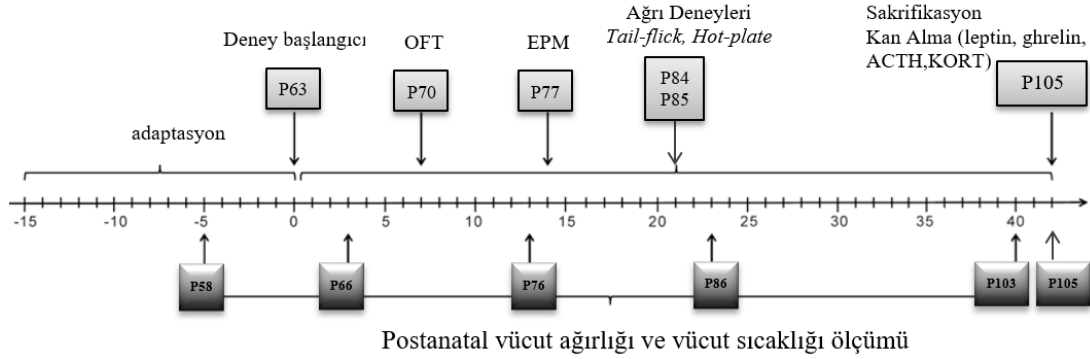
Grup 4 (n=16): IVC Deney Grubu

- Bu gruptaki F2 jenerasyon erkek fareler, prenatal dönemden itibaren P105inci güne kadar IVC kafes sisteminde barındırıldı.
- P70'de OFT, P77'de EPM, P84'de tail-flick, P85'de hot-plate testlerine tabi tutuldu ve veriler kayıt altına alındı.

Tüm Gruplara Uygulanan Prosedürler (Şekil 7)

- Gruplarda bulunan F2 jenerasyon fareler kafeste en fazla dörderli olarak ayrıldı.
- Prenatal dönemden itibaren hangi kafes sisteminde barındırıldıysa, sakrifikasyon gününe kadar aynı oda, aynı kafes sisteminde yaşamı sürdürüldü.
- P30 (sütten kesme), P58, P66, P76, P86, P103 ve P105'inci günlerde vücut ağırlığı ve vücut sıcaklığı (rektal) ölçüldü.
- P105inci günde vücut ağırlıkları ölçüldü ve erkek fareler ketamin-ksilazin kombinasyonu ile genel anestezi altında sakrifiye edildi. Tüm farelerin sağ ve sol adrenal bezleri eksize edildi, ıslak ağırlık ölçümleri hassas terazi (Kern abt 220-5dm, Almanya) ile gerçekleştirildi.
- ACTH, plazma KORT, ghrelin ve leptin seviyelerinin analizi için vena cava caudalisten 2 mL'lik enjektör ile kan alındı. Bireysel olarak etiketlenmiş olan ependorf tüplere alınan kanlar, 1 saat ortam sıcaklığında bekletildikten sonra, DEÜTF ARLAB'da santrifüj edildi. Santrifüjden sonra mikropipet yardımıyla elde edilen plazmalar, -80 °C'de saklanmak üzere ayrıldı. Biyokimyasal analizlerin yapılması için -80 °C'de bulunan plazmalar, oda sıcaklığına

getirildikten sonra elde edilen serumlarla ACTH, plazma KORT, ghrelin ve leptin ELISA testleri yapıldı.



Şekil 7: Deneysel çalışmanın zaman çizelgesi (55 gün).

P: Postnatal gün, EPM: *Elevated Plus Maze*- yükseltilmiş artı labirent testi, OFT: *Open Field Test*- açık alan testi, KORT: plazma kortikosteron (1,144,145).

Kafesler

Üretimde ve yetiştirmede kullanılan tüm fareler için kafes kimlik kartları kullanılmıştır (Şekil 8). Kimlik kartları kafeslerin ön yüzünde bulunan plastik kart tutucu aracılığı ile gerçekleştirildi.

DEÜ		Kafes No:
Hayvan Bilgi Kartı		
Fare/Irk	Cinsiyet	H. Sayısı
☐ BALB/c	☐ Dişi ☐ Erkek	
Üretim Şekli		
☐ Stok	☐ Gebe	☐ Hasta
☐ Katım	☐ Y. Anne	☐
Doğum Tarihi (Gün/Ay/Yıl)		
.....		202...

Şekil 8: Kafes kimlik kartı.

Tüm jenerasyon fareleri (F0, F1 ve F2) randomize olarak seçildi ve kafeslere yerleşimi gerçekleştirildi. Herhangi bir karışıklık olmaması için kafeslerin raklara yatay (harf) ve dikey (sayı) yerleşimlerine göre kodlamaları yapıldı. OTC ve IVC kafes sistemlerindeki kafes sayıları farklı olduğu için her bir sistemde benzer ancak ayrı numaralandırma yapıldı (Şekil 9). OTC kafes sisteminde toplam 20 adet, IVC kafes sisteminde ise 63 adet kafes bulunmaktaydı.

A9	B9	C9	D9	E9	F9	G9
A8	B8	C8	D8	E8	F8	G8
A7	B7	C7	D7	E7	F7	G7
A6	B6	C6	D6	E6	F6	G6
A5	B5	C5	D5	E5	F5	G5
A4	B4	C4	D4	E4	F4	G4
A3	B3	C3	D3	E3	F3	G3
A2	B2	C2	D2	E2	F2	G2
A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1

Şekil 9: Kafeslerin numaralandırma düzeni.

Açık gri alan: OTC kafes sistemi numaralandırması

Açık ve koyu gri alan: IVC kafes sistemi numaralandırması

Konvansiyonel Kafesler - (OTC Sistem)

Dikdörtgen 1290D (*Conventional, Tecniplast, Buguggiate, Italy*) polikarbonat malzemeden yapılmış, 425 x 276 x 153 mm ve 820 cm² taban alanına, 15 cm yüksekliğe sahip üstü açık kafeslerdir (Şekil 10). Kafesler 4x5 (yatay x dikey) olarak raklara yerleştirildi. Her kafesteki (mikroçevre) havalandırma oranı 10 değişim/saattir. Kafes içine gelen hava, odanın havasıdır (makroçevre).



Şekil 10: Konvansiyonel kafesler- OTC kafes sistemi

Bireysel Havalandırılmalı Kafesler- (IVC Sistem)

Dikdörtgen 1285L kodlu (*Blue Line, Tecniplast, Buguggiate, Italy*) polikarbonat malzemeden yapılmış, 542 cm² taban alanına, 12 cm yüksekliğe sahip üstü filtreli kafeslerdir (Şekil 11). Her kafesteki (mikroçevre) hava beslemesi ve egzoz sistemi vasıtasıyla pozitif basınç altında 70 değişim/saat havalandırılmıştır. Değişim/saat ve basınç, sistemin üreticisi tarafından sağlanan bir izleme ekranıyla takip edildi. Kafese hava girişi ve çıkışı kafesin üst tarafında yer almaktadır.



Şekil 11: Bireysel havalandırılmalı kafesler-IVC kafes sistemi

Adaptasyon

Deney başlangıcından 15 gün önce gerçekleştirildi. Fareler P48-P63 gün yaşta 15 günlük adaptasyon süreci tüm gruplara uygulandı. Takao ve arkadaşlarının 2016 yılında yapmış oldukları çalışmada fareleri kafesten alma sırası deneysel çalışma sonuçlarını davranış ve ağrı yanıtlarını değiştirdiğini göstermişlerdir (144). Bu yüzden çalışmamızdaki fareler dörderli olarak barındırıldı. Her kafesteki hayvanlar önce 1. hayvan kafesten alınacak, 5 dk kafesten uzaklaştırıldı (EPM ve OFT'nin süreleri baz alındı). Sırayla diğer farelerde kafesten 5 dk uzaklaştırıldı ve tekrar kafesine yerleştirildi. Bu sayede kafesten ilk alınan fare ile kafesten son alınan farenin davranış ve ağrı yanıtlarının sonuçları kafesten ayrı kalmalarına göre etkilenmedi.

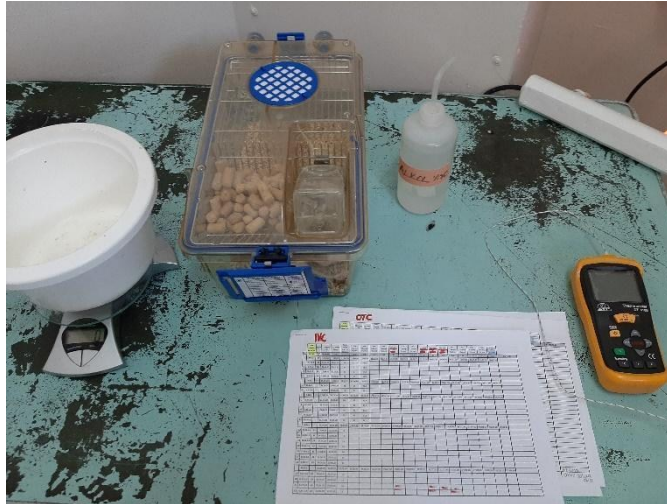
Vücut Sıcaklığı ve Vücut Ağırlığı Ölçümü

P30 (sütten kesme), P58, P66, P76, P86, P103 ve P105'inci günlerde vücut ağırlığı ve vücut sıcaklığı (rektal) ölçüldü. Vücut sıcaklığı ölçümünde (ATP

Instrumentation Ltd, İngiltere) rektal problu, tek girişli K-tipi termometre aracılığı ölçüldü. Vücut sıcaklığı sabit değere ulaşınca kadar beklendi ve elde edilen değeri kaydedildi (Şekil 12). Vücut ağırlıkları ise masa üstü terazi ile yapılmıştır (Aeron, PT-805) (Şekil 13). İki ölçüm için de her bir farenin ölçümü tamamlandıktan sonra rektal prop ve tartı cihazı haznesi %70'lik etil alkol ile dezenfekte edildi. Ölçümler sonrası elde edilen veriler düzenli olarak kayıt altına alınmıştır (Tablo 3).



Şekil 12: Vücut sıcaklığı ölçümü.



Şekil 13: Vücut ağırlığı ve vücut sıcaklığı ölçümlerinin yapılmasına ilişkin genel görünüm.

Tablo 3: Vücut ağırlığı ve vücut sıcaklığı ölçümlerinin kayıt edilen tablo örneği.

Son Güncel: 27.08.20	Vücut Ağırlığı	Vücut Sıcaklığı										
	P30	P58	P58	P66	P66	P76	P76	P86	P86	P103	P103	P105
Animal ID	12.06.20	03.07.20	03.07.20	13.07.20	13.07.20	22.07.20	22.07.20	30.07.20	30.07.20	18.08.20	18.08.20	20.08.20
IVC 4.1.5	30	37	38,0	39	37,5	41	37,8	40	37,2	43	37,0	43
OTC 8.1.2	22	36	36,8	37	36,5	39	36,8	39	36,9	38	36,4	39

Davranış Testleri

Grup 2 (n=16) OTC test grubu ve Grup 4 (n=16) IVC test grubunda bulunan erkek fareler P70’de açık alan test - *Open Field Test* (OFT), P77’de yükseltilmiş artı labirent test - *Elevated Plus Maze* (EPM) testleri yapıldı. Farelerin adaptasyonu için, davranış testleri yapılmadan 1 saat önce davranış test alanında bekletildi (Şekil 14).



Şekil 14: Farelerin davranış laboratuvarında testler öncesi adaptasyon sürecini tamamlama alanı.

Davranış çalışmaları 09:00-13:30 arasında gerçekleştirildi. OFT ve EPM’de alanların tam ortası başlangıç noktası olarak kullanıldı (EPM’de açık kola bakacak şekilde). Her bir farenin test alanındaki 5 dakika toplam süresi dolduktan sonra, alan %70 alkol içeren dezenfektan ile temizlendi. Davranış testlerinin yapıldığı alanın makroçevre koşulları laboratuvar standartları gözetilerek sağlandı ve ortam koşulları (sıcaklık, nem, ses, ışık şiddeti) kayıt altına alındı. Ortalama sıcaklık 22 ± 2 °C ve nem düzeyi %40-60 arasında, ses seviyesi en fazla 55dB olarak kaydedildi. OFT test

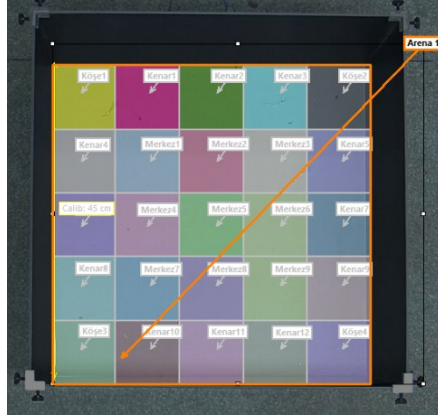
alındaki ışık şiddeti 90 lüks, EPM alanındaki ışık şiddeti 65 lüks olarak ayarlandı (9,37,145).

Open Field Test (OFT)- Açık Alan Testi

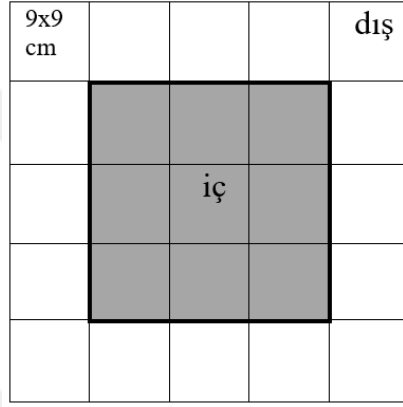
OFT, lokomotor aktivite ve tigmotaksis zamanı (anksiyete seviyesi) ile ilgili davranışları araştırmaya yarayan test prosedürüdür. Grup 2 ve Grup 4’de bulunan fareler P70 gün yaşta siyah, akrilik bir açık alanda (45x45x45 cm) test edilerek, OFT’de değerlendirildi (Şekil 15). OFT alanı yirmibeş eşit alana 9x9 cm olarak ayrıldı. İç (merkez -dokuz merkezi kare) ve dış (kenar, köşe - on altı çevresel kare) olarak tanımlandı (Şekil 16, Şekil 17). Her fare test merkezine yerleştirildi ve daha sonra Şekil 14’de olduğu gibi 5 dakika boyunca alanda serbest keşif yapmasına izin verildi. Her bir farenin aktivitesi, üstten bir kamera ile izlendi ve özel video izleme yazılımı (Ethovision XT 13, Noldus, Hollanda) kullanılarak analiz edildi (9,37,146) (Şekil 18). Her çalışmadan sonra % 70 etanol çözeltisi ile temizlendi. Değerlendirilen parametreler, test süresi boyunca köşelerde, kenarlarda ve merkeze giriş sıklığı, bu alanlarda geçirilen zaman, frekans, alınan toplam mesafe, hız, hareketli ve hareketsiz olduğu toplam süre olmuştur (1,16,145).



Şekil 15: OFT alanı.



Şekil 16: OFT iç (merkez) ve dış (kenar, köşe) alan tanımları.



Şekil 17: 9x9 cm eşit alanlara bölünen OFT alanının iç ve dış bölgeleri. Anksiyetenin artması test alanının dış bölgelerinde geçirilen daha fazla zaman (tigmotaksis) kaydedildi (146).



Şekil 18: OFT alanında serbest keşif yapan fare görünümü.

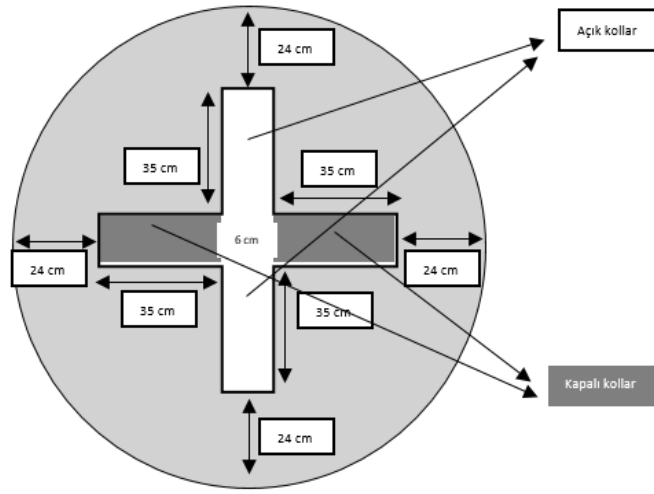
Elevated Plus Maze (EPM) - Yükseltilmiş Artı Labirent Test

İki kolunun açık ve ikisinin kapalı olduğu dört koldan oluşan bir labirent kullanıldı. Yerden 40 cm yükseklikte, 38x6 cm iki açık ve iki kapalı kolu, kapalı kolların yüksekliği 15 cm olan artı şeklinde bir deney düzeneğinde test gerçekleştirildi. Kapalı kolların iç yüzeyleri, zemini ve açık kolların zemini siyah mat renkte, kapalı kolların dış yüzeyi beyaz parlak renktedir. Farelerin açık kollardan düşme ihtimaline karşın, morris water maze (sıçan) su tankının boş hali kullanılmıştır. Fareler için açık kollardan yerden yüksekliğin daha anlaşılır hale getirilmesi ve farklı feromonlara maruziyetine engel olmak için mısır granülü altlığı tank içine homojen bir şekilde yerleştirildi (Şekil 19).



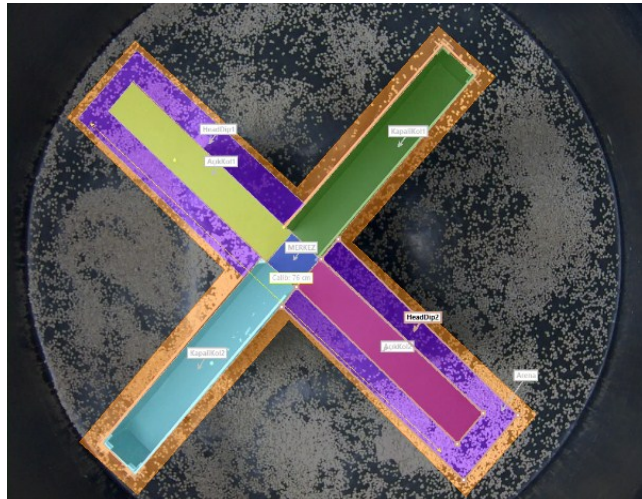
Şekil 19: EPM test düzeneği.

EPM test düzeneği, morris water maze (sıçan) su tankının tam merkezine yerleştirildi. Açık ve kapalı kollar su tankına 24 cm mesafede olacak şekilde düzenlendi. Su terazisi (su terazisi, mobil uygulama) ile tüm kolların eğimi sıfır olarak ayarlandı (Şekil 20). Çalışmalarda ışık şiddetinin bir etkisi bulunmamasına rağmen, tavanda bulunan ışık kaynağı ile ışık şiddeti tüm kollara homojen ışık dağılımı sağlandı ve lüks metre (*lux light meter*, mobil uygulama) ile ölçüldü (200 lüks) (16).



Şekil 20: EPM test alanı ölçüleri.

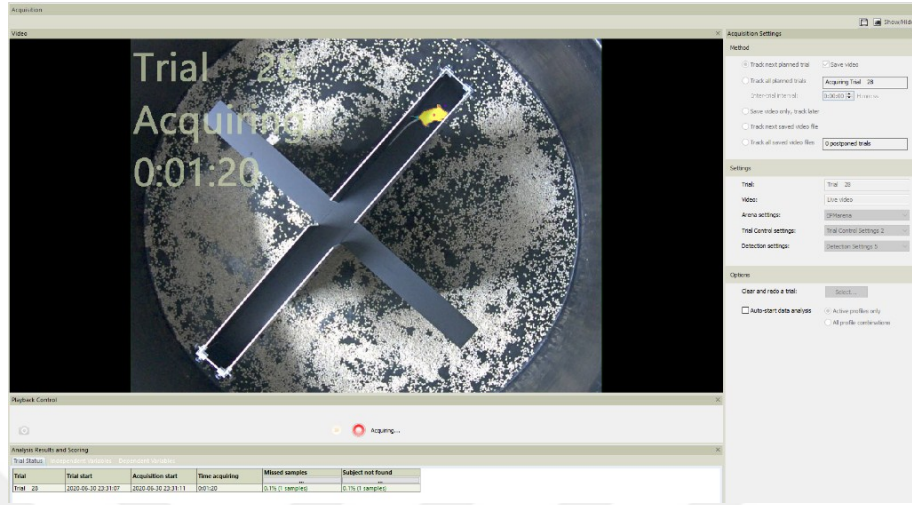
Çalışmamızda kullanılan program *Ethovision XT 13*, *Noldus* davranış testleri profesyonel kayıt sistemidir. Kayıt sisteminin sağlayıcısı EPM test alanının hemen yukarısında bulunan kamera ile yapıldı. Kameranın kaydının yapılması için EPM alanının tanımlanması sağlandı (Şekil 21).



Şekil 21: EPM alanının tanımlanması.

Fareler her zaman aynı açık kollara bakacak şekilde merkeze yerleştirildi. Anksiyete ile ilgili davranış, 5 dakika boyunca labirentin açık ve kapalı kollarında harcanan girdiler ve süre kamera ile gözlemlenerek, özel video izleme yazılımı

(Ethovision XT 13, Noldus, Hollanda) ile değerlendirildi (Şekil 22). Her çalışmadan sonra % 70 etil alkol çözeltisi ile temizlendi (145).



Şekil 22: EPM alanında test edilen farenin görüntüsü.

Termal Nosiseptif Testler-Ağrı Deneyleri

Farelerin test alanına adaptasyonu için deneyler yapılmadan bir saat önce test alanında bekletildi. Grup 2 (n=16) OTC test grubu ve Grup 4 (n=16) IVC test grubunda bulunan erkek fareler doğum tarihleri göz önünde bulundurularak, P84’de *tail-flick* test- kuyruk çekme testi, P85’de *hot-plate* test- sıcak plaka testleri yapıldı. Her bir fareye ait elde edilen veriler Tablo 4 ile Tablo 5 örneğindeki gibi kayıt altına alındı.

Tablo 4. *Tail-flick* yanıtlarının kayıt tablosu örneği

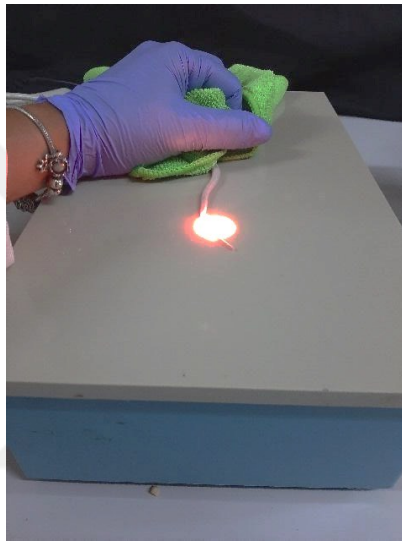
P84 Tail-Flick Reaksiyon Süresi			
Tarih	Fare No	Kuyruk çekme yanıtı (saniye)	Cut off time 15 saniye
.. /.. /..	1.		

Tablo 5: *Hot-plate* yanıtlarının kayıt tablosu örneği

P 85 Hot-Plate Reaksiyon Süresi			
Tarih	Fare No	Arka pati yanıtı (saniye)	Atlama yanıtı (cut off time 30 sn)
.. /.. /..	1.		

Tail-Flick Test- Kuyruk Çekme Testi

Ölçülen parametre, kuyrukta bir ısı uyarımına takiben, kuyruk hareketi refleksi için saniye cinsinden gecikme süresidir. Kuyruk ucunun kontrollü bir sıcaklıkta, Şekil 23’de gösterildiği gibi kontrollü bir kızılötesi ışını ile ısı uyarımına maruz bırakıldı (MAY-TF 0703, Ankara, Türkiye). Işına maruz kalan farenin, kuyruğunu geri çekilmesi ile bu termal uyarıcı kapatıldı ve süre otomatik olarak durduruldu. 15-saniye içinde cevap vermeyen fareler test alanından alındı (*cut off time*) (147).



Şekil 23: Fare kuyruğunun kızılötesi ışın ile ısıya maruz bırakılması.

Hot-Plate Test- Sıcak Plaka Testi

Fareler, pleksiglas silindir ile çevrelenmiş içindeki sıcak plaka üzerinde (*Orchid Scientific and Innovative India Pvt. Ltd., Maharashtra, India*) nosiseptif yanıtlar için test edildi (Şekil 24). Plakanın sıcaklığı yaklaşık 55 ° C olarak belirlendi. Bu sıcaklık hayvan refahını olumsuz etkilemeksizin ağırlı yanıtlarını izlemeye olanak sağladı. Ağırlı uyarılara yanıt süresi; arka patileri yalamaya başlanması, çekmesi veya zeminden zıplayarak kaçması olarak belirlendi (11,131,142). Fareler en fazla 30 saniye test alanında bekletildi (*cut off time*) (147). Her testten sonra % 70 etil alkol çözeltisi ile pleksiglas içi ve sıcak plaka temizlendi.



Şekil 24: *Hot-plate test*- sıcak plaka testi uygulaması.

Ötenazi Yöntemi, Kan ve Örnek Numunesi Alma

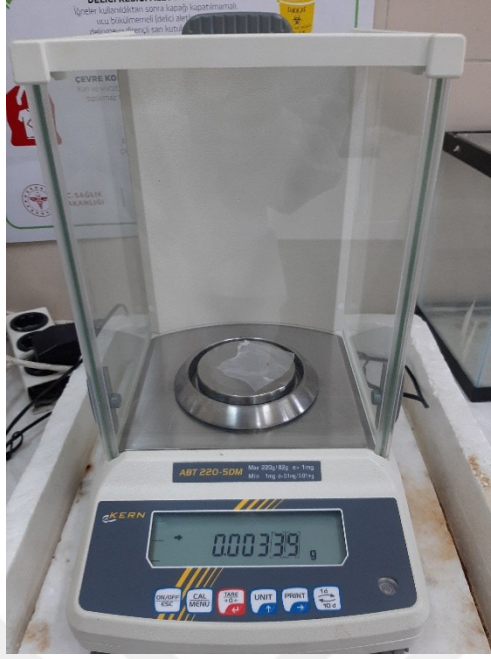
P105. Gün tüm farelerin sakrifikasyonu enjektabl genel anestezi altında gerçekleştirildi (27). Enjektabl anestetik olarak intraperitoneal yolla, ketamin ve ksilazin kombinasyonu uygulandı. Ketamin 100 mg/kg ve ksilazin 10 mg/kg dozda uygulandıktan sonra 20-30 dakikalık anestezi süresi sağlandı ve *vena cava caudalis*'ten kan alma gerçekleştirildi (Şekil 25) (148). Bu sayede genel anestezi altında eksanguinasyon ile hem sakrifikasyon gerçekleştirildi, hem de kan örnekleri toplandı. Ependorf tüplere alınan kanlar iki saat oda sıcaklığında bekletildi. Fare kanları, DEÜTF ARLAB'da bulunan santrifüj ile 3500 devirde 10 dk santrifüj edildi (Şekil 26). Daha sonra elde edilen plazma örnekleri yeni bir ependorf tüplere aktararak, -80 °C buzdolabında KORT, ACTH, leptin ve ghrelin *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) ayrı ayrı çalışılmak üzere saklandı (105). Farelerin sağ ve sol adrenal bezleri eksize edilip, ağırlıkları hassas terazi (Kern abt 220-5dm, Almanya) ile ölçüldü ve kayıt altına alındı (Şekil 27). Fare adrenal dokuları ileride çalışılmak üzere -80 °C buzdolabında saklanmaktadır. Ayrıca beyin dokuları da sağ ve sol hemisfer craniumdan çıkarılarak ependorf tüplere aktarıldı ve yine ileride çalışılmak üzere, -80 °C buzdolabında saklanmaktadır.



Şekil 25: *Vena cava caudalis* 'ten enjektör aracılığıyla kan alma.



Şekil 26: Kan örneklerinin santrifüj edilmesi.



Şekil 27: Adrenal bez ağırlıklarının hassas terazi ile ölçümü.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

Araştırma planı

Çalışmamız araştırma, başvurular, deneysel hayvan çalışması, analizlerin gerçekleştirilmesi, sonuçların eldesi, değerlendirilmesi ve yazılması olarak iş paketlerine ayrıldı. Başlangıç tarihi Ekim 2018, tez projesi tamamlanma tarihi Ağustos 2021'dir.

Proje Hazırlık Aşamasındaki İş Paketleri

- Deneysel hayvan çalışması için konunun araştırılması, literatür tarama ve danışman ile toplantı gerçekleştirildi (19.10.18- 23.11.18).
- Konuya uygun, literatür destekli proje yazıldı (26.11.18- 05.02.19).
- DEÜTF Multidisiplin Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu başvuru süreci gerçekleştirildi, toplantı sonucunun beklendi ve etik onay alındı (08.02.19- 13.02.19).
- Tez izlem jüri üyelerine yeni tez önerisi hakkında bilgi verildi ve toplantı gerçekleştirildi. DEÜTF Multidisiplin Deney Hayvanları Laboratuvarı'na hayvan talebi için başvuru gerçekleştirildi (13.02.19- 21.02.19).

- DEÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulu'na sunulmak üzere ilgili formların doldurulması ve karar bekleme süreci tamamlandı. Projede kullanılan malzemelerin proforma talepleri ilgili firmalardan yapıldı (21.02.19- 28.02.19).

- DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) başvuru süreci için gereken belgeler hazırlandı ve proje başvurusu yapıldı (28.02.19- 08.03.19).

Proje Aşamasındaki İş Paketleri

1. İş Paketi: Malzemelerin tedarik edilmesi/satın alınması (12 ay)

- Fareler temini; Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Multidisiplin Laboratuvarı Deney Hayvanları Birimi'ne hayvan talebi için başvuru gerçekleştirildi.

- Altılık ve yem
- Isı ölçer
- Biyokimyasal analiz kitleri
- Cerrahi set
- Davranış test düzenekleri
- Sarf malzemeler

2. İş Paketi: Hayvanların üretimi ve takibi (6 ay)

- DEÜTF Multidisiplin Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan talep edilen hayvanlar elde edildi ve F0 jenerasyon katıma alındı.

- F0 ve F1 jenerasyon deney hayvanları verilerinin kayıtları düzenli olarak tutuldu.

- F2 jenerasyondan 48 adet erkek fareler elde edildi ve adaptasyon süreci tamamlandı.

- F2 jenerasyon fareler P 63 gün yaşta deneyin başlangıcı olarak kabul edildi.

3. İş Paketi: Deneysel çalışmalar (7 ay)

- Metabolik verilerin eldesi: Deneyde kullanılan tüm farelerin doğum tarihlerine göre düzenli olarak vücut ağırlığı ve ısı ölçümlerinin yapıldı.

- Davranış çalışmaları (OFT, EPM, tail-flick, hot-plate): Davranış testlerinin ve ağrı deneylerinin altyapısı sağlandı ve deneyler farelerin doğum tarihlerine göre belli dönemlerde gerçekleştirildi. Elde edilen veriler kayıt altına alındı.
- Bir aylık bir süreçte deneyde kullanılan farelerin sakrifikasyonu yapıldı ve kan ile doku örnekleri alındı.
- Biyokimyasal analizler: Biyokimyasal analizler DEÜTF ARLAB'da yapıldı. Değerlendirilen analizlerin sonuçları alındı.

4. İş Paketi: Sonuçların eldesi ve değerlendirilmesi (6 ay)

- Tezden elde edilen tüm veriler istatistiksel olarak değerlendirildi. Veriler tablo ve grafiklerle belirtildi.
- Konu ile ilgili güncel literatür yapıldı ve proje yazıldı.
- Tez bitirme süreci başlatıldı.
- Sonuç raporu DEÜ BAP'a ibraz edildi.

Araştırma Takvimi

İş Paketi No	İş Paketi Tanımı	2019		2020												2021									
		11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Malzemelerin tedarik edilmesi/satın alınması (12 ay)																								
2	Hayvanların üretimi ve takibi (6 ay)																								
3	Deneysel çalışmalar (7 ay)																								
4	Sonuçların eldesi ve değerlendirilmesi (6 ay)																								

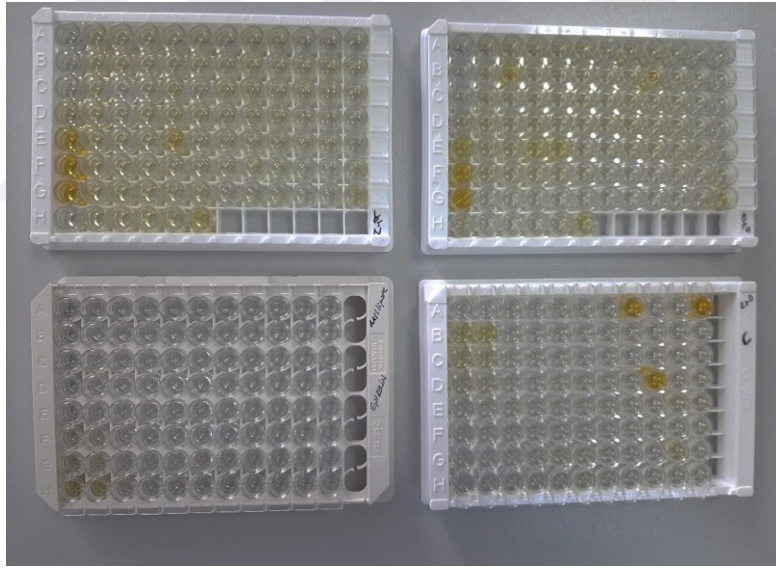
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Biyokimyasal Değerlendirme Yöntemleri

Farelerden alınan kanlardan elde edilen plazmalar -80 °C buzdolabında biyokimya analiz gününe kadar saklandı. Plazmalar ile ELISA testi yapıldığı tarihte oda sıcaklığında çalışıldı. Plazmalardan dört farklı parametre için, her bir farenin plazma örneği dörde bölündü. Leptin, ghrelin, ACTH ve KORT parametrelerinin ELISA analizleri her bir kitin üretici firmasının önerdiği prosedüre göre

gerçekleştirildi (Şekil 28). ELISA testinin prensibi; antijen-antikor ilişkisine bağlı olup, antikor-enzim konjugatlarının miktarları spektrofotometrik ölçümle belirlendi.

Leptin seviyesi 201-02-0651 katalog numaralı *mouse leptin receptor* (LR/Ob-R) ELISA kit (*Sunred Technology Co.,Ltd*, Şangay, Çin) ile çalışıldı ve değerler ng/ml olarak verildi. Ghrelin düzeyleri EZRGRA-90K katalog numaralı, *rat/mouse ghrelin (active)* kit (*Millipore*, Amerika) ile çalışıldı ve değerler pg/ml olarak verildi. ACTH analizi 201-02-0266 katalog numaralı, *mouse ACTH* ELISA kit (*Sunred Technology Co.,Ltd*, Şangay, Çin) ile çalışıldı ve değerler pg/ml olarak verildi. KORT analizi KGE009 katalog numaralı, *corticosterone parameter assay* kit (*R&D Systems, Minneapolis*, Amerika) ile çalışıldı ve değerler ng/ml olarak verildi (105,149–151). Elde edilen veriler, test içeriğiyle beraber gelen referans standart eğri grafiği ile çalışılarak sonuçlar analiz edildi.



Şekil 28: Sırasıyla leptin, ACTH, ghrelin ve KORT ELISA analizleri görseli.

İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler Windows için *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) sürüm 24 istatistik programı kullanılarak yapıldı. Elde edilen tüm veriler Shapiro-Wilk normalite testi ile normal dağılıp, dağılmadığı incelendi. Normal dağılan veriler, parametrik testlerden iki grup karşılaştırmalarında *t*-test, dört grup karşılaştırmaları tek yönlü ANOVA testi ile değerlendirildi. Tek yönlü ANOVA

testinde grupların birbirleriyle karşılaştırmalarında *Levene's* homojenite testi yapıldı. Varyanslar homojen ise post-hoc analiz için, *Bonfferroni*, varyanslar heterojen ise *Games-Howell* testleri yapıldı. Veriler ortalama $\pm$ STD olarak gösterildi. Normal dağılım göstermeyen verilerin grup karşılaştırmaları non-parametrik testlerden *Mann Whitney U* testi ile yapıldı. Veriler median (minimum-maksimum) değer olarak belirtildi. Karşılaştırılan gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farkları $p < 0.05$ ise kabul edildi (145,152,153).

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Bilimsel araştırma projelerini destekleme birimi tarafından projemizin kabul bildirim tarihi 18.10.2019 olarak tarafımıza iletili. Hayvan üretiminin başlaması için öncelikle yem ve altık talebinde bulunuldu. Talebimizin onaylanma süreci ve malzemelerin bir kısmının tedariki Ocak 2020 de gerçekleşti. Malzeme tedarikinin gecikmesi nedeniyle hayvan üretimine yaklaşık üç (3) ay gecikmeli başlandı. Ayrıca hayvan üretiminde gebelik oranlarının düşük olması nedeniyle, yeni çiftleşme gruplarını oluşturuldu (Şubat 2020). Mart 2020'de ülkemizde ilan edilen pandemi nedeniyle ekipman, tıbbi ve sarf malzeme alım işlemlerinde ulusal ve global olarak aksaklıklar meydana gelmiştir. Projenin yürütülmesinde zaman yönetimi konusunda kısıtlamalar oluştu. Ek süre talebi ile projenin yürütülmesindeki eksiklikler tamamlandı. Projede belirtilen tüm prosedürler çalışma prensipleri doğrultusunda tamamlandı.

3.10. Etik Kurul Onayı

Doktora tez projesi, DEÜ Multidisiplin Laboratuvarı Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na (HADYEK) etik açısından değerlendirilmek üzere sunuldu. 13.02.19 tarihli HADYEK toplantısında proje etik açıdan sakınca olmadığı oy birliği ile uygun görüldü. 08/2019 protokol no'lu proje 48 adet erkek Balb/c fare kullanımı için etik onayı alınmıştır.

4. BULGULAR

OTC kafes sistemlerinde barındırılan F0 jenerasyon farelerden projenitor parentler oluşturuldu. OTC ve IVC kafes sistemlerinde F1 ve F2 jenerasyon fareler üretimleri gerçekleştirildi. F2 jenerasyon fareler elde edildikten sonra, erkek olanlar çalışma için kullanıldı. Her fare anne karnından itibaren ilgili kafes sistemlerinde barındırılarak, OTC ve IVC kafes sistemlerinin barındırılma etkisine her yaş dönemi aralığında maruz kaldı. OTC ve IVC kafeslerde barındırılan hayvanlar *naive* kontrol (n=8) ve deney (n=16) grupları olacak şekilde toplamda dört grup, 48 adet erkek fare ile çalışıldı. Gruplara özgü parametrelerin karşılaştırılması Tablo 6’da sunulmuştur.

Tablo 6: *Naive* kontrol ve deney ve gruplarda test edilen parametrelerin karşılaştırma tablosu.

Gruplar	OTC Naif	IVC Deney
OTC Deney	*	**
IVC Naif	***	*
* Prosedürlere bağlı etkinin değerlendirilmesi: Alandaki bulunma süresi- alan değişikliği- manipülasyon (tutma, test alanına koyma, daha fazla insana maruz kalma süresi)-bilinmeyen olası değişkenlerin etkisi		
** Yaşam alanının farklı etkileri: Davranışsal (OFT, EPM), ağrı (tail-flick, hot-plate), biyokimya (leptin, ghrelin, ACTH, KORT), fizyoloji (vücut ağırlığı, vücut sıcaklığı, adrenal bez ağırlıkları)		
*** Yaşam alanının farklı etkileri: Mikro ve makroçevre etkisi, biyokimya (leptin, ghrelin, ACTH, KORT), fizyoloji (vücut ağırlığı, vücut sıcaklığı, adrenal bez ağırlıkları)		

4.1. Canlı Vücut Ağırlık Değişimleri

OTC ve IVC'de barındırılan *naive* kontrol ve deney gruplarındaki erkek farelerin, P30 (sütten kesme), P58, P66, P76, P86, P103 ve P105’inci günlerde, vücut ağırlıkları kaydedildi. İstatistiksel olarak analizleri standardizasyon açısından P58 ve P105’inci günler arasında değerlendirildi. Veriler normal dağılım göstermiştir. Bu nedenle istatistiksel analiz için *one-way* ANOVA kullanıldı. Heterojen dağılım gösteren veriler için post-hoc *Games-Howell* (P58), homojen dağılım gösteren veriler

için post-hoc *Bonferroni* (P66, P76, P86, P103, P105) testleri kullanılmıştır. Farklı kafes sistemlerinde barındırılan *naive* kontrol ve deney grubundaki farelerin ağırlık değişimleri bakımından gruplar arası anlamlı bir fark bulundu ($p<0,0001$) (Tablo 7, Grafik 1).

OTC Naive Kontrol ile IVC Naive Kontrol Gruplarındaki Ağırlık Değişimleri

OTC ve IVC *naive* kontrol gruplar arasında fark bulunmuştur. IVC *naive* kontrol grubundaki farelerin ağırlık artışları tüm zaman dilimlerinde, OTC *naive* kontrol grubuna göre daha fazla olduğu tespit edildi ($p<0,001$).

OTC Naive Kontrol ile OTC Deney Gruplarındaki Ağırlık Değişimleri

OTC kafes sistemlerinde barındırılan farelerin zamana bağlı ağırlık ölçümlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

IVC Naive Kontrol ile IVC Deney Gruplarındaki Ağırlık Değişimleri

IVC kafes sistemlerinde barındırılan farelerin *naive* kontrol grubu, deney grubundaki farelere göre P86 ve P105'inci günlerde ağırlık artışının az olduğu saptanırken ($p<0,0001$), diğer zamanlarda anlamlı bir fark bulunmamıştır.

OTC Deney ile IVC Deney Gruplarındaki Ağırlık Değişimleri

IVC deney grubundaki fareler, OTC deney grubuna göre ağırlıkları tüm zaman dilimlerinde anlamlı olarak artış gözlendi ($p<0,0001$).

Tablo 7: *Naive* kontrol ve deney grubundaki farelerin postnatal günlere göre vücut ağırlıkları.

Grup	Hayvan sayısı (n)	Postnatal (P) günlere göre vücut ağırlığı (g) (ortalama±ss)						
		P30	P58	P66	P76	P86	P103	P105
OTC <i>Naive</i> kontrol	8	17,5±1,4	30,3±2,1*	31,6±1,8*	33,8±2,2*	35,1±1,6*	34,9±1,2*	36,5±1,6*
OTC Deney	16	20,6±4,0	32,4±1,3**	34,3±1,7**	35,3±1,7**	35,6±1,5**	36,3±1,9**	36,6±2,3**
IVC <i>Naive</i> kontrol	8	26,5 ±3,0	37,4±3,2	38,3±3,3	40,4±2,6	40,4±1,5***	40,8±1,6	41,8±2,4***
IVC Deney	16	14,1±1,7	39,6±1,7	40,9±2,3	41,8±2,7	45,2±2,1	46,6±2,2	47,6±3,1
p değeri	N=48	değerlendirilmedi	0,0001#	0,0001#	0,0001#	0,0001#	0,0001#	0,0001#

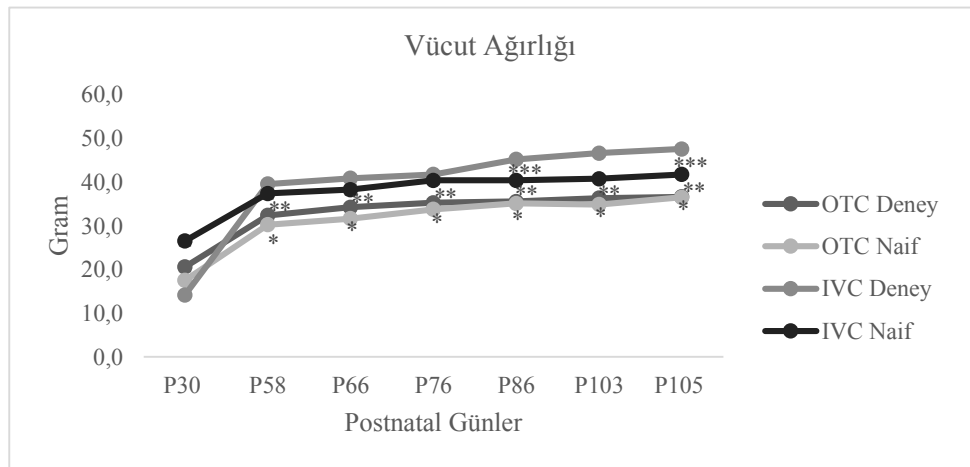
Gruplar arası karşılaştırma *one-way* ANOVA ile test edilmiştir. Gruplar arası anlamlı fark vardır ($p < 0,0001^{\#}$).

Heterojen dağılım gösteren veriler için *post hoc* Games-Howell (P58), homojen dağılım gösteren veriler için *post hoc* Bonferroni (P66, P76, P86, P103, P105) testleri kullanılmıştır.

OTC ve IVC *naive* kontrol grupları karşılaştırıldığında $p < 0,001^*$,

OTC ve IVC deney grupları karşılaştırıldığında $p < 0,0001^{**}$,

IVC *naive* kontrol ve IVC deney grubu karşılaştırıldığında $p < 0,0001^{***}$ anlamlı farklılık bulunmaktadır.



Grafik 1: OTC ve IVC'de barındırılan farelerin zamana bağlı postnatal vücut ağırlıklarının grafik ile gösterilmesi (Bkz; Tablo 7'nin altındaki açıklamalar).

4.2. Vücut Sıcaklığı Değişimleri

OTC ve IVC'de barındırılan *naive* kontrol ve deney grubundaki erkek farelerin, P58, P66, P76, P86, P103'üncü günlerde, vücut sıcaklığı ölçümleri yapıldı. Veriler normal dağılım gösterdiği için, *one-way* ANOVA istatistiksel analizi kullanıldı. Heterojen dağılım gösteren veriler için *post-hoc Games-Howell* (P58), homojen dağılım gösteren veriler için *post-hoc Bonferroni* (P66, P76, P86, P103) testleri kullanılmıştır. Farklı kafes sistemlerinde barındırılan *naive* kontrol ve deney grubundaki farelerin vücut sıcaklığı değerlendirmeleri gruplar arası istatistiksel anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,0001$) (Tablo 8, Grafik 2).

OTC Naive Kontrol ile IVC Naive Kontrol Gruplarındaki Vücut Sıcaklığı Değişimleri

IVC *naive* kontrol grubundaki farelerin, OTC *naive* kontrol grubuna göre vücut sıcaklığı değerleri tüm zamanlarda daha yüksek olduğu tespit edildi. P76, P86 ve P103'üncü günlerde vücut sıcaklıkları arasındaki fark çok belirgin iken ($p<0,0001$), P58 ve P66 günlerde de istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0,05$).

OTC Naive Kontrol ile OTC Deney Gruplarındaki Vücut Sıcaklığı Değişimleri

OTC kafes sistemlerinde barındırılan farelerin *naive* kontrol ve deney grupları arasında anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$).

IVC Naive Kontrol ile IVC Deney Gruplarındaki Vücut Sıcaklığı Değişimleri

IVC kafes sistemlerinde barındırılan farelerin *naive* kontrol grubu deney grubundakilere göre P66 gününde vücut sıcaklığı daha düşük bulunken ($p<0,05$), P86 günde yapılan ölçümde vücut sıcaklığı *naive* kontrol grupta daha yüksek tespit edildi ($p<0,01$). P58, P76 ve P103'üncü günlerde anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$).

OTC Deney ile IVC Deney Gruplarındaki Vücut Sıcaklığı Değişimleri

OTC deney grubundaki farelerin vücut sıcaklığı, IVC deney grubundaki farelere göre tüm zaman dilimlerinde anlamlı derecede daha düşük olarak bulundu ($p<0,0001$).

Tablo 8: Naive kontrol ve deney grubundaki farelerin postnatal günlere göre vücut sıcaklıkları.

Gruplar	Hayvan sayısı (n)	Postnatal (P) günlere göre vücut sıcaklığı (°C) (ortalama±ss)				
		P58	P66	P76	P86	P103
OTC Naive kontrol	8	37,1±0,5	36,6±0,3	36,3±0,3	36,3±0,2	36,6±0,3
OTC Deney	16	36,8±0,3*	36,6±0,4*	36,5±0,4*	36,4±0,5*	36,5±0,3*
IVC Naive kontrol	8	37,5±0,5**	37,2±0,3**	37,9±0,5##	38,0±0,5##	38,3±0,5##
IVC Deney	16	37,5±0,2	37,6±0,3***	38,1±0,2	37,4±0,3###	38,0±0,4
p değeri	N=48	0,0001#	0,0001#	0,0001#	0,0001#	0,0001#

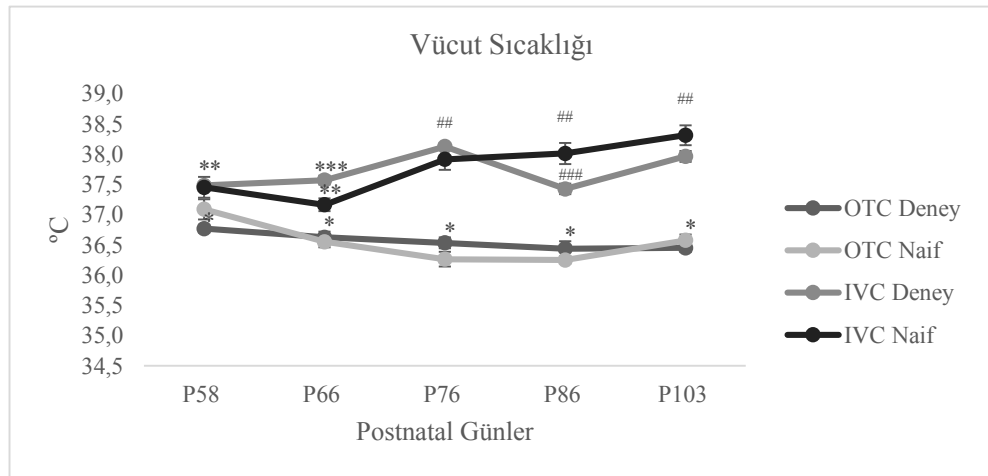
Gruplar arası karşılaştırma *one-way* ANOVA ile test edilmiştir. Gruplar arası anlamlı fark vardır ($p < 0,0001^{\#}$).

Heterojen dağılım gösteren veriler için *post hoc Games-Howell* (P58), homojen dağılım gösteren veriler için *post hoc Bonferroni* (P66, P76, P86, P103) testleri kullanılmıştır.

OTC ve IVC deney grupları karşılaştırıldığında $p < 0,0001^*$,

OTC ve IVC naive kontrol grupları karşılaştırıldığında $p < 0,05^{**}$, $p < 0,0001^{\#}$,

IVC naive kontrol ve IVC deney grubu karşılaştırıldığında $p < 0,05^{***}$, $p < 0,01^{###}$ anlamlı farklılık bulunmaktadır.



Grafik 2: OTC ve IVC'de barındırılan farelerin zamana bağlı postnatal vücut sıcaklıklarının grafikte gösterilmesi (Bkz; Tablo 8'in altındaki açıklamalar).

4.3. Açık Alan Davranış Test (OFT) Sonuçları

OTC ve IVC'de barındırılan deney grubundaki erkek farelere, P70'inci gün anksiyete davranışları üzerine etkisini incelemek amacıyla, OFT yapıldı. OFT alanlarındaki (merkez, kenar, köşe) frekans, kalış süreleri, ilk giriş zamanları, aldıkları toplam mesafe, hızları, hareketli ve hareketsiz oldukları toplam süreler açısından veriler elde edildi. Normal dağılım göstermeyen veriler *Mann Whitney U* test ile, normal dağılım gösteren veriler ise *t*-test ile değerlendirilmiştir (Tablo 9, Grafik 3).

Frekans

Farelerin OFT merkez alanındaki frekansında gruplar arasında anlamlı fark yok iken ($p>0,05$), IVC deney grubunun kenar ve köşe alanları frekansı OTC deney grubuna göre daha yüksek bulundu ($p<0,01$).

Kalış Süreleri

OFT merkez ve köşe alanlarında kalış süresi bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmazken ($p>0,05$), IVC sistemde barındırılan farelerin, OTC'de barındırılanlara göre kenardaki kalış sürelerinin daha fazla olduğu saptanmıştır ($p<0,01$).

İlk Giriş Zamanları, Aldıkları Toplam Mesafe ve Hız

Farelerin OFT alanlarına ilk giriş zamanı, alınan toplam mesafe ve hız açısından iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$).

Hareketli ve Hareketsiz Oldukları Toplam Süreler

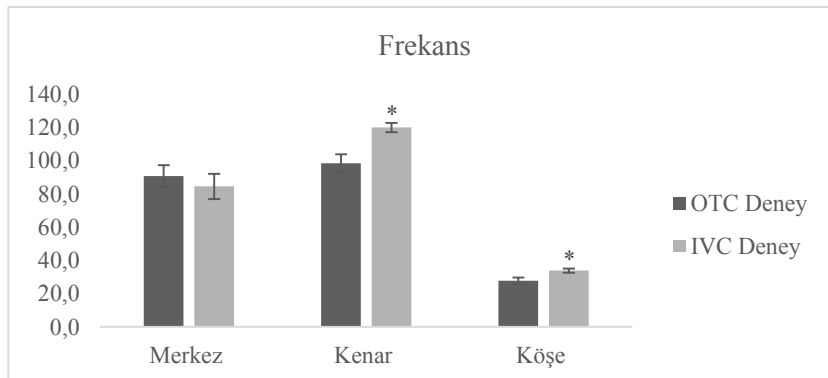
OFT alanında hareketli ve hareketsiz oldukları süre bakımından iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,051$).

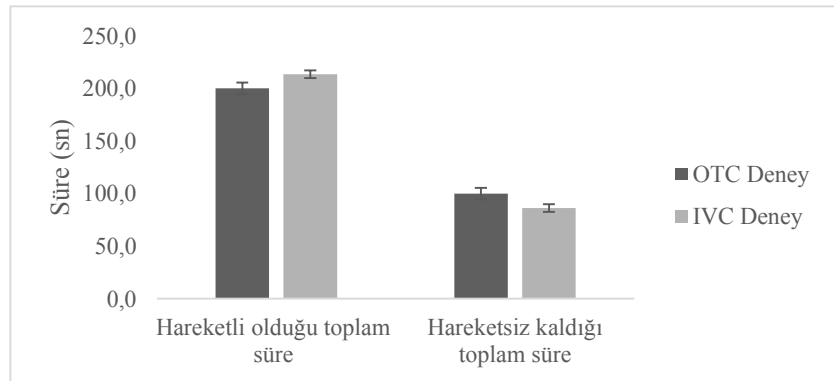
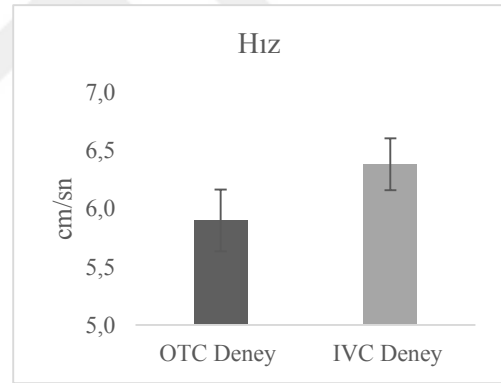
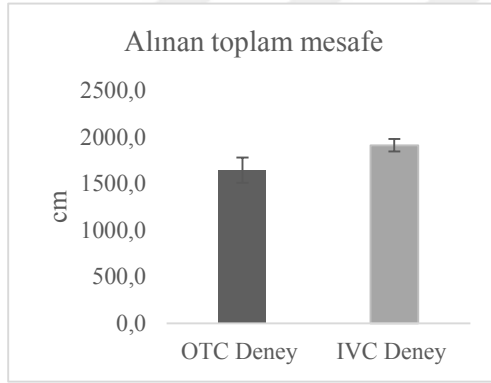
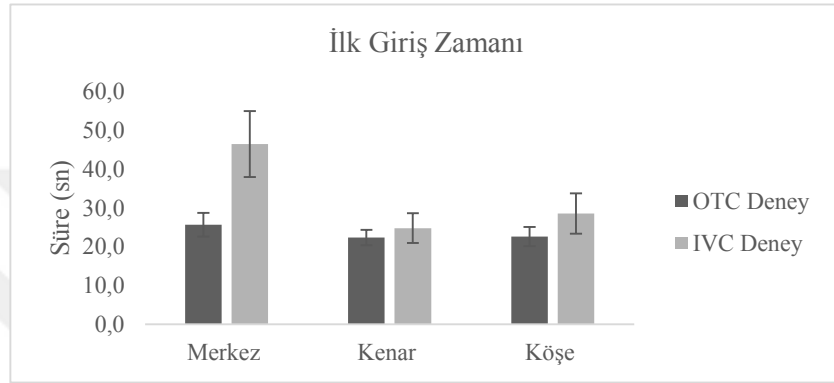
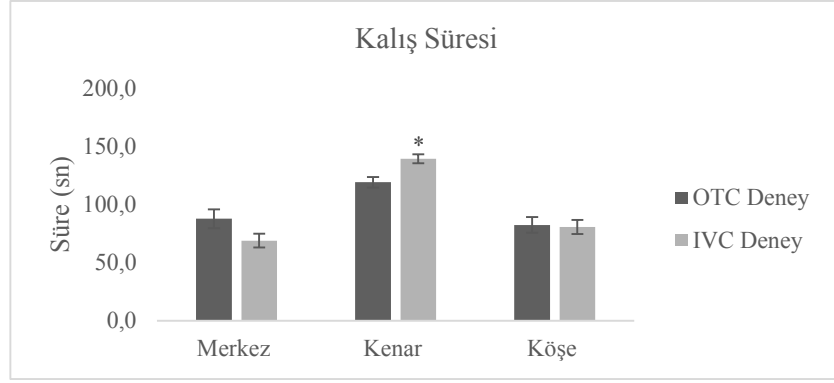
Tablo 9: Deney gruplarındaki farelerin OFT'deki davranış yanıtları

	OTC (n=16)	IVC (n=16)	p değeri
Frekans			
Merkez	90,6 ±26,8	84,4 ±30,4	0,550
Kenar	98,3 ±22,1	119,8±11,5	0,002*
Köşe	27,6±7,5	33,8±4,8	0,010*
Kalış süresi (sn)			
Merkez	87,6±32,7	68,8±23,5	0,072
Kenar	118,9±18,4	139,2±14,9	0,002*
Köşe	82,3±26,9	80,5±24,2	0,837
İlk giriş zamanı (sn)			
Merkez	25,2 (12-56) [#]	36,6 (12-121) [#]	0,094
Kenar	19,6 (14-37) [#]	22 (4-53) [#]	0,956
Köşe	22,6±9,9	28,6±20,8	0,310
Alınan toplam mesafe (cm)	1786,8 (6-2248) [#]	1914,2 (1462-2240) [#]	0,119
Hız (cm/sn)	5,9±1,1	6,4±0,9	0,174
Hareketli olduğu toplam süre (sn)	210,3 (149-220) [#]	215,7 (187-240) [#]	0,051
Hareketsiz kaldığı toplam süre(sn)	89,7 (80-151) [#]	84,1 (60-113) [#]	0,051

[#] non parametrik dağılım ölçüsü ortanca (en küçük-en büyük değer) olarak sunulmuştur ve iki bağımsız grup karşılaştırması *Mann Whitney U* test edilmiştir. Gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Parametrik olan iki bağımsız grup karşılaştırmaları *t*-testi ile yapılmıştır, gruplar arasındaki anlamlılık $p < 0,01$ * ile ifade edilmiştir. Parametrik veriler ortalama±ss olarak sunulmuştur.





Grafik 3: Deney gruplarındaki farelerin OFT’deki davranış yanıtlarının grafik ile gösterilmesi (Bkz; Tablo 9’un altındaki açıklamalar).

4.4. Yükseltilmiş Artı Labirent Test (EPM) Sonuçları

OTC ve IVC'de barındırılan deney grubundaki erkek farelere, P 77'inci gün anksiyete davranışlarını incelemek üzere, EPM yapıldı. EPM alanlarındaki (merkez, kapalı ve açık kollar) frekans, kalış süreleri, ilk giriş zamanları, hızları ve aldıkları toplam mesafe açısından veriler elde edilmiştir. Normal dağılım göstermeyen veriler *Mann Whitney U* test ile, normal dağılım gösteren veriler ise *t*-test ile değerlendirilmiştir (Tablo 10, Grafik 4).

Frekans

EPM, merkez ve kapalı kollar alanında frekans açısından gruplar arası anlamlı fark yok iken ($p>0,05$), sadece bir açık kol alanında IVC deney grubu, OTC deney grubuna göre daha yüksek frekans bulundu ($p<0,001$).

Kalış Süreleri

EPM test alanında kalış süresi bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$).

İlk Giriş Zamanları

EPM alanlarına ilk giriş zamanı bakımından kapalı ve açık kollarda anlamlı bir fark bulunamazken ($p>0,05$), IVC sistemde barındırılan fareler, OTC'de barındırılan farelere göre merkez alanına ilk giriş daha geç olmuştur ve istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).

Aldıkları Toplam Mesafe ve Hız

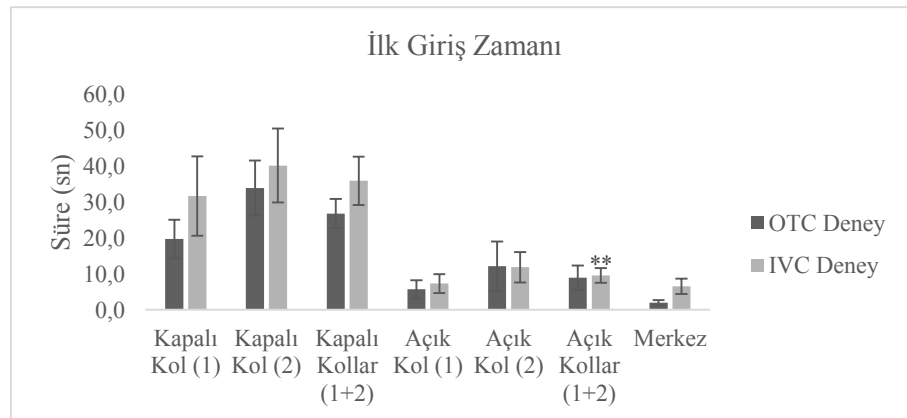
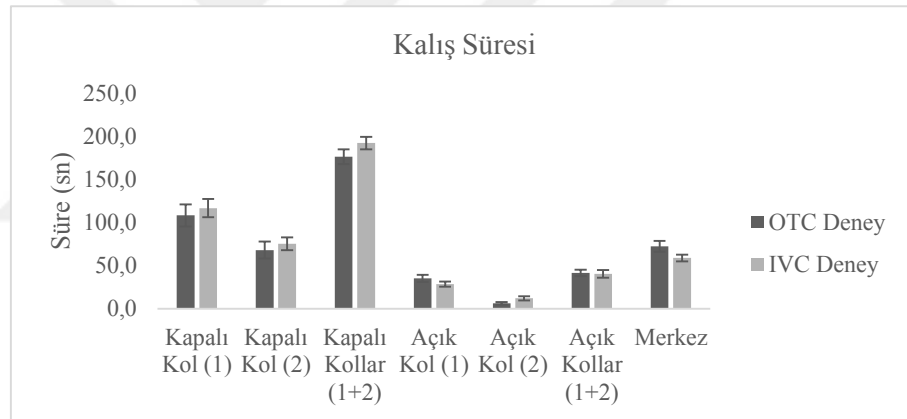
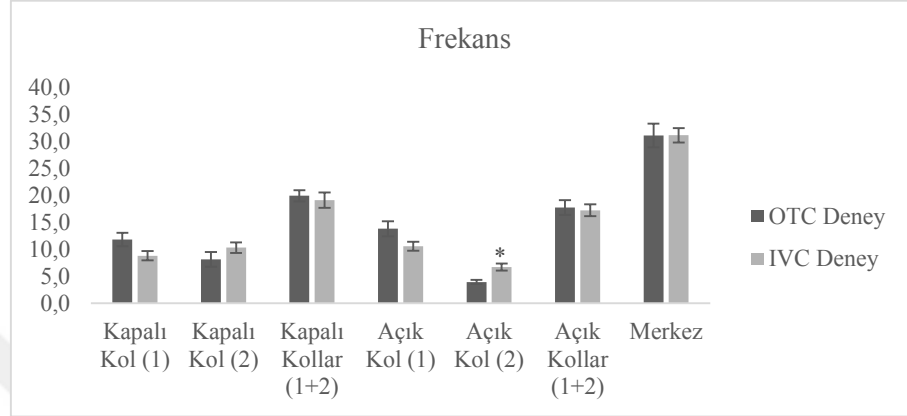
EPM test alanındaki, alınan toplam mesafe ve hız açısından iki grup arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi ($p>0,05$).

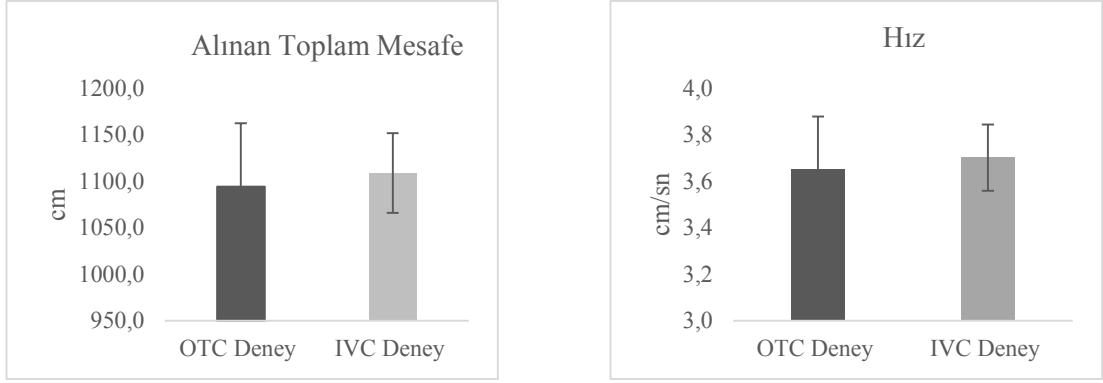
Tablo 10: Deney gruplarındaki farelerin EPM testindeki davranış yanıtları.

	OTC (n=16)	IVC (n=16)	p değeri
Frekans			
Kapalı Kol (1)	11,8±5,1	8,8±3,4	0,058
Kapalı Kol (2)	8,1±5,4	10,3±3,9	0,202
Kapalı Kollar (1+2)	19,9±4,2	19,1±5,7	0,651
Açık Kol (1)	13,8±5,6	10,6±3,3	0,054
Açık Kol (2)	3,9±1,6	6,7±2,6	0,001*
Açık Kollar (1+2)	17,8±5,5	17,3±4,3	0,778
Merkez	31,1±8,8	31,2±5,3	0,981
Kalış süresi (sn)			
Kapalı Kol (1)	108,3±50,8	116,8±42,2	0,612
Kapalı Kol (2)	68,1±39,2	75,5±29,8	0,551
Kapalı Kollar (1+2)	176,4±34,2	192,3±29	0,167
Açık Kol (1)	35,2±16,7	28,4±11,8	0,194
Açık Kol (2)	4,2(1-20) [#]	9,2(1-38) [#]	0,289
Açık Kollar (1+2)	41,6±15,5	40,5±18,1	0,856
Merkez	72,3±25,4	58,9±15,6	0,081
İlk giriş zamanı (sn)			
Kapalı Kol (1)	12,7(2-83) [#]	14,1(0-141) [#]	0,925
Kapalı Kol (2)	20,0(1-99) [#]	28,2(1-165) [#]	0,651
Kapalı Kollar (1+2)	19,5(7-53) [#]	27,3(9-100) [#]	0,407
Açık Kol (1)	0,9(0-35) [#]	1,7(0-34) [#]	0,339
Açık Kol (2)	1,4(0-98) [#]	1,1(0-58) [#]	0,651
Açık Kollar (1+2)	2,6(1-49) [#]	10,0(1-29) [#]	0,283
Merkez	0,9(0-11) [#]	1,9(0-30) [#]	0,047**
Hız (cm/sn)			
	3,7±0,9	3,7±0,6	0,853
Alınan toplam mesafe (cm)			
	1094±272	1108,7±171,3	0,856

non parametrik dağılım ölçüsü ortanca (en küçük-en büyük değer) olarak sunulmuştur ve iki bağımsız grup karşılaştırması *Mann Whitney U* test edilmiştir. Gruplar arasında anlamlı bir fark var ise $p < 0,05$ ** ile gösterilmiştir.

Parametrik olan iki bağımsız grup karşılaştırmaları *t*-testi ile yapılmıştır, gruplar arasındaki anlamlılık $p < 0,05$ * ile ifade edilmiştir. Parametrik veriler ortalama $\pm$ ss olarak sunulmuştur.





Grafik 4: Deney gruplarındaki farelerin EPM testindeki davranış yanıtlarının grafik ile gösterilmesi (Bkz; Tablo 10'un altındaki açıklamalar).

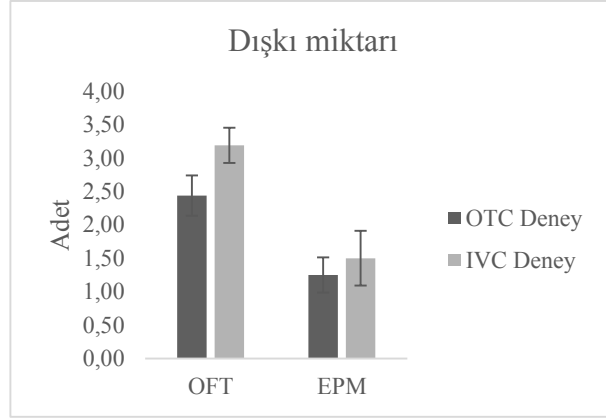
4.5. Dışkılama Sayısı

OTC ve IVC'de barındırılan deney grubundaki erkek fareler P 70'inci gün OFT ve P 77'inci gün EPM testleri yapıldı. Testler süresince farelerin defekasyon miktarı incelenmiştir. Veriler normal dağılım göstermediği için *Mann Whitney U* test ile değerlendirildi (Tablo 11, Grafik 5). Dışkı miktarı bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$).

Tablo 11: Deney gruplarındaki farelerin OFT ve EPM test alanlarındaki dışkılama sayısı.

Gruplar	Hayvan sayısı (n)	Davranış test alanında bulunan dışkı miktarı (adet)	
		OFT	EPM
OTC Deney	16	2,5(1-4)	0,5(0-4)
IVC Deney	16	3(1-5)	1(0-4)
p değeri	N=32	0,104	0,660

Non parametrik iki bağımsız grup karşılaştırması *Mann-Whitney U* ile test edilmiştir. Veriler ortanca (en küçük değer-en büyük değer) olarak sunulmuştur.



Grafik 5 : Deney gruplarındaki farelerin OFT ve EPM test alanlarındaki dışkılama sayısının grafikte gösterilmesi (Bkz; Tablo 11'in altındaki açıklamalar).

4.6. Kuyruk Çekme Testi (*Tail-Flick Test*) Yanıtları

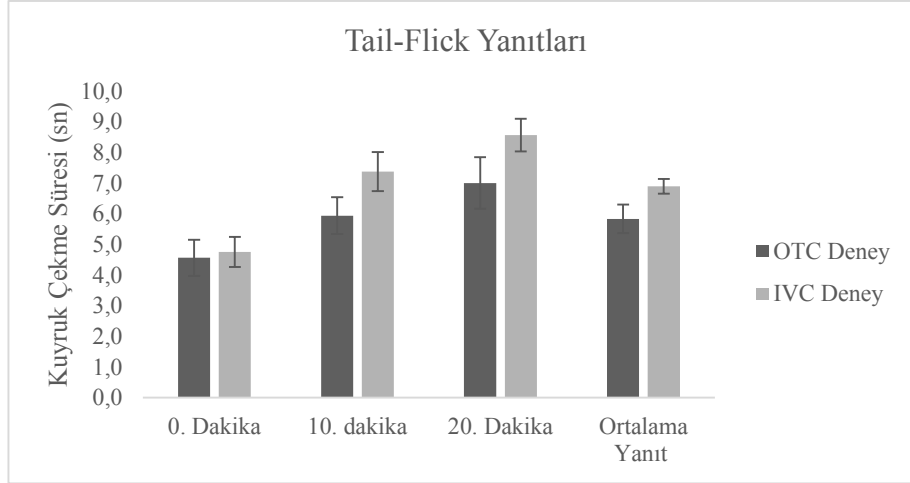
OTC ve IVC'de barındırılan deney grubundaki erkek fareler P84'üncü gün ağrı eşiği ölçülmesi amacıyla tail-flick testi yapıldı. Normal dağılım göstermeyen veriler *Mann Whitney U* test ile, normal dağılım gösteren veriler *t*-test ile değerlendirilmiştir (Tablo 12, Grafik 6). Ardışık olarak 0. 10. ve 20. dakikalarda yapılan testlerde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0,05$).

Tablo 12: Deney gruplarındaki farelerin kuyruk çekme (*tail-flick*) yanıtları.

Gruplar	Hayvan sayısı (n)	Kuyruk Çekme Yanıtları (sn) (ortalama±ss)			Ortalama Yanıt
		0. dakika	10. dakika	20. dakika	
OTC	16	4(2-11)	5,5(3-10)	7±3,4	7(3-8)
IVC	16	4(2-9)	7(4-11)	8,6±2,1	6,8(6-9)
p değeri	N=32	0,605	0,091	0,129	0,255

Non parametrik dağılım ölçüsü ortanca (en küçük-en büyük değer) olarak sunulmuştur ve iki bağımsız grup karşılaştırması *Mann Whitney U* test edilmiştir. Gruplar arasında anlamlı bir fark yoktur, $p > 0,05$.

Parametrik olan iki bağımsız grup karşılaştırmaları *t*-testi ile yapılmıştır, gruplar arasında anlamlı fark bulunamamıştır, $p > 0,05$. Parametrik veriler ortalama±ss olarak sunulmuştur.



Grafik 6: Deney gruplarındaki farelerin kuyruk çekme (*tail-flick*) yanıtlarının grafik ile gösterilmesi (Bkz; Tablo 12'nin altındaki açıklamalar).

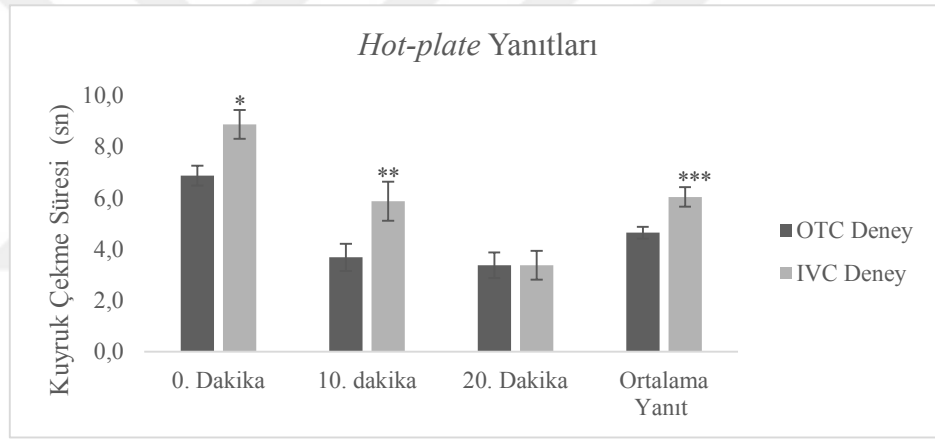
4.7. Sıcak Plaka Testi (*Hot-Plate Test*) Yanıtları

OTC ve IVC'de barındırılan deney grubundaki erkek farelere P 85'inci günde ağrı eşiği ölçülmesi amacıyla hot-plate testi yapıldı. Normal dağılım gösteren veriler *t*-test ile, normal dağılım göstermeyen veriler ise *Mann Whitney U* test ile değerlendirildi (Tablo 13, Grafik 7). Ardışık olarak 0. 10. ve 20. dakikalarda yapılan testlerde; gruplar arasında 0. ve 10. dakikada IVC kafeste barındırılan farelerin arka ayak reaksiyonundaki süre daha uzun iken (sırasıyla $p < 0,01$, $p < 0,05$), 20. dakikada anlamlı bir farkın olmadığı saptandı ($p > 0,05$). Ancak ardışık üç ölçümün ortalamasına bakıldığında, IVC gruptaki fareler termal uyarıya daha gecikmeli yanıtlar verirken, OTC grubundakilerin daha hızlı yanıt verdiği tespit edildi ($p < 0,01$).

Tablo 13: Deney gruplarındaki farelerin *hot-plate* reaksiyon yanıtları.

Gruplar	Hayvan sayısı (n)	Sıcak Plaka Testi Yanıtları (saniye) (ortalama±ss)			
		0. Dakika	10. Dakika	20. Dakika	Ortalama Yanıt
OTC	16	6,9±1,6	2,5(2-8)	2,5(1-9)	4,3(4-7)
IVC	16	8,9±2,3	6(2-13)	3(1-9)	5,6(4-9)
p değeri	N=32	0,007*	0,023**	0,862	0,003***

Parametrik olan iki bağımsız grup karşılaştırmaları *t*-testi ile yapılmıştır, gruplar arasındaki anlamlılık $p < 0,01$ * ile ifade edilmiştir. Parametrik veriler ortalama±ss olarak sunulmuştur. Non parametrik dağılım ölçüsü ortanca (en küçük-en büyük değer) olarak sunulmuştur ve iki bağımsız grup karşılaştırması *Mann Whitney U* test edilmiştir. Gruplar arasında anlamlı bir fark var ise $p < 0,05$ **, $p < 0,01$ *** ile gösterilmiştir.



Grafik 7: Deney gruplarındaki farelerin *hot-plate* reaksiyon yanıtlarının grafik ile gösterilmesi (Bkz; Tablo 13'ün altındaki açıklamalar).

4.8. Adrenal Bez Ağırlığı Ölçümleri

OTC ve IVC'de barındırılan *naive* kontrol ve deney grubundaki erkek fareler P105'inci günde sakrifiye edildikten sonra, sağ ve sol adrenal bez ağırlıkları tartıldı. Adrenal bez ağırlıkları sol, sağ, ortalama ve adrenal bez ağırlığı/ vücut ağırlığı oranı Tablo 14 ve Grafik 8'de gösterilmektedir. Tüm veriler normal ve homojen dağılım gösterdiği için, grup karşılaştırmaları *one-way ANOVA* ve *post-hoc Bonferroni* ile test edildi. Tüm gruplardaki parametrelerde (sol, sağ, ortalama ve adrenal bez ağırlığı/

vücut ağırlığı oranı) istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu (sırasıyla $p<0,05$, $p<0,0001$, $p<0,001$, $p<0,0001$).

OTC Naive Kontrol ile IVC Naive Kontrol Gruplarındaki Adrenal Bez Ağırlık Değişimleri

Adrenal bez ağırlığı/ vücut ağırlığı oranında bir fark bulunmazken ($p>0,05$), IVC *naive* kontrol grubunun OTC *naive* kontrol grubuna göre sol adren ($p<0,05$), sağ adren ($p<0,001$) ve ortalama adrenal bez ağırlığı ($p<0,001$) istatistiksel olarak daha yüksek bulundu.

OTC Naive Kontrol ile OTC Deney Gruplarındaki Adrenal Bez Ağırlık Değişimleri

OTC sistemde barındırılan *naive* kontrol grup, deney grubuna göre sol adren ağırlığında anlamlı bir fark olmamasına karşın ($p>0,05$), OTC *naive* kontrol grubun sağ adren ağırlığı istatistiksel olarak daha düşüktür ($p<0,001$). OTC *naive* kontrol grubun ortalama adrenal bez ağırlığı OTC deney grubuna göre anlamlı olarak daha düşük iken ($p<0,05$), adrenal bez ağırlığı/ vücut ağırlığı oranı *naive* kontrol grubunun deney grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksektir ($p<0,05$).

IVC Naive Kontrol ile IVC Deney Gruplarındaki Adrenal Bez Ağırlık Değişimleri

IVC deney grubu ile IVC *naive* kontrol grubuna göre adrenal bez ağırlığı/ vücut ağırlığı oranı anlamlı olarak yüksektir ($p<0,05$).

OTC Deney ile IVC Deney Gruplarındaki Adrenal Bez Ağırlık Değişimleri

IVC deney grubu, OTC deney grubuna göre adrenal bez ağırlığı/ vücut ağırlığı oranı anlamlı olarak daha yüksektir ($p<0,0001$).

Tablo 14: *Naive* kontrol ve deney grubundaki farelerin adrenal bez ağırlıkları.

Gruplar	Hayvan sayısı (n)	Adrenal bez ağırlığı (ortalama±ss)			Adrenal bez ağırlığı/ Vücut ağırlığı oranı (mg/g)
		Sol (mg)	Sağ (mg)	Ortalama Adrenal bez ağırlığı (mg)	
OTC <i>Naive</i> kontrol	8	3,08±0,42	2,46±0,37 ⁺	2,77±0,35 ⁺⁺	0,10±0,01 ⁺⁺
OTC Deney	16	3,36±0,41	3,31±0,45	3,34±0,41	0,08±0,01*
IVC <i>Naive</i> kontrol	8	3,77±0,50**	3,49±0,58***	3,63±0,41***	0,08±0,01
IVC Deney	16	3,37±0,47	3,39±0,54	3,38±0,45	0,09±0,01 ⁺⁺⁺
p değeri	N=48	0,03 [#]	0,0001 ^{##}	0,001 ^{##}	0,0001 ^{##}

Parametrik olan bağımsız grup karşılaştırmaları *one-way* ANOVA ile yapılmıştır. Veriler homojen dağıldığı için *post hoc* Bonferroni gösterilmiştir.

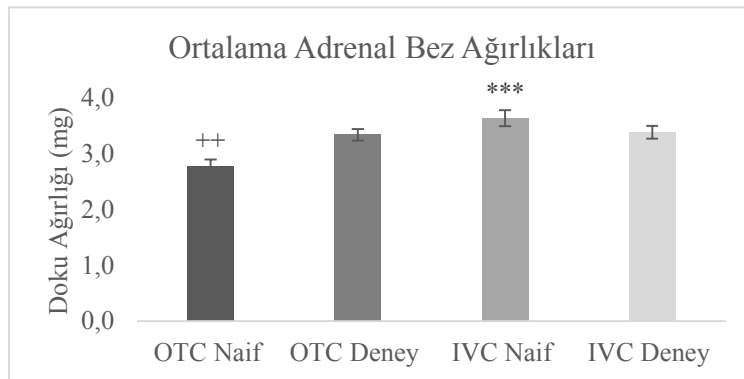
OTC *naive* kontrol ve OTC deney grupları karşılaştırıldığında $p<0,001^+$, $p<0,05^{++}$,

IVC *naive* kontrol ve IVC deney grubu karşılaştırıldığında anlamlı farklılık $p<0,05^{+++}$,

OTC ve IVC deney grupları karşılaştırıldığında $p<0,0001^*$,

OTC ve IVC *naive* kontrol grupları karşılaştırıldığında $p<0,05^{**}$, $p<0,001^{***}$,

Gruplar arasındaki anlamlılık $p < 0,05$ #, $p<0,001$ ## ile ifade edilmiştir.



Grafik 8 *Naive* kontrol ve deney grubundaki farelerin adrenal bez ağırlıklarının grafik ile gösterilmesi (Bkz; Tablo 14'ün altındaki açıklamalar).

4.9. Leptin, Ghrelin, ACTH ve KORT ELISA Analiz Sonuçları

OTC ve IVC'de barındırılan *naive* kontrol ve deney grubundaki erkek fareler P 105'inci gün sakrifiye edildikten sonra kanları alındı, plazmadan leptin, ghrelin, ACTH ve KORT seviyeleri ölçülmüştür. Normal dağılım gösteren veriler *Mann Whitney-U* ve normal dağılım göstermeyen veriler ise *Kruskal-Wallis* testleri ile değerlendirildi. Her bir parametre için, gruplar arası karşılaştırmalar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,0001$) (Tablo 15, Grafik 9).

Leptin Seviyesi

OTC deney grubunun leptin seviyesi, OTC *naive* kontrol ve IVC deney grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak daha yüksek bulundu (sırasıyla $p<0,001$, $p<0,0001$). IVC *naive* kontrol grubu ile OTC *naive* kontrol ve IVC deney grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$).

Ghrelin Seviyesi

OTC sistemde barındırılan *naive* kontrol grubunun ghrelin seviyesi; OTC deney grubuna göre daha yüksek ($p<0,0001$), IVC *naive* kontrol grubuna göre daha düşüktür ($p<0,05$). IVC deney grubu ile IVC *naive* kontrol ve OTC deney grupları arasında bir fark yoktur ($p>0,05$).

ACTH Seviyesi

OTC *naive* kontrol grubunun ACTH seviyesi, IVC *naive* kontrol ve OTC deney grubuna göre düşüktür ($p<0,001$). IVC deney grubunun ACTH seviyesi ise hem IVC *naive* kontrol, hem de OTC deney grubuna göre anlamlı olarak yüksektir (sırasıyla $p<0,01$, $p<0,0001$).

KORT Seviyesi

IVC deney grubunun KORT seviyesi, OTC deney grubuna göre daha yüksektir ($p<0,0001$). OTC *naive* kontrol grubu ile IVC *naive* kontrol ve OTC deney grupları arasında fark bulunmadı ($p>0,05$). IVC *naive* kontrol ve IVC deney grupları arasında da fark yoktur ($p>0,05$).

Tablo 15: *Naive* kontrol ve deney grubundaki farelerin leptin, ghrelin, ACTH ve KORT ELISA analiz sonuçları.

Gruplar	Hayvan sayısı (n)	Biyokimya Analiz Sonuçları			
		Leptin (ng/ml)	Ghrelin (pg/ml)	ACTH (pg/ml)	KORT (ng/ml)
OTC <i>Naive</i> kontrol	8	9,4(8-11)*	61,2(48-77)	28,1(21-32)*	13,84±2,60
OTC Deney	16	14,1(11-16)**	55,7(50-75)**	34,9(25-48)**	13,63±1,26***
IVC <i>Naive</i> kontrol	8	7,9(7-12)	71,2(58-82) ⁺	43,7(37-50) ⁺⁺	15,93±0,82
IVC Deney	16	8,5(7-12)	68,2(58-77)	61,7(31-70) ****	15,86±0,65
p değeri	N=48	0,0001 [#]	0,0001 [#]	0,0001 [#]	0,0001 ^{##}

Non parametrik dağılım ölçüsü ortanca (en küçük-en büyük değer) olarak sunulmuştur ve grupların karşılaştırılmasında *Kruskal-Wallis* Test kullanılmıştır ve anlamlı farklılık $p<0,0001^{\#}$ ile gösterilmiştir.

Non parametrik iki bağımsız grup ortalamaları *Mann Whitney U* Testi kullanılarak karşılaştırılmıştır.

OTC *naive* kontrol ve OTC deney grupları karşılaştırıldığında $p<0,001^*$,

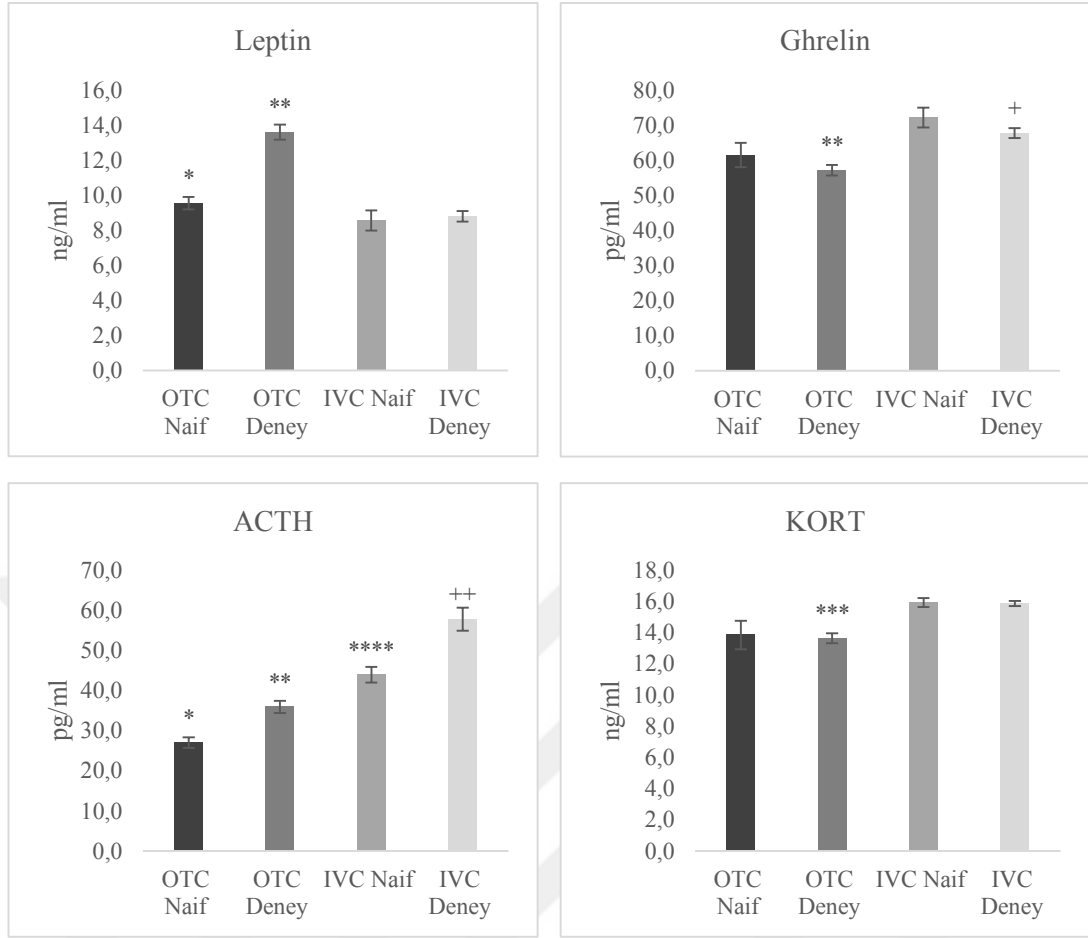
OTC ve IVC deney grupları karşılaştırıldığında $p<0,0001^{**}$,

IVC *naive* kontrol ve IVC deney grubu karşılaştırıldığında anlamlı farklılık $p<0,01^{****}$,

OTC ve IVC *naive* kontrol grupları karşılaştırıldığında $p<0,05^+$, $p<0,001^{++}$,

Parametrik olan bağımsız grup karşılaştırmaları *one-way* ANOVA ile yapılmıştır. Gruplar arasındaki anlamlılık $p<0,0001^{##}$ ile ifade edilmiştir. Veriler heterojen dağıldığı için *post hoc Games-Howell* ile gösterilmiştir.

OTC ve IVC deney grupları karşılaştırıldığında $p<0,0001^{***}$



Grafik 9: *Naive* kontrol ve deney grubundaki farelerin leptin, ghrelin, ACTH ve KORT ELISA analiz sonuçlarının grafikte gösterilmesi (Bkz; Tablo 15'in altındaki açıklamalar).

5. TARTIŞMA

Bu tez kapsamında farelerde farklı barındırma koşullarının davranış, metabolizma, ve özellikle ağırlı yanıtlara duyarlılık değişimleri incelenmiştir. Bu amaçla farelerde yaygın olarak kullanılan konvansiyonel (OTC) ve bariyerli (IVC) sistemler tercih edilmiştir. Laboratuvar hayvanlarında çevre/barınma koşullarının değişimi özellikle hayvan gönenci (refah) açısından önemli bir stres faktörü olup, strese bağlı mekanizmaların tanımlanması davranışsal boyutta incelendi ve ilişkili olabilecek hormonal/metabolik mekanizmaları ile tanımlandı. Bu amaçla bu çalışmamızda, barınma-stres ilişkisi OFT, EFT ve *tail-flick/hot-plate* ağrı testleri gibi davranış testleri ile araştırılarak, ghrelin, leptin, KORT, ACTH gibi ilişkili parametrelerle desteklenmiştir.

Genellikle araştırmalarda kullanılan fareler çalışmaların dizaynına göre soylarına/altsoylarına, cinsiyetlerine, vücut ağırlığı, ve/veya yaşlara göre sınıflandırılarak planlanır ve standart özelliklerde fareler kullanılmaktadır (153,154). Farelerle ilgili yapılan *in vivo* araştırmalarda, üreme hormonlarından dolayı cinsiyet, yaş ve altsoy farklılıklarına bağlı olarak çalışma sonuçları etkilendiği gözlemlenmektedir (155–159). Deneysel tasarımda hayvanlarla ilgili standartların belirlenmesi, istatistiksel test sonuçlarını etkilediği gibi aynı zamanda farklı özelliklerin çalışmalardaki değişkenleri nasıl etkilediğini de gösterir (153). Bu nedenle çalışmamızda dünya genelinde hayvan araştırmalarında yaygın olarak kullanılan *mus musculus* (ev faresi) türünün BALB/c albino altsoyu erkek fareleri kullanılmıştır. Bu tür aynı zamanda, farklı barındırma koşullarını karşılaştırma, IVC kafeslerinin yaygın olarak kullanılması, davranış ve ağrı çalışması modellemelerine uygunluk gibi avantajlar da sağlamaktadır.

Laboratuvarda yetiştirilen farelerin barındırılmasında hayvan refahının sağlanması ve fenotipik özelliklerinin korunması açısından, OTC ve IVC tercih edilen kafes sistemleridir. Vücut ağırlığının barınma koşuluna göre değişiklik gösterildiği araştırmalar da belirtilmiştir (160). OTC kafeslerdeki mikroçevre ortamı statik olarak hava akışı sağlarken, IVC kafeslerde mekanik olarak sağlanmaktadır. OTC kafeslerindeki düşük hava hızı kafes içindeki amonyak, nem ve CO₂ miktarlarını arttırmaktadır. IVC kafesler de ise hava akışının yüksek olması ile OTC kafeslerdeki

olumsuz nitelendirilebilir ortam koşullarını ortadan kaldırmıştır. Ayrıca OTC kafeslerde barındırılan farelerin su tüketimleri ve kilo alımları, IVC kafeslerde barındırılan farelere oranla daha düşük olduğu gözlenmiştir (161). Bu çalışmanın tam tersi bir durumun da gözlemlendiği çalışma mevcuttur. IVC kafes sisteminde barındırılan farelerin, OTC kafes sisteminde barındırılan farelere kıyasla vücut ağırlıkları önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır (145). Motorlu olan IVC sistemleri hava besleme ünitesi çalışırken, motorsuz olan IVC kafes sistemlerin de ise hava besleme ünitesi çalışmamaktadır. Bir çalışmada, motorlu ve motorsuz IVC kafes sistemlerinde 87 gün boyunca barındırılan erkek farelerin vücut ağırlığı, motorlu IVC'lerde barındırılan farelerde, motorsuz IVC'lerde barındırılan farelere göre önemli ölçüde daha düşük bulunmuştur. Buna karşın, iki grup tarafından tüketilen yem miktarlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (10). Araştırmalarda sıklıkla kullanılan diğer bir laboratuvar hayvanı olan sıçanlarda ise durum biraz daha farklıdır. Kostomitsopoulos ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptığı çalışmada IVC ve OTC sistemlerde barındırılan P 21 gün yaştaki erkek Wistar sıçanların büyümesini çok etkilemese de, özellikle puberte döneminde yem tüketiminde önemli farklılıklar olduğu gözlenmiştir. OTC ve IVC kafeslerin farklı mikroçevre koşullar sağlaması sıçanlarda vücut ağırlığında değişikliğe sebep olmamıştır (142).

Araştırmamızdaki OTC ve IVC farklı iki sistemde barındırılan tüm *naive* kontrol ve deney gruplarında farelerde vücut ağırlığında değişimlerin olduğu tespit edildi. OTC *naive* kontrol ve deney grupları arasında fark olmaması, alandaki bulunma süresi, alan değişikliği, manipülasyon (tutma, test alanına koyma, daha fazla insana maruz kalma süresi) veya bilinmeyen olası değişkenlerin etkisi gibi, prosedürlerin herhangi bir etkisinin olmadığını göstermektedir. OTC ve IVC sistemlerde barındırılan *naive* kontrol ve deney gruplarındaki anlamlılık, farklı yaşam alanlarının etkisi olduğunu göstermektedir. IVC *naive* kontrol grubunun, OTC *naive* kontrol grubuna göre yüksek vücut ağırlığı artışı; makroçevre ve mikroçevrenin etkisinden kaynaklı olduğunu ifade eder. Özellikle IVC sistemlerde barındırılan farelerin OTC grubundaki farelere göre kilo alımlarının her dönemde artması, yeme ihtiyacını ve besin tüketiminin yüksek olduğunu göstermektedir. Bu durum yaşam alanının önemini vurgulamaktadır. IVC sistemlerde barındırılan deney grubundaki fareler, IVC *naive* kontrol grubundaki farelere oranla fazla kilo alımı da prosedürlere bağlı stres faktörünün vücut ağırlığının

artışına bir etkisi olduğunu belirtmektedir. Farklı kafes sisteminde barındırılan farelerin yaşam alanlarındaki gürültü ve titreşim miktarındaki farklılıklar, bu farelerin kilo alımındaki farklılığa etkisinin bulunması olasıdır. Yaşam alanındaki gürültü kaynaklarına bağlı bir etkiyi çalışmamızda araştırılmamış olsak da, bu etkinin kilo alımlarındaki değişikliğin aydınlatılabilmesi için daha fazla araştırılması gerekmektedir.

Hayvanların barındırılmasına bağlı olarak gelişebilecek stresin, vücut sıcaklığı gibi metabolik faktörleri etkilediği gösterilmiştir. Takao ve arkadaşları 2016 yılında farelerde yaptıkları çalışmada, testten önce farelerin kafesten çıkarılma sıralamasına bağlı olarak gelişen stresin hipertermiyi indüklediğini göstermişlerdir (144). Çalışmamızda deney ve *naive* kontrol gruplarından OTC kafes sisteminde barındırılan farelerin vücut sıcaklıkları, IVC kafes sistemlerinde barındırılan farelere oranla düşük bulunmuştur. Bu durum farklı kafeslerde barındırılan farelerin yaşam alanlarındaki strese bağlı değişimi göstermektedir. Ayrıca IVC deney grubunda bulunan farelerin, IVC *naive* kontrol grubuna göre hipertermik olmaları çalışma süresince uygulanan prosedürlerin de stres oluşturduğunun ve strese bağlı vücut sıcaklığında artışa işaret ediyor olabilir. OTC deney ve *naive* kontrol grubundaki farelerin termoregülasyon bakımından benzer sonuçların çıkmış olması, konvansiyonel kafeslerde barındırılan farelerin, metabolik açıdan prosedürlere daha az stresli bir yanıt vermiş olduklarını göstermiş olabilir.

Farklı kafes sistemleri farelerde, anksiyete davranışlarını değerlendirmek için kullanılan davranış testlerinin sonuçları üzerinde bir etkisi olduğu belirtilmiştir. Bu etki cinsiyete göre değişiklik göstermekle birlikte, OTC ve IVC kafeslerinde barındırılan dişi ve erkek BALB/c farelerde cinsiyete bağlı anksiyetesi farklı düzeyde gözlemlenmiştir (9). Cinsiyet etkisinin yanı sıra, deneysel araştırmalarda kullanılan farelerin genetik altyapısı da anksiyete değerlendirmesinde kullanılan açık alan test sonuçlarını etkilediği bildirilmiştir (156,162). Yapılan farklı araştırmalarda ise; OTC ve IVC kafes sistemlerinde barındırılan farklı genotipe sahip farelerin davranışsal fenotip özelliklerini çok değiştirmedeği belirtilirken (163), aynı genotipe sahip farelerde kısmen de olsa davranışsal özelliklerde farklılık olduğu gösterilmiştir (40). IVC kafes sistemlerinde kafes içine temiz hava akışı, firma tedarikçilerine göre

farklılıklar olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu farklılıklar IVC kafes sistemlerindeki kafes içine verilen hava akışının bazı firmalarda hayvan seviyesinde olurken, bazı tedarikçiler de temiz hava girişi kafesin üst kısmından olmaktadır. IVC sistemde barındırılan BALB/c farelerin bu iki farklı tedarik edilen kafeslerin anksiyete etkisi bulunmamıştır (37). Ayrıca çevresel faktörlerden; kafes ebatları, kafeslerin yapısı, kafeste bulunan hayvan sayısı, kafes altlığı, kafes zenginleştirme materyalleri gibi parametreler, laboratuvar hayvanlarının fizyolojik ve davranışsal gelişimlerini etkilemektedir (30,164,165).

OFT, kare şeklindeki bir kutu içerisine yerleştirilen kemirgenlerin, kamera kullanılarak test alanında merkezi ve periferel bölgelerdeki lokomotor aktiviteleri ile anksiyete seviyelerinin analizini yapmak için davranışlarının izlendiği bir testtir (166). Çalışmamızda OFT test alanında IVC kafes sistemlerinde barındırılan deney grubu fareler alanda daha fazla keşif yapması, daha hareketli ve daha hızlı olduğu gözlemlenmiştir. IVC grubu fareler, OTC grubu farelere göre tigmotaksis davranışı daha çok göstermişlerdir. IVC grubu farelerin kenarlarda kalma sürelerinin fazla oluşu anksiyetelerinin daha yüksek olduğunu göstermekte, çalışma sonucunda beklediğimiz bir davranış şeklidir. Yine aynı gruptaki farelerin kenar ve köşe frekanslarının yüksek olması IVC kafeslerde barındırılan farelerin daha fazla stresli olduğunu göstermekle birlikte, hipotezimizi desteklemektedir.

EPM test diğer davranışsal testlerden biri olmakla birlikte, kemirgenlerin açık alanların/yüksekliklerinin kaygısı veya korkusu ölçülmektedir. Anksiyetesi yüksek olan kemirgenler açık kollardan kaçınır ve kemirgenler zamanın çoğunu kapalı kollarda geçirirler (123). IVC kafeste barındırılan fareler, OFT test alanında da benzer davranışlar sergileyerek, anlamlı sonuç olmamasına karşın, test alanında daha fazla yol kat etmişlerdir. IVC gruptaki fareler OTC grubundaki farelere kıyasla kapalı kollarda daha fazla kalmış olup, kapalı kollara ilk giriş zamanı daha geç olmuştur. Açık kollarda ise daha az vakit geçiren IVC gruptaki fareler, açık kollara ilk giriş süreleri de gecikmelidir. Merkez alanında daha az süreyle kalan IVC grubu fareler, anlamlı farklılık göstererek merkeze ilk girişleri oldukça geç bir sürede gerçekleşmiştir. Her iki grubun test alanındaki hızlarının ve frekansların eşit olması, IVC grubu farelerin daha fazla kapalı kollarda vakit geçirerek alanda daha fazla yol kat etmiş olmaları, IVC

grubu farelerin anksiyetesinin daha yüksek olduğunu gösteriyor olabilir. Bu durum farelerde davranış testi sonuçlarını değerlendirilirken, yaşamsal alanlarının yani barınma koşullarının dikkate alınmasının önemini vurgulamaktadır.

Çalışma sonuçlarımızı destekleyen, Pasquarelli ve arkadaşlarının 2017 yılında yapmış oldukları çalışmada; OTC ve IVC kafes sistemlerinde barındırmanın etkilerini OFT ve EPM’de test ederek analiz etmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, IVC’de barındırılan laboratuvar farelerinde stresin daha fazla olduğu bulunmuştur (145). Alan keşfi ve stres benzeri davranışları değerlendirmek için kullanılan davranış testlerinin sonuçları, farklı kafes sistemlerinin fareler üzerinde bir etkisi olabileceği belirtilmiştir (40). Davranış testlerimizle uyumlu olan bu araştırma ile farelerde davranış testi sonuçlarını rapor ederken, analiz ederken ve/veya sistematik olarak gözden geçirirken barınma koşullarını dikkate almak önemlidir (9) (39).

Çalışmamızda anksiyete değerlendirmesi için kullanmış olduğumuz OFT ve EPM test alanlarındaki dışkılama miktarı da anksiyetenin seviyesini göstermek için kullanılmaktadır (124) (146) (124). OFT ve EPM test alanlarındaki dışkılama miktarı sonuçları anlamlı olmasa da, IVC sistemde barındırılan farelerin sayısal olarak daha fazla olduğu saptanmıştır. Çalışmamıza benzer sonuçları olan; Mineur ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, IVC sistemde barındırılan BALB/c erkek farelerin OFT test alanında daha fazla dışkı miktarı ölçülmüştür (9). Bir diğer çalışmada ise iki farklı IVC sistemde barındırılan farelerin OFT ve EPM test alanındaki anksiyete seviyeleri ölçülmüş ve bu test alanlarındaki dışkı sayısı kaydedilmiştir. Daha stresli olan farelerde, davranış test alanlarındaki dışkılama sayısında artış olduğunu göstermişlerdir (37). Bu durum, barındırma sistemlerinin kemirgenlerdeki anksiyete düzeyine olan etkisi ile açıklanabilir.

Stresin vücuttaki etkisi ile ilgili ilk tanımlama, Cannon tarafından 1900’lü yılların başında yapılmıştır. Cannon aynı zamanda ‘‘homeostasis’’ kavramını/teorisini de ilk tanımlayan araştırmacılardan biridir (167). Streste vücudun yanıt vermesini sağlayan nöroendokrin yapı HPA eksenidir (84). Stres oluştuğunda omurilik veya ön beyindeki limbik bölgeleri aktive eder. Hipotalamusun paraventriküler çekirdeğindeki hipofizyolojik nöronların aktive olması ve kortikotropin salgılatıcı hormon etkisiyle ön hipofizden ACTH salgılanması başlar (82) (83). Stresle birlikte aktivitesi artan

HPA eksen nedeniyle, KORT düzeyinde ve adrenal bez ağırlığı artar (168). Çalışmamızda IVC kafes sistemlerinde barındırılan deney grubu fareler; hem aynı tip kafes sisteminde barındırılan IVC *naive* kontrol grubu fareler hem de farklı tip kafes sisteminde barındırılan OTC deney grubu farelere göre adrenal bez ağırlığı/vücut ağırlığı oranı oldukça yüksek bulunmuştur. Hem çalışmamızdaki prosedürlerin, hem de farklı yaşam alanının hayvanlarda strese verdiği cevap olarak bu oranın yüksek bulunması hipotezimizi desteklemektedir. Ayrıca OTC deney grubunun, OTC *naive* kontrol grubu arasındaki tek farkın prosedürlerin etkisi olduğu ve strese bağlı adrenal bezin ortalama ağırlığında OTC deney grubunda daha yüksek olduğu ile deneysel sürecin strese sebebiyet verdiğini doğrulamaktadır. IVC *naive* kontrol grubunun sağ, sol ve ortalama adren ağırlığının OTC *naive* kontrol grubuna göre yüksek bulunması yaşam alanlarının hayvanlar üzerindeki stresin etkisini göstermektedir.

HPA eksenin aktivitesinin artması ile ACTH ve KORT seviyesinin değiştirmesinin yanı sıra, gıda alımı ile ilişkili leptin ve ghrelin hormonları üzerinde de etkisi bulunmaktadır (168) (169). Normal koşullardaki hayvanlarda ghrelin miktarı düşük konsantrasyonlarda olduğu belirtilmiştir. Stresin varlığı ile plazma ghrelin miktarında artış gözlenir ve bu anksiyete seviyesi ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ghrelinin anksiyete benzeri davranış üzerindeki bu farklı rolleri ile ilgili yeterli bir araştırma olmasa da, hayvanlarda stresli bir durumla başa çıkmak için ghrelin seviyesindeki bu ani değişimler olduğu düşünülmektedir. Ghrelin varlığı ile, ön hipofizden ACTH salınımını uyardığı, ardından strese yanıt olarak glukokortikoid negatif geri beslemesini azalttığı belirtilmiştir (170). Glukokortikoidlerin fazla salgılanması, hipokampal atrofiyi uyarak hafıza kaybına yol açabilmekte ve gıda alımını uyarak aşırı kilo alımına yol açar. HPA eksenindeki bu düzensizlik anksiyeteye yatkınlık yaratır. Bu nedenle, ghrelinin HPA eksenini düzenleme yeteneği, normal stres yanıtı oluşturabilir ve bozulmuş ghrelin uyarımları ile anksiyete bozukluklarını hızlandırabilir (170) (171). Strese bağlı ghrelin salgılanmasının nedeni tam olarak bilinmese de, ghrelin düzeyinin stresle birlikte arttığı ve bu durum gıda alımını arttırdığı düşünülmektedir (172). Ghrelin'in enerji metabolizması ile ilgili hipotalamik ve hipotalamik olmayan etkileri bulunmaktadır (173). Strese maruz kalan farelerde, düşük yağlı diyetle beslenmelerine rağmen, kalori alımında artışa neden olmuştur (174). Stres kaynaklı bir kilo alımında artış gözlemlenirken, kronik stresli

farelerin yağ kütlesinde genel bir kayıp ve daha düşük yağlanma durumu gözlemlenmiştir (175). Çalışmamızdaki tüm grupların plazma ghrelin seviyesi anlamlı olarak farklı bulunmuştur. IVC deney ve *naive* kontrol gruplarındaki farelerin, OTC deney ve *naive* kontrol gruplarındaki farelere kıyasla plazma ghrelin seviyeleri yüksek bulunmuş, çalışma süresince kilo artışı da fazla olduğu gözlenmiştir. Yaşam alanlarının farelerde strese yol açtığı düşünülerek, daha fazla gıda tüketim ihtiyacı doğmuş olabileceğini düşünmekteyiz. OTC deney grubu farelerin ghrelin seviyeleri anlamlı olmasa da OTC *naive* kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. Aynı şekilde IVC deney grubu farelerin de IVC *naive* kontrol grubuna göre daha düşük olduğu görülmüştür. Bu durum çalışma süresince uygulanan prosedürlerin gıda alımı ihtiyacını azalttığını göstermektedir. Bu sonuçlarımıza göre, barınma-stres-metabolizma ilişkisindeki hayvan ağırlıklarındaki yansımalarında artan ghrelin ilişkisini mekanistik olarak ortaya koymaktadır.

Leptin seviyesinin, stresle birlikte değiştiğini Holubova ve arkadaşları tarafından 2016 yılında sıçanlarda yaptıkları çalışma ile göstermişlerdir. Stresli hayvanlarda leptin seviyesinin daha düşük olduğunu göstermişlerdir (105). Araştırmamızdaki tüm grupların leptin seviyeleri anlamlı olarak farklı bulunmuştur. IVC kafes sistemlerinde barındırılan deney grubu farelerin leptin seviyesi, OTC kafeslerde bulunan deney grubu farelere kıyasla anlamlı olarak düşük, IVC *naive* kontrol grubu farelere göre anlamlı olmasa da daha yüksektir. OTC deney grubu farelerin de, OTC *naive* kontrol grubuna göre leptin seviyesi sonuçları istatistiksel olarak daha yüksek çıkmıştır. Zamana yayılan çalışma prosedürlerinin leptin seviyesinde artışa neden olduğu ve aynı ghrelinin etkisinde olduğu gibi prosedürlerin yaratmış olduğu strese bağlı gıda alımı ihtiyacını azalttığını desteklemektedir. Bu da, barınma-stres- metabolizma ilişkisindeki hayvan ağırlıklarındaki yansımalarında azalan leptin ilişkisini mekanistik olarak ortaya koymaktadır.

Akut ve uzun dönem stresle birlikte ACTH ve KORT seviyesi önemli ölçüde artmaktadır (105). Çalışmamızdaki IVC kafes sistemlerinde barındırılan farelerin OTC kafes sistemlerinde barındırılan farelere kıyasla yüksek ACTH seviyesine sahip olmaları barındırma koşullarının, prosedürlerin ve öngörülme faktörlerin strese yol açtığını göstermektedir. Aynı kafes sistemlerinde barındırılan deney grubu farelerin,

naive kontrol gruplara göre daha fazla ACTH miktarının olması ile prosedürlerin fareler üzerinde stres yaratmış olduğunu doğrulamaktadır. Ayrıca plazma KORT seviyesinin de, IVC deney grubundaki farelerde OTC deney gruba göre anlamlı olarak yüksek olması, barındırma koşullarının farelerin stres seviyeleri bakımından ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Bundgaard ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptıkları çalışmada, farklı kafes tiplerinde barındırılan fareler arasında dışkıda KORT miktarında anlamlı bir fark bulmamışlardır (176). Çalışmamız farklı kafes sistemlerinin farelerdeki ACTH ve KORT seviyelerinin ölçülmesi ile ilgili ilk çalışma olarak, literatüre katkı yapacağını düşünmekteyiz. Belirleyici bilgilere ulaşabilmek için, farklı kafes sistemlerinin hayvanlar üzerine etkisini, hormonal açıdan daha fazla araştırmaların yapılması ile güçlendirilmelidir.

Araştırmamızın hipotezi “farklı kafes sistemlerinde barındırılan farelerin, ağırlı uyaranlara yanıtlarının da farklı olduğu” nu değerlendirmek için nosiseptif testlerden *tail-flick* ve *hot-plate* testlerini uyguladık. Bu iki test ile akut termal ağrı eşiği yanıtları ölçülmektedir. *Tail-flick* testte termal uyarana karşı spinal yanıtları ölçerken, *hot-plate* testi, beyinde nörolojik işlem gerektiren ve akut ısıya tepki olarak arka ayağın kaldırılması ve ardından yalanması ile sonuçlanan daha karmaşık bir davranışı ölçer (177). Çalışmamızdaki *tail-flick* test sonucuna göre anlamlı olarak; IVC grupta barındırılan fareler daha gecikmeli yanıtlar verirken (ort:6,9 sn), OTC grup fareleri verilen termal uyarıya daha hızlı kuyruk çekme yanıtları vermişlerdir (ort: 5,8 sn). *Hot-plate* testinde ise istatistiksel olarak anlamlılık bulunmasa da, hipotezimizi destekleyici bir sonuç bulunmuştur. IVC grupta barındırılan fareler daha gecikmeli yanıtlar verirken (ort:6,0 sn), OTC grup fareleri verilen termal uyarıya daha hızlı arka ayak tepki yanıtları vermişlerdir (ort: 4,6 sn). Farelerdeki barındırılma farklılığına bağlı ağırlı termal uyaranlara yanıtlarda spinal etki daha belirgin olarak farklılık göstermekte iken, merkezi tepkilerde daha az netlik ile kendini göstermektedir. Diğer bulgular ile irdelendiğinde artan stres koşullarının farelerde ağırlı yanıtları geciktirdiğini göstermektedir. Yapılan literatür bilgilerine göre bu iki sistemin barınma-stres-ağrı ilişkisini gösteren bir literatüre rastlanılmamıştır. Ancak daha önceki çalışmalarda, barındırmadan bağımsız olarak, hayvanlarda strese bağlı olarak ağırlı uyaranlara karşı yanıt değişimlerinin olduğunu, ve stresin tepkilerin gecikmesine yol açtığını göstermektedir (178).

Mekanizma ilişkisi olarak incelendiğinde; bu çalışmalarda stres parametreleri olarak, birçok mekanizma incelenmiştir. Bizim çalışma kapsamında barınma-stres ile ilişkili baktığımız parametreler ACTH, KORT, leptin, ghrelin, adren büyüklüğü, davranış-stres-ağrılı uyaran değişiklikleri gösterilmiştir. Ghrelinin antinosiseptif özellikleri daha önceki yapılan çalışmalarda bulunmuştur (145) (170) (171) (179) (180). Bu çalışmadaki sonuçlarda da IVC kafeslerde barındırmanın ghrelin seviyelerini arttırdığı, artan ghrelin seviyesinin hayvanlarda ağırlık artışına sebebiyet verdiği (172), bu bağlamda da ghrelinin ağrılı yanıtlarda ilişkili olduğu mekanizması ileri sürülebilir.

Diğer bir metabolik hormon olan leptinin de tersi mekanizmalarla ağrı ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz. Daha önceki yapılan çalışmalarda leptin seviyesinin strese bağlı olarak leptin seviyesini düşürdüğünü göstermektedir (105) (145). Dolayısıyla ghrelinde bahsettiğimiz mekanizmalara benzer şekilde, ancak düşük seviyelerde etkili olduğunu ve böylelikle, strese bağlı leptin düşüşünün, ağrılı yanıtları geciktirdiğini göstermektedir. Daha önceki çalışmalarda farelere eksojen olarak verilen leptinin akut nosiseptif yanıtları (*hot-plate*) düşürdüğü (181), bizim çalışmamızda da leptin seviyesinin düşüklüğünün bu mekanizma ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar ile; farelerde barındırma koşullarının basit davranışsal bileşenleri, metabolik aktiviteyi ve ağrılı uyaranlara yanıtlarını işlevsel etkileşimler açısından farklı boyutlardaki yapısını kapsamlı bir şekilde sunulmaktadır. Çalışmamız, BALB/c fare türlerinin barındırma koşullarının (OTC ve IVC) akut nosiseptif testler kullanarak, ağrılı uyaranlara tepkisini içeren ilk çalışmadır. Aynı zamanda farklı kafes sistemlerinin farelerde ACTH, KORT, ghrelin ve leptin gibi metabolik hormonların düzeyini inceleyen ilk çalışmadır. Farelerin barındırılmasında kullanılan farklı kafes sistemlerinin, farelerde anksiyete davranışını öne çıkardığı ve buna bağlı olarak, ağrı araştırması ile ilgili yapılacak çalışmaların barındırmaya özgü özelliklerini tanımlamanın yeni, kapsamlı bir bakış açısı sunmaktadır. Ek olarak, bu çalışmada bildirilen sonuçlar, bu iki farklı kafes sistemlerinde yetiştirilen farelerin davranışsal, metabolik ve ağrı uyarımlarına yanıtlarının farklı özellikleri olduğunu ortaya koymaktadır. Bu çalışma ile farelerde davranışı, metabolik aktiviteyi ve ağrıyı içeren çalışmalar yürütülürken, farelerin barındırıldığı kafes sistemlerinin hayvan refahını azaltıp, çalışma sonuçlarını değiştirebileceğini göstermektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Dutta S, Sengupta P. Men and mice: Relating their ages. *Life Sci.* 2016;152:244-248.
2. National Research Council. Use of laboratory animals in biomedical and behavioral research. Washington DC: National Academies Press; 1988.
3. Hrapkiewicz K, Colby LA, Denison P. Clinical Laboratory Animal Medicine: An Introduction. 4. Baskı. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell; 2013.
4. Russell WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique. London: Methuen; 1959.
5. Krohn TC, Hansen AK. Carbon dioxide concentrations in unventilated IVC cages. *Lab Anim.* 2002;36(2):209-12.
6. Li P, Sur SH, Mistlberger RE, Morris M. Circadian blood pressure and heart rate rhythms in mice. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 1999; 276(2): R500-R504.
7. Baumans V, Schlingmann F, Vonck M, van Lith HA. Individually ventilated cages: beneficial for mice and men? *Contemp Top Lab Anim Sci.* 2002;41(1):13-19.
8. David JM, Knowles S, Lamkin DM, Stout DB. Individually Ventilated Cages Impose Cold Stress on Laboratory Mice: A Source of Systemic Experimental Variability. *J Am Assoc Lab Anim Sci JAALAS.* 2013;52(6):738-744.
9. Mineur YS, Crusio WE. Behavioral effects of ventilated micro-environment housing in three inbred mouse strains. *Physiol Behav.* 2009;97(3-4):334-340.
10. Kostomitsopoulos N, Alexakos P, Eleni K, Doulou A, Paschidis K, Baumans V. The effects of different types of individually ventilated caging systems on growing male mice. *Lab Anim.* 2012;41(7):192-198.
11. İde T. Laboratuvar Hayvanları Biliminin Temel İlkeleri. Ankara: Medipres Yayınları, Özkan Matbaacılık; 2003.
12. Gaskill BN, Gordon CJ, Pajor EA, Lucas JR, Davis JK, Garner JP. Impact of nesting material on mouse body temperature and physiology. *Physiol Behav.* 2013;110-111:87-95.
13. Itai M, Kuwano Y, Nishikawa T, Rokutan K, Kensei N. Geranylgeranylacetone prevents stress-induced decline of leptin secretion in mice. *J Med Investig JMI.* 2018;65(1.2):103-109.
14. Abizaid A. Stress and obesity: The ghrelin connection. *J Neuroendocrinol.* 2019;31(7):e12693.
15. Haque Z, Akbar N, Yasmin F, Haleem MA, Haleem DJ. Inhibition of immobilization stress-induced anorexia, behavioral deficits, and plasma corticosterone secretion by injected leptin in rats. *Stress.* 2013;16(3):353-362.

16. Gould TD, Dao DT, Kovacsics CE. Mood and anxiety related phenotypes in mice: characterization using behavioral tests 2. Baskı. New York: Humana press; 2009.
17. Coutinho SV, Plotsky PM, Sablad M, Miller JC, Zhou H, Bayati AI, vd. Neonatal maternal separation alters stress-induced responses to viscerosomatic nociceptive stimuli in rat. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol*. 2002;282(2):G307-316.
18. Butler RK, Finn DP. Stress-induced analgesia. *Prog Neurobiol*. 2009;88(3):184-202.
19. Eide PK, Tjølsen A. Effects of serotonin receptor antagonists and agonists on the tail-flick response in mice involve altered tail-skin temperature. *Neuropharmacology*. 1988;27(9):889-893.
20. Renström A, Björing G, Höglund AU. Evaluation of individually ventilated cage systems for laboratory rodents: occupational health aspects. *Lab Anim*. 2001;35(1):42-50.
21. Gonder JC, Laber K. A Renewed Look at Laboratory Rodent Housing and Management. *ILAR J*. 2007;48(1):29-36.
22. Spangenberg E, Wallenbeck A, Eklöf A-C, Carlstedt-Duke J, Tjäder S. Housing breeding mice in three different IVC systems: maternal performance and pup development. *Lab Anim*. 2014;48(3):193-206.
23. The oxford english-turkish dictionary. 2. Baskı. USA: Oxford University Press; 1978. Research; s.453.
24. Röhrig B, du Prel J-B, Wachtlin D, Blettner M. Types of Study in Medical Research. *Dtsch Arzteblatt Int*. 2009;106(15):262-268.
25. Wikipedia [Internet]. edit: 2021 [30 Haziran 2021]. Erişim adresi: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=In_vivo&oldid=1003940291
26. Quimby FW. Animal models in biomedical research. Fox JG, Anderson LC, Loew FM, Quimby FW, Editörler. *Laboratory animal medicine*. 2. Baskı. Burlington: Academic Press; 2002. 1185-1225.
27. Union E. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union*. 2010; 276: 20.
28. Liu E, Fan J. *Fundamentals of Laboratory Animal Science*. Boca Raton: CRC Press; 2017.
29. Ericsson AC, Crim MJ, Franklin CL. A Brief History of Animal Modeling. *Mo Med*. 2013;110(3):201-205.
30. Kafkafi N, Agassi J, Chesler EJ, Crabbe JC, Crusio WE, Eilam D, vd. Reproducibility and replicability of rodent phenotyping in preclinical studies. *Neurosci Biobehav Rev*. 2018;87:218-232.
31. National Research Council, & National Research Council. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for*

- the care and use of laboratory animals. 8. Baskı. Washington, DC: National Academies; 2011.
32. Suckow M A, Danneman P, Brayton C. The laboratory mouse. Boca Raton: CRC Press; 2001.
 33. Würbel H. Ideal homes? Housing effects on rodent brain and behaviour. *Trends Neurosci.* 2001;24(4):207-211.
 34. Höglund AU, Renström A. Evaluation of individually ventilated cage systems for laboratory rodents: cage environment and animal health aspects. *Laboratory Animals.* 2001; 35(1): 51-57.
 35. Ferrecchia CE, Jensen K, Van Andel R. Intracage Ammonia Levels in Static and Individually Ventilated Cages Housing C57BL/6 Mice on 4 Bedding Substrates. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2014;53(2):146-151.
 36. Morrow RB, Wiler RJ. Ammonia Measurement in the IVC Microenvironment. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2019;58(2):184-189.
 37. Burman O, Buccarello L, Redaelli V, Cervo L. The effect of two different Individually Ventilated Cage systems on anxiety-related behaviour and welfare in two strains of laboratory mouse. *Physiol Behav.* 2014;124:92-99.
 38. Kallnik M, Elvert R, Ehrhardt N, Kissling D, Mahabir E, Welzl G, vd. Impact of IVC housing on emotionality and fear learning in male C3HeB/FeJ and C57BL/6J mice. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc.* 2007;18(3):173-186.
 39. Logge W, Kingham J, Karl T. Behavioural consequences of IVC cages on male and female C57BL/6J mice. *Neuroscience.* 2013;237:285-293.
 40. Polissidis A, Zelelak S, Nikita M, Alexakos P, Stasinopoulou M, Kakazanis Z-I ve arkadaşları. Assessing the exploratory and anxiety-related behaviors of mice. Do different caging systems affect the outcome of behavioral tests? *Physiol Behav.* 2017;177:68-73.
 41. Hooijmans CR, Leenaars M, Ritskes-Hoitinga M. A gold standard publication checklist to improve the quality of animal studies, to fully integrate the Three Rs, and to make systematic reviews more feasible. *Alternatives to Laboratory Animals.* 2010; 38(2): 167-182.
 42. Landis SC, Amara SG, Asadullah K, Austin CP, Blumenstein R, Bradley EW ve arkadaşları. A call for transparent reporting to optimize the predictive value of preclinical research. *Nature.* 2012;490(7419):187-191.
 43. Worp HB van der, Howells DW, Sena ES, Porritt MJ, Rewell S, O'Collins V ve arkadaşları. Can Animal Models of Disease Reliably Inform Human Studies? *PLOS Med.* 2010;7(3):e1000245.
 44. Kilkenney C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biol.* 2010;8(6):e1000412.

45. Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Animal research: Reporting in vivo experiments: The ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol*. 2010;160(7):1577-1579.
46. Haas J, Manro J, Shannon H, Anderson W, Brozinick J ve ark. In vivo assay guidelines. *Assay Guidance Manual* [Internet]. 2012 [29.06.21] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92013/>.
47. Hackam DG, Redelmeier DA. Translation of research evidence from animals to humans. *JAMA*. 2006;296(14):1731-1732.
48. Festing MFW, Altman DG. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. *ILAR J*. 2002;43(4):244-258.
49. Fraser D. Understanding animal welfare. *Acta Vet Scand*. 2008;50(1):S1.
50. Broom DM, Johnson KG, Broom DM. Stress and animal welfare (Vol. 993). 2. Baskı. London: Chapman & hall; 1993.
51. Colby LA, Nowland MH, Kennedy LH. Clinical Laboratory Animal Medicine: An Introduction. 5. Baskı. New Jersey: John Wiley & Sons; 2019.
52. US Department of Health and Human Services. Public Health Service policy on humane care and use of laboratory animals. U.S. Department of Health and Human Services. Arlington, VA: NIH; 2015.
53. Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlar İçin Kullanılan Hayvanların Refah ve Korunmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete. Sayı: 2814113.12.2011.
54. Hayvanları Koruma Kanunu İle Türk Ceza Kanununda. Değişiklik Yapılmasına Dair Kanun. Resmi Gazete. Kanun No. 7332, 09.07.2021.
55. Hollands C. The animals (scientific procedures) act 1986. *Lancet* (London, England). 1986; 2(8497): 32-33.
56. Baertschi B, Gyger M. Ethical Considerations in Mouse Experiments. *Curr Protoc Mouse Biol*. 2011;1(1):155-167.
57. Tannenbaum J, Bennett BT. Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *J Am Assoc Lab Anim Sci JAALAS*. 2015;54(2):120-132.
58. Gruber FP, Hartung T. Alternatives to animal experimentation in basic research. *ALTEX - Altern Anim Exp*. 2004;21(Supp):3-31.
59. MacArthur Clark J. The 3Rs in research: a contemporary approach to replacement, reduction and refinement. *Br J Nutr*. 2018;120(s1):S1-7.
60. Festing MF. Reduction of animal use: experimental design and quality of experiments. *Lab Anim*. 1994;28(3):212-221.
61. Alstrup AKO, Sonne C. 3Rs as part of preclinical neuropsychiatric translational crisis, and ARRIVE guidelines as part of solution. *Acta Neuropsychiatr*. 2019;31(6):348-349.
62. Rebecca WL. Virtue ethics and laboratory animal research. *ILAR journal*. 2020.

63. Guénet J L, Orth A, Bonhomme F. Chapter 1.1 - Origins and Phylogenetic Relationships of the Laboratory Mouse. Hedrich HJ Editor. The Laboratory Mouse. 2. Baskı. Boston: Academic Press; 2012. 3-20.
64. Lutz CM, Linder CC, Davisson MT. Chapter 1.3 - Strains, Stocks and Mutant Mice. Hedrich HJ Editor. The Laboratory Mouse. 2. Baskı. Boston: Academic Press; 2012. 37-56.
65. Gangrade BK, Dominic CJ. Studies of the male-originating pheromones involved in the Whitten effect and Bruce effect in mice. *Biol Reprod.* 1984;31(1):89-96.
66. Dominic CJ. Pheromonal mechanisms regulating mammalian reproduction. *Gen Comp Endocrinol.* 1969;2:260-267.
67. Jacoby RO, Fox JG, Davisson M. Biology and Diseases of Mice. *Lab Anim Med.* 2002;35-120.
68. Fox JG, Barthold S, Davisson M, Newcomer CE, Quimby FW, Smith A. The mouse in biomedical research: normative biology, husbandry, and models. 3. Baskı. Amsterdam: Elsevier; 2006.
69. JoVE Science Education Database. Development and Reproduction of the Laboratory Mouse. Cambridge, MA: JoVE; 2021.
70. Inglis JK. Introduction to laboratory animal science and technology. Oxford: Pergamon; 1980.
71. Hedrich HJ, Nicklas W. Chapter 4.1 - Housing and Maintenance. Hedrich HJ Editor. The Laboratory Mouse. 2. Baskı. Boston: Academic Press; 2012. 521-545.
72. Feistenauer S, Sander I, Schmidt J, Zahradnik E, Raulf M, Brielmeier M. Influence of 5 Different Caging Types and the Use of Cage-Changing Stations on Mouse Allergen Exposure. *J Am Assoc Lab Anim Sci JAALAS.* 2014;53(4):356-363.
73. Reeb-Whitaker CK, Paigen B, Beamer WG, Bronson RT, Churchill GA, Schweitzer IB, Myers DD. The impact of reduced frequency of cage changes on the health of mice housed in ventilated cages. *Lab Anim.* 2001;35(1):58-73.
74. Krohn TC, Hansen AK, Dragsted N. The impact of cage ventilation on rats housed in IVC systems. *Lab Anim.* 2003;37(2):85-93.
75. Krohn TC, Hansen AK. Mice prefer draught-free housing. *Lab Anim.* 2010;44(4):370-372.
76. Baumans V. Environmental enrichment for laboratory rodents and rabbits: requirements of rodents, rabbits, and research. *ILAR J.* 2005;46(2):162-170.
77. Swetter BJ, Karpiak CP, Cannon JT. Separating the effects of shelter from additional cage enhancements for group-housed BALB/cJ mice. *Neurosci Lett.* 2011;495(3):205-209.
78. Zhu S-W, Yee BK, Nyffeler M, Winblad B, Feldon J, Mohammed AH. Influence of differential housing on emotional behaviour and neurotrophin levels in mice. *Behav Brain Res.* 2006;169(1):10-20.

79. Gordon CJ. Temperature regulation in laboratory rodents. Thermoregulatory effector responses. New York: Cambridge University Press; 1993.73-109.
80. Barrett JE. The pain of pain: Challenges of animal behavior models. *Eur J Pharmacol.* 2015;753:183-190.
81. McEwen BS, Kalia M. The role of corticosteroids and stress in chronic pain conditions. *Metabolism.* 2010;59 Suppl 1:S9-15.
82. Ulrich-Lai YM, Herman JP. Neural Regulation of Endocrine and Autonomic Stress Responses. *Nat Rev Neurosci.* 2009;10(6):397-409.
83. Jacobson L, Sapolsky R. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr Rev.* 1991;12(2):118-134.
84. Oyola MG, Handa RJ. Hypothalamic–pituitary–adrenal and hypothalamic–pituitary–gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity. *Stress.* 2017;20(5):476-494.
85. Joseph DN, Whirledge S. Stress and the HPA Axis: Balancing Homeostasis and Fertility. *Int J Mol Sci.* 2017;18(10):2224.
86. Smith SM, Vale WW. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin Neurosci.* 2006;8(4):383.
87. Bartolomucci A. Social stress, immune functions and disease in rodents. *Front Neuroendocrinol.* 2007;28(1):28-49.
88. Miller WL. The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis: A Brief History. *Horm Res Paediatr.* 2018;89(4):212-223.
89. Möstl E, Palme R. Hormones as indicators of stress. *Domest Anim Endocrinol.* 2002;23(1):67-74.
90. Spackman DH, Riley V. Corticosterone concentrations in the mouse. *Science.* 1978;200(4337): 87-87.
91. Ieraci A, Mallei A, Popoli M. Social Isolation Stress Induces Anxious-Depressive-Like Behavior and Alterations of Neuroplasticity-Related Genes in Adult Male Mice. *Neural Plast.* 2016;2016:6212983.
92. Touma C, Sachser N, Möstl E, Palme R. Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. *Gen Comp Endocrinol.* 2003;130(3):267-278.
93. Dong Y, Wang X, Zhou Y, Zheng Q, Chen Z, Zhang H ve arkadaşları. Hypothalamus-pituitary-adrenal axis imbalance and inflammation contribute to sex differences in separation- and restraint-induced depression. *Horm Behav.* 2020;122:104741.
94. Auwerx J, Staels B. Leptin. *Lancet Lond Engl.* 1998;351(9104):737-742.
95. Sandoval DA, Davis SN. Leptin: Metabolic control and regulation. *J Diabetes Complications.* 2003;17(2):108-113.

96. Kain ZN, Zimolo Z, Heninger G. Leptin and the Perioperative Neuroendocrinological Stress Response1. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(7):2438-2442.
97. Heiman ML, Ahima RS, Craft LS, Schoner B, Stephens TW, Flier JS. Leptin Inhibition of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Response to Stress. *Endocrinology.* 1997;138(9):3859-3863.
98. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature.* 1999;402(6762):656-660.
99. Hosoda H, Kojima M., Kangawa K.. Ghrelin and the regulation of food intake and energy balance. *Molecular interventions.* 2002;2(8): 494.
100. Wren AM, Small CJ, Ward HL, Murphy KG, Dakin CL, Taheri S ve arkadaşları. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology.* 2000;141(11):4325-4328.
101. Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature.* 2000;407(6806):908-913.
102. Kristensson E, Sundqvist M, Astin M, Kjerling M, Mattsson H, Dornonville de la Cour C ve arkadaşları. Acute psychological stress raises plasma ghrelin in the rat. *Regul Pept.* 2006;134(2):114-117.
103. Ochi M, Tominaga K, Tanaka F, Tanigawa T, Shiba M, Watanabe T ve arkadaşları. Effect of chronic stress on gastric emptying and plasma ghrelin levels in rats. *Life Sci.* 2008;82(15):862-868.
104. Hosoda H, Kojima M, Kangawa K. Ghrelin and the Regulation of Food Intake and Energy Balance. *Mol Interv.* 2002;2(8):494.
105. Holubová A, Štofková A, Jurčovičová J, Šlamberová R. The effect of neonatal maternal stress on plasma levels of adrenocorticotrophic hormone, corticosterone, leptin, and ghrelin in adult male rats exposed to acute heterotypic stressor. *Physiol Res.* 2016;65(Suppl 5):S557-566.
106. Woods SC, Seeley RJ, Porte D, Schwartz MW. Signals That Regulate Food Intake and Energy Homeostasis. *Science.* 1998;280(5368):1378-1383.
107. Proulx K, Richard D, Walker C-D. Leptin regulates appetite-related neuropeptides in the hypothalamus of developing rats without affecting food intake. *Endocrinology.* 2002;143(12):4683-4692.
108. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E ve arkadaşları. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature.* 1996;382(6588):250-252.
109. Jeong JY, Lee DH, Kang SS. Effects of Chronic Restraint Stress on Body Weight, Food Intake, and Hypothalamic Gene Expressions in Mice. *Endocrinol Metab.* 2013;28(4):288-296.
110. Gordon CJ. Thermal physiology of laboratory mice: Defining thermoneutrality. *J Therm Biol.* 2012;37(8):654-685.

111. Zethof TJJ, Van Der Heyden JAM, Tolboom JTBM, Olivier B. Stress-induced hyperthermia in mice: A methodological study. *Physiol Behav.* 1994;55(1):109-115.
112. Lezak KR, Missig G, Carlezon Jr WA. Behavioral methods to study anxiety in rodents. *Dialogues Clin Neurosci.* 2017;19(2):181-191.
113. Küçük A, Gölgeci A. Deney hayvanlarında anksiyete modelleri ve anksiyetenin değerlendirilmesi. *Sağlık Bilim Derg.* 2005;14(3):209-217.
114. Gewirtz JC, Kim YK. Animal models of behavior genetics. New York: Springer; 2016.
115. Hall CS. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comp Psychol.* 1934;18(3):385-403.
116. York JM, Blevins NA, McNeil LK, Freund GG. Mouse short- and long-term locomotor activity analyzed by video tracking software. *J Vis Exp JoVE.* 2013;(76).
117. EthoVision XT and the open field test | Noldus [Internet]. EthoVision XT and the open field test | Noldus. [12 Şubat 2021]. Erişim adresi: <https://www.noldus.com/blog/ethovision-xt-open-field-test>
118. Lamprea MR, Cardenas FP, Setem J, Morato S. Thigmotactic responses in an open-field. *Braz J Med Biol Res.* 2008;41(2):135-140.
119. Montgomery KC, Monkman JA. The relation between fear and exploratory behavior. *J Comp Physiol Psychol.* 1955;48(2):132-136.
120. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods.* 1985;14(3):149-167.
121. Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl).* 1987;92(2):180-185.
122. Uzbay İT. Psikofarmakolojinin Temelleri ve Deneysel Araştırma Teknikleri. Ankara: Çizgi Tıp Yayınevi; 2004.
123. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc.* 2007;2(2):322-328.
124. Carola V, D'Olimpio F, Brunamonti E, Mangia F, Renzi P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behav Brain Res.* 2002;134(1-2):49-57.
125. Rodgers RJ, Dalvi A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev.* 1997;21(6):801-810.
126. Treede RD. The International Association for the Study of Pain definition of pain: as valid in 2018 as in 1979, but in need of regularly updated footnotes. *Pain reports.* 2018; 3(2).

127. Arras M, Rettich A, Cinelli P, Kasermann HP, Burki K. Assessment of post-laparotomy pain in laboratory mice by telemetric recording of heart rate and heart rate variability. *BMC Vet Res.* 2007;3(1):1-10.
128. Pain and distress in laboratory rodents and lagomorphs: Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) Working Group on Pain and Distress accepted by the FELASA Board of Management November 1992. *Lab Anim.* 1994;28(2):97-112.
129. Tsigos C, Kyrou I, Kassi E, Chrousos GP. Stress: endocrine physiology and pathophysiology. South Dartmouth: Endotext [Internet]; 2000.
130. Szklarczyk K, Korostynski M, Golda S, Piechota M, Ficek J, Przewlocki R. Endogenous opioids regulate glucocorticoid-dependent stress-coping strategies in mice. *Neuroscience.* 2016;330:121-137.
131. Aydın ON. Ağrı ve ağrı mekanizmalarına güncel bakış. 2002.
132. Barrot M. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience.* 2012;211:39-50.
133. Langford DJ, Mogil JS. Pain testing in the laboratory mouse. Fish RE, Brown MJ, Danneman PJ, Karas AZ, Editörler. *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals.2.* Baskı. San Diego: Academic Press; 2008. 549–560.
134. Bars DL, Gozariu M, Cadden SW. Animal Models of Nociception. *Pharmacol Rev.* 2001;53(4):597-652.
135. D'amour FE, Smith DL. A method for determining loss of pain sensation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 1941;72(1): 74-79.
136. Hanlon KE, Vanderah TW. Constitutive activity at the cannabinoid CB(1) receptor and behavioral responses. *Methods Enzymol.* 2010; 484: 3-30.
137. Hole K, Tjølsen A. Tail Flick Test. In: Schmidt R., Willis W, Editörler. *Encyclopedia of Pain.* Berlin, Heidelberg: Springer; 2007. 2392-2395.
138. Deuis JR, Dvorakova LS, Vetter I. Methods used to evaluate pain behaviors in rodents. *Frontiers in molecular neuroscience.* 2017; 10: 284.
139. Espejo EF, Mir D. Differential effects of weekly and daily exposure to the hot plate on the rat's behavior. *Physiol Behav.* 1994;55(6):1157-1162.
140. Espejo EF, Mir D. Structure of the rat's behaviour in the hot plate test. *Behav Brain Res.* 1993;56(2):171-176.
141. Gregory NS, Harris AL, Robinson CR, Dougherty PM, Fuchs PN, Sluka KA. An Overview of Animal Models of Pain: Disease Models and Outcome Measures. *J Pain.* 2013;14(11):1255-1269.
142. Kostomitsopoulos N, Dontas IA, Alexakos P, Lelovas P, Galanos A, Paronis E ve arkadaşları. Growing Male Rats in Individually Ventilated and Open-Top Cages. *J Am Assoc Lab Anim Sci JAALAS.* 2011;50(6):879-883.
143. Hrapkiewicz K, Colby LA, Denison P. Introduction to Laboratory Animal Medicine. *Clinical Laboratory Animal Medicine: An Introduction.* 4. Baskı. Chichester, UK: John Wiley & Sons; 2013.1-15.

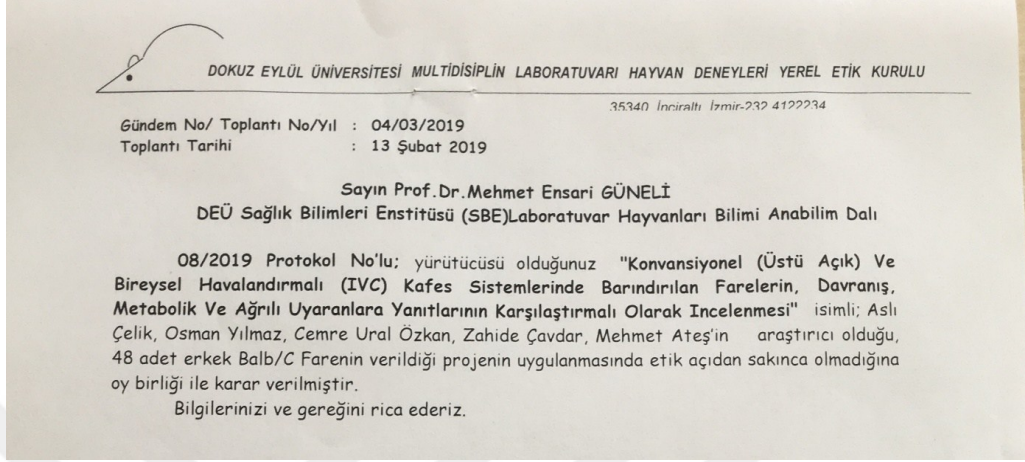
144. Takao K, Shoji H, Hattori S, Miyakawa T. Cohort removal induces changes in body temperature, pain sensitivity, and anxiety-like behavior. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2016; 10: 99.
145. Pasquarelli N, Voehringer P, Henke J, Ferger B. Effect of a change in housing conditions on body weight, behavior and brain neurotransmitters in male C57BL/6J mice. *Behav Brain Res*. 2017;333:35-42.
146. Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp JoVE*. 2015;(96):e52434.
147. Guneli E, Yavasoglu NUK, Apaydin S, Uyar M, Uyar M. Analysis of the antinociceptive effect of systemic administration of tramadol and dexmedetomidine combination on rat models of acute and neuropathic pain. *Pharmacol Biochem Behav*. 2007; 88(1): 9-17.
148. Flecknell PA. *Laboratory Animal Anaesthesia*. 4. Baskı. Cambridge, MA: Academic Press; 2015.
149. Baltacı AK, Vurucu N, Uzun A, Mogulkoc R, Kilic M. The effect of acute swimming exercise on plasma leptin in rats. *Bratisl Med J*. 2013; 113(10): 592-594.
150. Skov LJ, Ratner C, Hansen NW, Thompson JJ, Egerod KL, Burm H ve arkadaşları. RhoA in tyrosine hydroxylase neurones regulates food intake and body weight via altered sensitivity to peripheral hormones. *J Neuroendocrinol*. 2019; 31(7): e12761.
151. Groenink L, van der Gugten J, Zethof T, van der Heyden J, Olivier B. Stress-induced hyperthermia in mice: Hormonal correlates. *Physiol Behav*. 1994; 56(4): 747-749.
152. Sert NP du, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ ve arkadaşları. Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. *PLOS Biol*. 2020; 18(7): e3000411.
153. Bate ST, Clark RA. *The Design and Statistical Analysis of Animal Experiments*. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press; 2014.
154. Festing MF, Altman DG. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. *ILAR journal*. 2002; 43(4): 244-258.
155. Mouton PR, Long JM, Lei D-L, Howard V, Jucker M, Calhoun ME ve arkadaşları. Age and gender effects on microglia and astrocyte numbers in brains of mice. *Brain Res*. 2002; 956(1): 30-35.
156. Palanza P, Gioiosa L, Parmigiani S. Social stress in mice: gender differences and effects of estrous cycle and social dominance. *Physiol Behav*. 2001; 73(3): 411-420.
157. Champy M, Selloum M, Piard L, Zeitler V, Caradec C, Chambon P ve arkadaşları. Mouse functional genomics requires standardization of mouse handling and housing conditions. *Mamm Genome*. 2004;15(10):768-783.

158. Kitani K, Klotz U, Kanai S, Sato Y, Ohta M, Nokubo M. Age-related differences in the coordination disturbance and anticonvulsant effect of oxazepam in mice. *Arch Gerontol Geriatr*. 1989; 9(1): 31-43.
159. Shoji H, Takao K, Hattori S, Miyakawa T. Age-related changes in behavior in C57BL/6J mice from young adulthood to middle age. *Mol Brain*. 2016; 9(1): 11.
160. Tsai PP, Oppermann D, Stelzer HD, Mähler M, Hackbarth H. The effects of different rack systems on the breeding performance of DBA/2 mice. *Lab Anim*. 2003;37(1):44-53.
161. Memarzadeh F, Harrison PC, Riskowski GL, Henze T. Comparison of Environment and Mice in Static and Mechanically Ventilated Isolator Cages with Different Air Velocities and Ventilation Designs. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2004;43(1):14-20.
162. Bolivar VJ, Caldarone BJ, Reilly AA, Flaherty L. Habituation of activity in an open field: A survey of inbred strains and F1 hybrids. *Behav Genet*. 2000;30(4):285-293.
163. Åhlgren J, Voikar V. Housing mice in the individually ventilated or open cages-Does it matter for behavioral phenotype? *Genes Brain Behav*. 2019;18(7):e12564.
164. Baumans V, Van Loo PLP, Pham TM. Standardisation of environmental enrichment for laboratory mice and rats: utilisation, practicality and variation in experimental results. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Sciences*. 2010; 37(2):101-114.
165. Van de WH, Baumans V, Koolhaas JM, van ZL. Strain specific behavioural response to environmental enrichment in the mouse. *J Exp Anim Sci*. 1994;36(4-5):117-127.
166. Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. The open field test for measuring locomotor activity and anxiety-like behavior. Guest PC, editor. *Pre-clinical models*. New York, NY: Humana Press; 2019. 99-103.
167. Cannon WB. Bodily Changes in Pain, Hunger, Fear, and Rage. *J Philos Psychol Sci Methods*. 1917;14(3):79-80.
168. Monteiro S, Roque S, de Sá-Calçada D, Sousa N, Correia-Neves M, Cerqueira JJ. An Efficient Chronic Unpredictable Stress Protocol to Induce Stress-Related Responses in C57BL/6 Mice. *Front Psychiatry*. 2015;6:6.
169. Cabral A, Suescun O, Zigman JM, Perello M. Ghrelin Indirectly Activates Hypophysiotropic CRF Neurons in Rodents. *PLOS ONE*. 2012;7(2):e31462.
170. Spencer SJ, Xu L, Clarke MA, Lemus M, Reichenbach A, Geenen B ve arkadaşları. Ghrelin regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and restricts anxiety after acute stress. *Biol Psychiatry*. 2012;72(6):457-465.
171. Spencer SJ, Emmerzaal TL, Kozicz T, Andrews ZB. Ghrelin's Role in the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Stress Response: Implications for Mood Disorders. *Biol Psychiatry*. 2015;78(1):19-27.

172. Chuang J-C, Perello M, Sakata I, Osborne-Lawrence S, Savitt JM, Lutter M ve arkadaşları. Ghrelin mediates stress-induced food-reward behavior in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(7):2684-2692.
173. Müller TD, Nogueiras R, Andermann ML, Andrews ZB, Anker SD, Argente J ve arkadaşları. Ghrelin. *Mol Metab*. 2015;4(6):437-460.
174. Finger BC, Dinan TG, Cryan JF. Diet-induced obesity blunts the behavioural effects of ghrelin: studies in a mouse-progressive ratio task. *Psychopharmacology (Berl)*. 2012;220(1):173-181.
175. Finger BC, Dinan TG, Cryan JF. The temporal impact of chronic intermittent psychosocial stress on high-fat diet-induced alterations in body weight. *Psychoneuroendocrinology*. 2012;37(6):729-741.
176. Bundgaard CJ, Kalliokoski O, Abelson KSP, Hau J. Acclimatization of mice to different cage types and social groupings with respect to fecal secretion of IgA and corticosterone metabolites. *Vivo Athens Greece*. 2012;26(6):883-888.
177. Mulder GB, Pritchett K. Rodent Analgesiometry: The Hot Plate, Tail Flick and Von Frey Hairs. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2004;43(3):54-55.
178. Salberg S, Noel M, Burke NN, Vinall J, Mychasiuk R. Utilization of a rodent model to examine the neurological effects of early life adversity on adolescent pain sensitivity. *Dev Psychobiol*. 2020;62(3):386-399.
179. Guneli E, Gumustekin M, Ates M. Possible involvement of ghrelin on pain threshold in obesity. *Med Hypotheses*. 2010;74(3):452-454.
180. Guneli E, Kazikdas KÇ, Kolatan E. Ghrelin may attenuate proinflammatory cytokine-mediated neuropathic pain. *Med Hypotheses*. 2007;69(2):356-360.
181. Kutlu S, Canpolat S, Sandal S, Ozcan M, Sarsilmaz M, Kelestimur H. Effects of central and peripheral administration of leptin on pain threshold in rats and mice. *Neuro Endocrinol Lett*. 2003;24(3-4):193-196.

8. EKLER

EK 1: Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Onayı



KATKI

Proje başvurusu DEÜ SBE Yönetim Kurulu tarafından 09.05.19 tarihinde rektörlük BAP birimine gönderilmiş olup, proje başvurusu BAP Komisyon birimi tarafından 21.05.19 tarihinde işleme alınmıştır. BAP Komisyonu'nun 13.09.2019 tarih ve 8 sayılı toplantısı ile uygun bulunmuş olup, Rektörümüz'ün 07.10.2019 tarihli Olur'u ile kabul edilmiştir. BAP 2019.KB.SAG.060 no'lu projemizin 73.037,43 TL bütçe ve 24 ay süre ile desteklenmesi uygun bulunmuştur.



ÖZGEÇMİŞ

ASLI ÇELİK

Öğrenim Bilgileri

10 Ekim 2014 - 14 Ocak 2019 (4 yıl 4 ay)
Ön Lisans, Açıköğretim, ANADOLU ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
AÇIKÖĞRETİM FAKÜLTESİ, SAĞLIK KURUMLARI İŞLETMECİLİĞİ PR.
(AÇIKÖĞRETİM)
Diploma Numarası: 2019-7560
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 2.36 / 4.0

13 Şubat 2013 - Şu Anda (8 yıl 7 ay)
Doktora, Doktora, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, LABORATUVAR HAYVANLARI BİLİMİ (DR)
Diploma Numarası: -
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.79 / 4.0

01 Eylül 2009 - 01 Haziran 2011 (1 yıl 10 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, LABORATUVAR HAYVANLARI BİLİMİ (YL) (TEZLİ)
Tez Başlığı: Sıçan Testis Torsiyon-detorsiyon Modelinde Etil Pirüvat Etkisinin
İncelenmesi
Tez Konusu: İskemi Reperfüzyon Durumunda Antioksidanın Laboratuvar
Hayvanlarında Araştırılması
Tarih: 2011
Tez Danışmanı: MEHMET ENSARİ GÜNELİ
Diploma Numarası: 849

01 Eylül 2004 - 12 Haziran 2009 (4 yıl 10 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, ANKARA ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
ANKARA VETERİNER FAKÜLTESİ, ANKARA VETERİNER PR.

Deneyim / İşyeri Bilgileri

01 Nisan 2014 - 01 Aralık 2016 (2 yıl 9 ay) (Tam Zamanlı)
ÖĞRETİM GÖREVLİSİ, ÖĞRETİM GÖREVLİSİ, İZMİR BİYOTİP VE GENOM MERKEZİ

01 Şubat 2013 - Şu Anda (8 yıl 7 ay) (Tam Zamanlı)
ÖĞRETİM GÖREVLİSİ, UZMAN, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

Yabancı Dil Bilgileri

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanları

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanı Bilgileri

Sağlık Bilimleri -- Veteriner Bilimleri -- Zooteknik ve Hayvan Besleme -- Zootekni (Yetiştirme ve Islah) -- Ev ve Deney Hayvanları

Sağlık Bilimleri -- Tıp -- Cerrahi Tıp Bilimleri -- Genel Cerrahi -- Deneysel Cerrahi

Anahtar Kelimeler

Deney Hayvanları

Davranış Fizyolojisi

Deneysel Araştırma

Deneysel Cerrahi

Deneysel Diyabet Modeli

Ar-Ge Yetkinlik

Kitaplar

A. ÇELİK & O. YILMAZ, Laboratuvar Hayvan Tesisleri-i, ISBN: 978-975-441-295-6, TÜRKİYE: Dokuz Eylül Üniversitesi Matbaası, 17 Eylül 2010, Kitap.

Makaleler

R. COLAK, A. CELİK, G. DİNİZ, S. A. OZDEMİR, O. YILMAZ & S. CALKAVUR, Evaluation of the Neuroprotective Effect of Pycnogenol in a Hypoxic-Ischemic Brain Injury Model in Newborn Rats, AMERICAN JOURNAL OF PERINATOLOGY, 2021, 0735-1631.

Y. A. MANİSALIGİL, S. MİCİLİ, S. KIZILDAĞ, A. ÇELİK, H. A. BAĞRIYANIK & M. GÜMÜŞTEKİN, Assessment of Rac1 and beta-PAK Expressions in a Mouse Model for Contrast-Induced Nephropathy, Journal of Basic and Clinical Health Sciences, 2020, 2458-8938, 4, 3, 230-236.

Z. ÇAVDAR, C. URAL, A. KOÇAK, Ş. ARSLAN, S. ERSAN, S. ÖZBAL, M. TATLI, A. ÇELİK & C. ÇAVDAR, Paricalcitol pretreatment attenuates renal ischemia/reperfusion injury by inhibiting p38 MAPK and activating PI3K/Akt signaling pathways, Turkish Journal of Biochemistry, 2019, 1303-829X, 44, 4, 452-461.

Z. ÇAVDAR, M. A. OKTAN, C. URAL, M. ÇALIŞIR, A. KOÇAK, C. HEYBELİ, S. YILDIZ, M. A. ARICI, H. ELLİDOKUZ, A. ÇELİK, O. YILMAZ & S. SARIOĞLU, Renoprotective Effects of Alpha Lipoic Acid on Iron Overload-Induced Kidney Injury in Rats by Suppressing NADPH Oxidase 4 and p38 MAPK Signaling, BIOLOGICAL TRACE ELEMENT RESEARCH, 2019, 0163-4984.

A. KOCAK, Z. ÇAVDAR, S. ERSAN, Ş. ARSLAN, S. ÖZBAL, A. ÇELİK & C. ÇAVDAR, The protective effect of nebivolol on renal ischemia/reperfusion injury in rats through the p38 MAPK and PI3K/Akt signaling pathways, FEBS OPEN BIO, 2018, 2211-5463.

S. ERSAN, A. ÇELİK, M. TANRISEV, Z. ÇAVDAR, Ş. M. ÜNLÜ, A. KOCAK & T. KÖSE, Pretreatment With Nebivolol Attenuates Level And Expression Of Matrix Metalloproteinases In A Rat Model Of Renal Ischaemia-reperfusion Injury, Nephrology, 2017, 13205358, 22, 12, 1023-1029.

S. ERSAN, A. ÇELİK, M. TANRISEV, I. KÖSE, Z. ÇAVDAR, Ş. M. ÜNLÜ, A. KOCAK, C. URAL, B. YILMAZ & T. KÖSE, Pretreatment With Paricalcitol Attenuates Level And Expression Of Matrix Metalloproteinases In A Rat Model Of Renal Ischemia-reperfusion Injury, Clinical Nephrology, 2017, 0301-0430, 88, 11, 231-238.

Z. ÇAVDAR, A. ÇELİK, Ş. ARSLAN, G. TERZİOĞLU, S. ÖZBAL, S. YILDIZ, C. URAL, B. U. ERGÜR, M. E. GÜNELİ, T. ÇAMSARI & G. AKDOĞAN, Protective Effects Of Taurine Against Renal Ischemia/reperfusion Injury In Rats By Inhibition Of Gelatinases, Mmp-2 And Mmp-9, And P38 Mitogen-activated Protein Kinase Signaling, *Biotechnic Histochemistry*, 2017, 1052-0295, 92, 7, 524-535.

M. YALÇIN, M. A. KIYAK, A. ÇELİK, M. AKARSU, G. BENİ & Ö. SAĞOL, Are N Acetylcysteine And Adalimumab Effective For Non Alcoholic Steatohepatitis, *Gastroenterology Insights*, 2016, 0000-0000.

M. Ö. ZENGİN, E. ÇINAR, A. ÇELİK, M. TÜTÜNCÜ, E. KARAHAN & C. KÜÇÜKERDÖNMEZ, Effect Of 1 And 6 Hour Delayed Corneal Collagen Cross Linking On Corneal Healing In A Rabbit Alkali Burn Model, *CORNEA*, 2016, 0277-3740, 35, 12, 1644-1649.

M. AKAN, Ş. ÖZBİLGİN, A. ÇELİK, N. BOZTAŞ, S. ÖZKARDEŞLER, B. U. ERGÜR, A. ŞIŞMAN, M. E. GÜNELİ, P. AKOKAY & R. MESERİ DALAK, Effect Of Magnesium Sulfate On Renal Ischemia Reperfusion Injury In Streptozotocin Induced Diabetic Rats, *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 1128-3602, 20, 8, 1642-1655.

T. TEMİZ, Ö. DEMİR, A. ÇELİK, F. ŞİMŞEK, Y. C. KAPLAN, S. BAHÇECİ, B. KARADAŞ & G. KÖYLÜOĞLU, Effect Of Nitregic System On Colonic Motility In A Rat Model Of Irritable Bowel Syndrome, *INDIAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY*, 2016, 0253-7613, 48, 4, 424-429.

M. SERT, H. ATEŞ, A. ÇELİK, M. YÜKSEL EĞRİLMEZ, Z. ÇAVDAR, C. ÇAVDAR, M. A. ÖZCAN & T. ÇAMSARI, Demir Sükröz Ve Demir Dekstran In Sıçanlarda Periferik Kanda Lenfosit Dağılım Ve İ?şlevleri Üzerine Olan Etkilerinin Araştırılması, *DEU Tıp Fakültesi Dergisi*, 2015, 0000-0000.

M. YALÇIN, A. ÇELİK, M. AKARSU, S. OZGUL, S. TUNALI, G. BENİ, E. OZGE & H. AKPINAR, A Comparison Of The Effects Of Infliximab Adalimumab And Pentoxifylline On Rats With Non Alcoholic Steatohepatitis, *Turk J Gastroenterol*, 2014, 0000-0000.

N. GÜREŞ, M. KARAMAN, C. TAVUSBAY, H. E. KOLATAN, A. ÇELİK, Ç. PEKÇETİN, Z. ÇAVDAR, M. E. GÜNELİ & O. YILMAZ, Anti-inflammatory and antioxidant effects of ethyl pyruvate on colitis: Ina rat model, *BIOMEDICAL RESEARCH-INDIA*, 2014, 0976-1683.

A. ÇELİK, Z. ÇAVDAR, S. ÖZBAL, B. U. ERGÜR, C. URAL, M. E. GÜNELİ, T. ÇAMSARI & G. AKDOĞAN, The Effects Of Alpha Lipoic Acid On Mmp 2 And Mmp 9 Activities In A Rat Renal Ischemia And Reperfusion Model, *Biotechnic & Histochemistry*, 2014, 0000-0000.

K. ÜLKÜ, F. MALTEPE, A. ÇELİK, Ş. B. UĞURLU & A. N. GÖKMEN, The Effects Of Levosimendan And Dobutamine In Experimental Bupivacaine Induced Cardiotoxicity, *BMC Anesthesiology*, 2013, 0000-0000.

O. YETİŞ, İ. AKKAYA, A. ÇELİK, B. KOÇ, M. E. GÜNELİ & S. TOZBURUN, A pilot study: infrared laser stimulation of the rat vagus nerves, *Sözlü Sunum, SPIE BIOS*, 2020, San Francisco, California, United States, 20 Şubat 2020, 23 Şubat 2020, 1, 1, 1 - 4.

N. DEVECİ, Y. ÖZTÜRK, B. BAYKARA, M. KIRAY, B. AKSOY & A. ÇELİK, Anti-inflammatory and anti-oxidant effects of thiamine in dextran sulfate-induced colitis in rats, *Sözlü Sunum, 52nd ESPGHAN*, 05 Haziran 2019, 08 Haziran 2019, 68, S1, 517 - 517.

M. AVCI, S. ÖZBAL, Z. ÇAVDAR, A. ÇELİK, H. A. BAĞRIYANIK, C. URAL & B. U. ERGÜR, Deneyisel Erişkin Hipertiroidi Modelinde Quercetin?xxin Testis Dokusundaki Etkisinin Histolojik Olarak İncelenmesi, *Poster Sunumu, 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi*, 10 Mayıs 2018, 13 Mayıs 2018.

Bildiriler

C. URAL, Z. ÇAVDAR, S. ERSAN, A. KOÇAK, Ş. ARSLAN, S. ÖZBAL, A. ÇELİK & C. ÇAVDAR, Parikalsitolün Renal İskemi Reperfüzyon Hasarında P38 MAPK Sinyal Yolu Aracıyla Koruyucu Etkileri, Sözlü Sunum, Uluslararası Biyokimya Kongresi/ 28. Ulusal Biyokimya Kongresi, 19 Eylül 2017, 23 Eylül 2017.

C. URAL, Z. ÇAVDAR, S. ERSAN, A. KOÇAK, Ş. ARSLAN, S. ÖZBAL, A. ÇELİK & C. ÇAVDAR, The Protective Effect of Paricalcitol on Renal Ischemia/Reperfusion Injury in Rats Through The Inhibition of P38 MAPK Signaling Pathway, Poster Sunumu, 42nd FEBS Congress, 10 Eylül 2017, 14 Eylül 2017.

S. ERSAN, A. ÇELİK, M. TANRISEV, I. KÖSE, Z. ÇAVDAR, Ş. M. ÜNLÜ, A. KOÇAK, C. URAL, B. YILMAZ & T. KÖSE, Paricalcitol Attenuate Actvty And Expresson Of Matrx Metalloprotenases In A Rat Model Of Renal Ischemia Reperfusion Injury, Poster Sunumu, 41ST FEBS CONGRESS, 03 Eylül 2016, 08 Eylül 2016.

H. E. KOLATAN, M. E. GÜNELİ, M. KARAMAN, A. ÇELİK & O. YILMAZ, Effects of Foster Mother on Behavior and Physical Development of Rat Pups, Poster Sunumu, 13. FELASA Congress, 13 Haziran 2016, 16 Haziran 2016.

G. KAMACI ÖZÖCAK, A. ÇELİK, S. ÖZBAL, E. TAYLAN, H. RESMİ, B. U. ERGÜR, M. KARAMAN, O. YILMAZ & M. E. GÜNELİ, Investigation of Effects of Ghrelin on Skeletal Muscle and Remote Organ Injury Induced by Hindlimb Ischemia Reperfusion, Poster Sunumu, 13. FELASA Congress, 13 Haziran 2016, 16 Haziran 2016.

M. KARAMAN, G. BALTACIOĞLU, H. E. KOLATAN, A. ÇELİK, O. YILMAZ & M. E. GÜNELİ, Microbiological monitoring effects of the cross fostering in conventionally bred rats, Poster Sunumu, 13. FELASA Congress, 13 Haziran 2016, 16 Haziran 2016.

C. URAL, Z. ÇAVDAR, A. ÇELİK, Ş. ARSLAN, G. TERZİOĞLU, S. ÖZBAL, B. U. ERGÜR, M. E. GÜNELİ, T. ÇAMSARI & G. AKDOĞAN, The investigation of taurine on extracellular matrix and related signaling pathway in renal ischemia, Basılı, 40th FEBS Congress, 04 Temmuz 2015, 09 Temmuz 2015.

Projeler

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, DENEY HAYVANLARI LABORATUARINDA KONVENSİYONEL OLARAK YETİŞTİRİLEN SIÇANLARDA SÜTANNE KULLANIMININ MİKROBİYOLOJİK İZLEM ÜZERİNE ETKİLERİ, Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Dokuz Eylül Üniversitesi) (Yurt İçi) , 15 Mayıs 2012, 20 Eylül 2013.

ULUSAL, ARAŞTIRMACI, STREPTOZOSİNLE OLUŞTURULAN DİYABET MODELİNDE GELİŞEN KOGNİTİF BOZUKLUKLARDA ETİL PİRÜVAT ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI, Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Dokuz Eylül Üniversitesi) (Yurt İçi) , 23 Eylül 2012, 29 Mart 2013.

ULUSAL, ARAŞTIRMACI, RENAL İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINDA LİPOİK ASİTİN MMP-2 VE MMP-9 ENZİMLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI, Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Dokuz Eylül Üniversitesi) (Yurt İçi) , 07 Ocak 2013, 14 Şubat 2013.

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, RATLARDA NON-ALKOLİK STEATOHEPATİT ÜZERİNE N-ASETİLSİSTEİN, ADALİMUMAB VE N-ASETİLSİSTEİN-ADALİMUMAB KOMBİNASYONUNUN ETKİLERİ, Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Dokuz Eylül Üniversitesi) (Yurt İçi) , 01 Ocak 2011, 01 Ocak 2013.

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, RATLARDA NON-ALKOLİK STEATOHEPATİT ÜZERİNE N-ASETİLSİSTEİN, ADALİMUMAB VE N-ASETİLSİSTEİN-ADALİMUMAB KOMBİNASYONUNUN ETKİLERİ, Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Dokuz Eylül Üniversitesi) (Yurt İçi) , 01

Ocak 2011, 01 Ocak 2013.

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, SIÇANLARDA İ.P GLUTAMİNİN AKCİĞERDE POSTOPERATİF DÖNEMDE OLUŞAN ALVEOLER HAVA KAÇAĞI VE PARANKİM İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN UZUN DÖNEM ARAŞTIRILMASI, Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Dokuz Eylül Üniversitesi) (Yurt İçi) , 05 Haziran 2012, 22 Haziran 2012.

ULUSAL, PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ, SIÇAN TESTİS TORSİYON-DETORSİYON MODELİNDE ETİL PİRÜVAT ETKİSİNİN İNCELENMESİ, Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Dokuz Eylül Üniversitesi) (Yurt İçi) , 24 Aralık 2010, 30 Haziran 2011.

ULUSAL, ARAŞTIRMACI, İNTRAGASTRİK HİDROKLORİK ASİT UYGULANARAK, DENEYSEL ASİDOZ OLUŞTURULAN RATLARDA, TRİS HİDROXYMETHLY AMİNOMETHANE (THAM) TEDAVİSİNİN MORTALİTE ÜZERİNE ETKİSİ., Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Dokuz Eylül Üniversitesi) (Yurt İçi) , 28 Mayıs 2011, 12 Haziran 2011.

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, DEMİR SÜKROZ VE DEMİR DEKSTRANIN SIÇANLARDA PERİFERİK KANDA LENFOSİT DAĞILIMI VE İŞLEVLERİ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI., Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Dokuz Eylül Üniversitesi) (Yurt İçi) , 30 Mayıs 2011, 03 Haziran 2011.

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, SKLEROZAN ENKAPSÜLE PERİFONİT (SEP) MODELİNDE STROİD-SİROLİMUS KOMBİNASYONUNUN ETKİSİNİN İNCELENMESİ., Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Dokuz Eylül Üniversitesi) (Yurt İçi) , 22 Kasım 2011, 20 Şubat 2011.

ULUSAL, ARAŞTIRMACI, TAVŞANDA GEÇ KALÇA DİSPLAZİSİ MODELİ KALÇANIN ÇIKIK KALMA SÜRECİNİN GEÇ DİSPLAZİYE ETKİSİ., Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Dokuz Eylül Üniversitesi) (Yurt İçi) , 26 Şubat 2010, 30 Ağustos 2010.

ULUSAL, PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ, KONVENSİYONEL OLARAK YETİŞTİRİLEN LABORATUAR HAYVANLARINDA POSTNATAL DÖNEMDE CİNSİYET,YAŞ VE AĞIRLIK KORELASYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ. , Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Dokuz Eylül Üniversitesi) (Yurt İçi) , 01 Şubat 2010, 20 Ağustos 2010.

ULUSAL, ARAŞTIRMACI, INTRAUTERİN UYGULANAN HİPEROKSİNİN YENİDOĞAN SIÇANLARDA BRONKOPULMONER DİSPLAZİ MODELİNE ETKİSİ., Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Dokuz Eylül Üniversitesi) (Yurt İçi) , 30 Mart 2010, 30 Temmuz 2010.

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, MATERNAL PENTOKSİFİLİN TEDAVİSİNİN HAYVAN PERİVENTRİKÜLER LÖKOMALAZİ MODELİNDE BEYİN HASARI ÜZERİNE ETKİSİ., Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Dokuz Eylül Üniversitesi) (Yurt İçi) , 31 Mayıs 2010, 15 Temmuz 2010.

ULUSAL, ARAŞTIRMACI, GUİNEA PİGDE DENEYSEL OLUŞTURULMUŞ KOLESTETOMA İNHİBİSYONUNDA LOKAL PREDNİSOLON SODYUM FOSFAT, DEKSAMETAZON VE 1,25-DİHİDROKSİVİTAMİN D3ÜN ETKİLERİ (DENEYSEL HAYVAN MODELİ), Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi) (Yurt İçi) , 07 Mayıs 2010, 07 Temmuz 2010.

Üniversite, Kurum veya Kuruluşların Verdiği Ödüller, Ulusal, Prof. Dr. Sezai Bedrettin Tümay Araştırma Ödülleri, Dektran Sülfat Sodyum İle Kolit Oluşturulmuş Sıçanlarda Tiyaminin (b1 Vitamini) Antioksidan Ve Antiinflamatuvar Etkiliğinin Araştırılması, Ödül Alınan Kurum: TÜRK PEDIATRİ DERNEĞİ, TÜRKİYE, 03 Aralık 2018.

Diğer, Ulusal, En İyi Poster Ödülü İkinciliği, Streptozotosinle Oluşturulan DeneySEL Diyabet Modelinde Gelişen Kognitif Bozukluklarda Etil Pirüvat Etkisinin Araştırılması, Ödül Alınan Kurum: LABORATUVAR HAYVANLARI BİLİMİ ANABİLİM DALI, TÜRKİYE, 28 Eylül 2013.

Yayımlar

11. Deney Hayvani Kullanımı Sertifi?kasi Kurs Programi, EĞİTİM/KURS VERİLMESİ, Ulusal, 09 Aralık 2013.

12. Deney Hayvani Kullanımı Sertifi?kasi Kurs Programi, EĞİTİM/KURS VERİLMESİ, Ulusal, 02 Mart 2015.

13. Deney Hayvani Kullanımı Sertifi?kasi Kurs Programi, EĞİTİM/KURS VERİLMESİ, Ulusal, 18 Nisan 2016.

14. Deney Hayvani Kullanımı Sertifi?kasi Kurs Programi, EĞİTİM/KURS VERİLMESİ, Ulusal, 28 Kasım 2016.

15. Deney Hayvani Kullanımı Sertifi?kasi Kurs Programi, EĞİTİM/KURS VERİLMESİ, Ulusal, 05 Haziran 2017.

18. Deney Hayvani Kullanımı Sertifi?kasi Kurs Programi Fare- Sıçan- Kobay-Tavşan, EĞİTİM/KURS VERİLMESİ, Ulusal, 11 Şubat 2019.

19. Deney Hayvani Kullanımı Sertifi?kasi Kurs Programi Fare- Sıçan- Kobay-Tavşan, EĞİTİM/KURS VERİLMESİ, Ulusal, 09 Eylül 2019.

5.-6. Deney Hayvani Kullanımı Sertifi?kasi Kurs Programi, EĞİTİM/KURS VERİLMESİ, Ulusal, 21 Mart 2011.

7.-8. Deney Hayvani Kullanımı Sertifi?kasi Kurs Programi, EĞİTİM/KURS VERİLMESİ, Ulusal, 19 Mart 2012.

9.- 10. Deney Hayvani Kullanımı Sertifi?kasi Kurs Programi, EĞİTİM/KURS VERİLMESİ, Ulusal, 18 Mart 2013.

22. DENEY HAYVANI KULLANIMI SERTİFİKASI KURSU, EĞİTİM/KURS VERİLMESİ, Ulusal, 05 Temmuz 2021 - 14 Temmuz 2021.

21. DENEY HAYVANLARI KULLANIM SERTİFİKASI KURSU, EĞİTİM/KURS VERİLMESİ, Ulusal, 01 Mart 2021 - 10 Mart 2021.

20.DENEY HAYVANI KULLANIMI SERTİFİKASI KURSU, EĞİTİM/KURS VERİLMESİ, Ulusal, 15 Haziran 2020 - 25 Haziran 2020.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Hakemlik/Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0