

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇANLARDA GLÜTENLİ BESLENMENİN BİLİŞSEL
İŞLEVLERE NMDA RESEPTÖRÜ ARACILI ETKİSİ

Nevin Deniz KIRCA
ORCID: 0000-0002-8870-6053

SİNİRBİLİMLER ANABİLİM DALI
Temel Sinirbilimler Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR
TEMMUZ 2021

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc -2018970015

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇANLARDA GLÜTENLİ BESLENMENİN BİLİŞSEL
İŞLEVLERE NMDA RESEPTÖRÜ ARACILI ETKİSİ

Nevin Deniz KIRCA
ORCID: 0000-0002-8870-6053

SİNİRBİLİMLER ANABİLİM DALI
Temel Sinirbilimler Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Pınar AKAN
ORCID: 0000-0001-9211-1944

Bu Araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından
2020.KB.SAG.052 proje numarası ile desteklenmiştir.

İZMİR
TEMMUZ 2021

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

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum “*Sıçanlarda Glütenli Beslenmenin Bilişsel İşlevlere NMDA Reseptörü Aracılı Etkisi*” başlıklı Yüksek Lisans 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 çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Nevin Deniz Kırca

27/07/2021

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ve tez çalışmamın her aşamasında bana yardımcı olan, yol gösteren, akademik alandaki desteğinin yanı sıra manevi olarak da beni destekleyen, sevgili danışmanım Prof.Dr. Pınar AKAN'a,

Bu çalışmanın, planlanması ve yürütülmesi aşamalarındaki değerli katkı ve desteklerinden dolayı Prof.Dr. Osman YILMAZ'a ve davranış deneylerinin uygulanmasında bize sabırla yol gösteren ve yardımlarını esirgemeyen Uzm. Dr. Sibel BÜYÜKÇOBAN'a,

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Sinirbilimler Anabilim Dalı'nın ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyelerine,

İhtiyacımız olduğunda yardımseverliği ve pozitif enerjisiyle ile bizleri destekleyen Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı sekreteri Eda Nesrin Olum ve teknik konularda bize her zaman destek olan Emin ÇAVUŞLU'ya,

Tez çalışmamın hayvan deneyleri aşamasında birlikte çalıştığımız, sonuçların analizinde en az benim kadar emek veren sevgili ekip arkadaşım Mine ARAYICI'ya, laboratuvar çalışmalarım süresince bilgisinden ve tecrübesinden yararlandığım ve bu süreç boyunca beni destekleyen sevgili arkadaşlarım Tuğba ŞAN ve İrem Nur GÖKBAYRAK ATAY'a,

Tüm eğitim hayatım süresince benim yanımda olan, maddi ama en çok da manevi desteklerini her zaman hissettiğim, her koşulda arkamda olduklarını bildiğim annem Işıl KIRCA'ya ve babam Mehmet Emin KIRCA'ya,

Tez çalışmam için destek sağlayan Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi'ne teşekkürlerimi sunuyorum.

Nevin Deniz KIRCA

İÇİNDEKİLER

TABLolar DİZİNİ	i
ŞEKİLLER DİZİNİ	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR	iii
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Günlük Diyet ve Gluten	4
2.1.1. Proteinlerin Sindirimi ve Gluten	5
2.2. Glutene Bağlı Gelişen Hastalıklar	6
2.2.1. Çölyak Hastalığı	6
2.2.2. Buğday Alerjisi	7
2.2.3. Çölyak Olmayan Gluten Hassasiyeti	7
2.3. Öğrenme ve Belleğin Nörobiyolojik Temelleri	8
2.3.1. Hipokampus	8
2.3.2. Hipokampal Öğrenme Modeli	9
2.3.3. Sıçanlarda Mekânsal Öğrenme ve Hipokampus	10
2.4. N-Metil-D-Aspartat (NMDA) Reseptörleri	11
2.4.1. Özellikleri, Alt Türleri	11
2.4.2. Kemirgen Beyninde NMDA Reseptörlerinin Yerleşimi	12
2.4.3. NMDA Reseptörü ve Gliadin Homolojisi	13
2.5. Gluten ve Bilişsel Bozukluklar	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM	15
3.1. Araştırmanın Tipi	15
3.2. Araştırmanın Yeri Ve Zamanı	15
3.3. Çalışma Materyali	15
3.4. Araştırmanın Değişkenleri	15
3.5. Veri Toplama Araçları	16
3.5.1. Kullanılan Cihazlar	16
3.5.2. Kullanılan Kimyasallar, Kit Ve Malzemeler	17
3.5.3. Deney Akış Şeması	18
3.5.4. Gruplar ve Kullanılan Yem İçerikleri	18
3.5.5. Deney Hayvanlarının Barındırılması	20
3.5.6. Açık Alan Testi	20

3.5.7.	Morris Su Tankı Testi	21
3.5.8.	Sakrifikasyon Sonrası Kan ve Doku Örneği Alımı.....	23
3.5.9.	Beyin Dokusu Homojenizasyonu.....	23
3.5.10.	Sıçan Beyin Dokusunda NMDA Reseptör 2 Ölçümü	24
3.5.11.	Sıçan Beyin Dokusu Protein Ölçümü	25
3.5.12.	İndirekt İmmünfloresan ile Plazmada Anti-NMDAR Ölçümü	26
3.5.13.	Sıçan Plazma Anti-gliadin Ölçümü	27
3.5.14.	Sıçan Plazma Anti-doku Transglutaminaz Ölçümü	28
3.5.15.	Sıçan Plazma Anti-NMDA Ölçümü	28
3.5.16.	Sıçan Plazma Rutin Biyokimyasal Ölçümler	29
3.5.17.	Sıçan Plazma Alfa 2 Makroglobulin Ölçümü.....	30
3.6.	Verilerin Değerlendirilmesi	32
3.7.	Araştırmanın Sınırlılıkları	33
3.8.	Etik Kurul Onayı	33
4.	BULGULAR.....	34
4.1.	Haftalık Ağırlık Ölçümleri	34
4.2.	Sıçanların Boy Uzunlukları	35
4.3.	BKİ ve Lee İndeksi Sonuçları.....	35
4.4.	Sıçanların Beyin Ağırlıkları	37
4.5.	Açık Alan Testi.....	38
4.6.	Morris Su Tankı Testi.....	42
4.7.	Sıçan Beyin Dokusu NMDA Reseptör 2 Düzeyi	49
4.8.	NMDA Reseptör 2 Düzeyi ve Açık Alan Testi Korelasyon Analizi.....	49
4.9.	İndirekt İmmünfloresan ile Plazmada Anti-NMDAR Düzeyi.....	50
4.10.	Sıçan Plazma Anti-gliadin IgG Düzeyi	50
4.11.	Sıçan Plazma Anti-doku Transglutaminaz IgG Düzeyi	51
4.12.	Sıçan Plazma Anti-NMDA IgG Düzeyi.....	51
4.13.	Sıçan Plazma Biyokimyasal Analiz.....	52
4.14.	Sıçan Plazma Alfa 2 Makroglobulin Düzeyi.....	53
5.	TARTIŞMA	54
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	68
7.	KAYNAKLAR	70
8.	EKLER.....	76

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: Çalışmada kullanılan cihazlar	16
Tablo 2: Kullanılan sarf malzemeleri.....	17
Tablo 3: Kullanılan yemlerin içerikleri.....	19
Tablo 4: Sıçanların gruplara göre ilk hafta ağırlıkları, son hafta ağırlıkları ve toplam ağırlık artışı grup ortalamaları	34
Tablo 5: Sıçanların gruplara göre boy uzunlukları grup ortalamaları.....	35
Tablo 6: Sıçanların gruplara göre BKİ ve Lee İndeks skoru grup ortalamaları	36
Tablo 7: Sıçanların bütün beyin ve serebellum ağırlığı grup ortalamaları.....	37
Tablo 8: Gruplara göre toplam alınan yol, ortalama hız, merkezde ve periferde bulunma süreleri, toplam hareket edilen süre grup ortalamaları	38
Tablo 9: 1-4.günlerde platformu bulmak için geçen sürelerin grup ortalamaları.....	42
Tablo 10: Yem gruplarına ait ortalama hız grup ortalamaları	44
Tablo 11: Gs ve YG yem gruplarına ait düzeltilmiş PB ve HKB grup ortalamaları .	45
Tablo 12: Gs ve YG yem gruplarına ait toplam alınan yol, ortalama hız, HKF, HKS, PF, PS ve THS ölçümleri grup ortalamaları.....	45
Tablo 13: 3 yem grubuna göre THS ölçümleri grup ortalamaları	46
Tablo 14: Yem gruplarına ait glukoz, total protein, globulin ve albumin düzeyleri .	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Gluteni oluşturan gliadin ve glutenin proteinleri	5
Şekil 2: Glutene bağlı oluşan hastalıklar ve toplumda yüzde görülme sıklıkları.....	6
Şekil 3: NMDA reseptör yapısı ve bağlanma	12
Şekil 4: Çalışma akış şeması.....	18
Şekil 5: Bütün beyin dokusu	23
Şekil 6: NMDA reseptör 2 kalibrasyon grafiği.....	25
Şekil 7: BCA kalibrasyon grafiği	26
Şekil 8: Alfa 2 Makroglobulin kalibrasyon grafiği	31
Şekil 9: Sıçanların Kontrol, Glutensiz, Yüksek Glutenli yem gruplarına göre haftalık ağırlık ortalamaları.....	34
Şekil 10: Gruplara göre BKİ	36
Şekil 11: Gruplara göre Lee İndeksi.....	36
Şekil 12: Gruplara göre toplam alınan yol.....	38
Şekil 13: Gruplara göre ortalama hız.....	39
Şekil 14: Gruplara göre merkez alanda bulunma süresi	39
Şekil 15: Gruplara göre perifer alanda bulunma süresi	40
Şekil 16: Kontrol, Glutensiz ve Yüksek Glutenli gruplardan rastgele seçilmiş sıçanların açık alan testinde izlediği yolların şematik görünümü	41
Şekil 17: Gruplara göre sıçanların 1-4. günlerdeki PB değeri grup ortalamaları.....	42
Şekil 18: Sıçanların 1-4. günlerdeki platforma giden toplam yol grup ortalamaları..	43
Şekil 19: Sıçanların gruplara göre 1-4. günlerdeki hedef kadranda geçirilen sürelerin yüzdesi	44
Şekil 20: Morris su tankı test günü.....	47
Şekil 21: Kontrol, Glutensiz ve Yüksek Glutenli gruplardan rastgele seçilmiş sıçanların Morris su tankı testinin 5.gününde kuzey yönünden suya bırakıldığında izlediği yolların şematik görünümü.....	48
Şekil 22: Sıçan plazmasında anti-NMDAR antikor tespiti sonucu elde edilen 20X büyütmedeki görüntüler. Pozitif kontrol, Negatif kontrol, Örnek slayt	50

SİMGELER VE KISALTMALAR

A2MG	Alfa 2 makroglobulin
A2MG/TP	Alfa 2 makroglobulin/total protein oranı
AMPA	α -amino-3-hidroksi-5-metil-izoksazol-4-propionik asit
BCA	Bicinchoninic acid assay
BKİ	Beden kitle indeksi
BSA	Bovine serum albumin
Ca ⁺²	Kalsiyum
CA	Cornu ammonis
CaMKII	Kalsiyum/Kalmodulin-Bağımlı Protein Kinaz 2
cm	Santimetre
DGP	Deamide gladin
dL	Desilitre
ELISA	Enzyme-Linked ImmünoSorbent Assay
EMA	Endomisyal
gr	Gram
GRIN	Glutamate [NMDA] receptor subunit zeta-1
Gs	Glutensiz
HCl	Hidroklorik asit
HKB	Hedef kadranda bulunma süresi
HKF	Hedef kadrana girme frekansı
HKS	Hedef kadranda geçirilen süre
HLA	İnsan lökosit antijeni
HRP	Horseradish peroxidase
IgA	Immünglobulin A
IgE	Immünglobulin E
IgG	Immünglobulin G
IgM	Immünglobulin M
IIFT	İndirekt İmmünfloresan Test
K ⁺	Potasyum
K	Kontrol
Kcal	Kilokalori
kg	Kilogram

LTD	Long term potentiation
LTP	Long term depression
max	Maksimum
Mg ⁺²	Magnezyum
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
min	Minimum
mL	Mililitre
Na ⁺	Sodyum
NaOH	Sodyum hidroksit
NCGS	Çölyak olmayan gluten duyarlılığı
ng	Nanogram
nm	Nanometre
NMDA	N-methyl-D-aspartat
NMDAR	N-methyl-D-aspartat reseptörü
PB	Platformu bulunma süresi
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PF	Platforma girme frekansı
PS	Platformda geçirilen süre
Rpm	Revolutions per minute
SEM	Standart hata
sn	Saniye
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TBM	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
THS	Toplam alınan yol
tTG	Doku-transglutaminaz
YG	Yüksek Glutenli

SIÇANLARDA GLÜTENLİ BESLENMENİN BİLİŞSEL İŞLEVLERE NMDA RESEPTÖRÜ ARACILI ETKİSİ

Yüksek Lisans Tezi

Nevin Deniz KIRCA

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Sinirbilimler Anabilim Dalı

ÖZET

Günlük diyetimizin önemli bölümünü oluşturan buğday, çavdar, yulaf içeren besinlerde bulunan glutenin, gluten intoleransı olmayan bireylerdeki etkileri ve bu etkilerin oluşum mekanizması günümüzde hâlen bir tartışma konusudur. Gluten proteini olan gliadine karşı oluşan bir immün yanıtın, gliadin ile NMDA reseptörünün aminoasit dizilimindeki benzerlik sonucu bir çapraz reaksiyona neden olabileceği ve bilişsel fonksiyonları etkileyebileceği hipotezi ileri sürülebilir. Bu çalışmada, gelişim döneminde, glutensiz ve farklı düzeylerde gluten içeren diyetle beslenmenin anksiyete, lokomotor aktivite, öğrenme ve bellek fonksiyonları üzerine etkilerini ve bu etkilerin olası oluşum mekanizmalarını belirlemek amaçlanmıştır.

İnfantil dönemden itibaren erkek Wistar albino sıçanlar 3 ay boyunca eşit kaloriye ve protein içeriğine sahip standart (%0,56, n=7), glutensiz (%0, n=8) ve yüksek glutenli (%12,56, n=7) yemle beslendi. Anksiyete ve lokomotor aktivite değişimleri, açık alan testi; öğrenme ve bellek işlevleri, Morris su tankı testi ile değerlendirildi. Beyin dokusu NMDA reseptör düzey değişimlerinin yanı sıra plazma anti-NMDAR, anti-doku transglutaminaz, anti-gliadin antikor ve alfa-2-makroglobulin düzeyleri IIFT ve ELISA yöntemleriyle belirlendi. Ayrıca plazma total protein, albumin ve globulin düzeyleri fotometrik yöntemle ölçüldü.

Yüksek gluten grubunun beden kitle indeksi, glutensiz beslenen gruba göre daha yüksek bulundu ($p<0,05$). Tüm diyet gruplarında beyin ve serebellum ağırlıkları, NMDA reseptör düzeyleri, anksiyete ve lokomotor aktiviteleri bakımından anlamlı bir fark yoktu. Ancak beyin NMDA reseptör düzeylerinin, düşük anksiyete göstergesi olan açık alan testi merkez alanda bulunma süreleri ile ters yönde korelasyon gösterdi ($r=-0,713$, $p=0,004$). Morris su tankı testinde tüm diyet grupları 4 gün eğitimin sonunda benzer mekânsal öğrenme performansı gösterdi. Ancak yüksek gluten grubunun toplam hareket süresi ve hızı, glutensiz gruba göre anlamlı olarak yüksekti ($p<0,05$). Ortalama hız 18,20 cm/sn olarak alındığında ise glutensiz grubun platformu bulma süresinin yüksek glutenli gruptan anlamlı olarak kısa olduğu bulundu ($p=0,016$). Yüksek glutenle beslenme, sıçanlarda, gliadin, doku transglutaminaz ve NMDA reseptörüne karşı immün yanıt oluşturmada ancak total protein ve globulin düzeylerinin glutensiz beslenen gruba göre anlamlı olarak yüksekti ($p<0,05$).

Sonuç olarak, literatür taramamıza göre **ilk kez bu tez çalışması ile** sıçanlarda infantil dönemden itibaren uzun süreli glutensiz ve farklı düzeylerde glutenli diyet ile beslenmenin, fiziksel gelişim, immün yanıt, anksiyete, lokomotor aktivite, öğrenme ve bellek fonksiyonları üzerine etkileri gösterildi.

Anahtar Sözcükler: diyet, gluten, mekânsal öğrenme, NMDA Reseptörleri, sıçan

Tezin sayfa adedi: 96

Danışman: Prof.Dr. Pınar AKAN



THE EFFECT OF GLUTEN IN RATS ON COGNITIVE FUNCTIONS VIA NMDA RECEPTOR

Master Thesis

Nevin Deniz KIRCA

DOKUZ EYLUL UNIVERSITY HEALTH SCIENCE INSTITUTE

Department of Neuroscience

ABSTRACT

The impact of gluten in foods containing wheat, rye and oats, as a large part of our daily diet, on individuals without gluten intolerance and the mechanisms behind these effects are still a matter of debate today. It can be hypothesized that an immune response to gliadin, a gluten protein, may cause a cross-reaction with NMDA receptor, and affect cognitive functions due to the similarities between the protein and the amino acid sequence of the receptor. In this study, it was aimed to determine the effects of long-term diets with different levels of gluten on anxiety, locomotor activity, learning and memory functions during the developmental period and to evaluate the possible mechanisms of these effects.

Male Wistar albino rats, in the infantile period, were fed standard (0.56%, n=7), gluten-free (0%, n=8) and high-gluten (12.56%, n=7) pellet feeds with the same calorie and protein content for 3 months. The open field maze was used to assess anxiety and locomotor activity changes, while the Morris water maze was used to assess learning and memory skills. The alterations in the levels of NMDA receptor in brain tissue, plasma anti-NMDAR, anti-tissue transglutaminase, anti-gliadin antibody and alpha-2-macroglobulin levels were measured using IIFT and ELISA methods. The levels of total protein, albumin and globulin in plasma were also determined by using the photometric method.

Body mass index of high-gluten group was higher than that of gluten-free group ($p < 0.05$). There was no significant difference among the diet groups in terms of brain and cerebellum weights as well as NMDA receptor levels, anxiety levels and locomotor activities ($p < 0.05$). However, the NMDA receptor levels were negatively correlated with the time spent in the central area, an indicator of low anxiety in the open field maze ($r = -0.713$, $p = 0.004$). After the training in the Morris water maze, all diet groups showed similar spatial learning performance. However, the total moving duration and the velocity of the high-gluten group were significantly higher than those of the gluten-free group ($p < 0.05$). When the average velocity was taken as 18.20 cm/sec, it was found that the time spent finding the platform area in the gluten-free group was significantly shorter than in the high-gluten group ($p = 0.016$). High-gluten diet did not result in an immune response against gliadin, tissue transglutaminase and NMDA receptor in rats, but total protein and globulin levels were significantly higher in high-gluten group with respect to the gluten-free group ($p < 0.05$).

In conclusion, according to our literature review, this thesis study demonstrated the effects of long-term feeding with gluten-free and the diets which have different amounts of gluten on physical development, immune response, anxiety, locomotor activity, learning and memory functions in rats from the infantile period for the first time. In addition, the relationship between the levels of brain tissue NMDA receptor and rat behavioral tests were evaluated.

Keywords: diet, gluten, NMDA receptors, rats, spatial learning

Page number: 96

Advisor: Prof.Dr. Pınar AKAN



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Gluten enteropatisi ya da duyarlılığı olan kişiler için temel tedavi yöntemi olarak glutensiz beslenme önerilir. Ancak günümüzde glutensiz beslenme konusu sağlıklı kişiler için de popülerlik kazanmış ve bu beslenme şekli, sağladığı faydalar açısından bir tartışma konusu haline gelmiştir.

Gluten, günlük diyet ile aldığımız buğday, çavdar, yulaf gibi bazı tahılların yapısında bulunan ve gliadin ile glutenin adında iki bileşenden oluşan bir glikoproteindir (1). Glutene maruziyet sonucu Çölyak, buğday alerjisi, gluten duyarlılığı gibi birçok patoloji ortaya çıkabilir (2). Ayrıca Çölyak ve Çölyak olmayan gluten duyarlılığı (NCGS); ataksi, periferik nöropatiler gibi nörolojik komplikasyonlara da neden olabilir (3). Günümüzde, Çölyak ve buğday alerjisi için kullanılan bazı biyobelirteçler bulunsa da NCGS hastalığını saptamak oldukça zordur.

Çölyak, gliadin ile tetiklenen ve ince barsakların yapısına zarar veren bir oto-immün hastalıktır. Toplumda görülme sıklığı % 1 olan Çölyak, bireylerde anti-doku transglutaminaz ve anti-gliadin antikörlerinin tespiti gibi serolojik yöntemlerle, ince bağırsak biyopsisinde epitel içi lenfosit artışı, kript hiperplazisi, villus atrofi gibi barsak dokusundaki bozulmalarla ve bunların yanı sıra HLA-DQ2/DQ8 haplotiplerinin varlığını araştıran genetik yöntemler ile tespit edilebilir (4). NCGS ise barsaklarda şişkinlik hissi, abdominal ağrı gibi bazı rahatsızlıklar olarak kendini gösterir. Toplumda %0.5-6 arasında görülen NCGS için, Çölyak hastalığının aksine, tanımlanmış bir biyobelirteç henüz bulunmamaktadır (5).

Son zamanlarda yapılan araştırmalar, Çölyak hastalığı ve NCGS'ye sahip bireyler arasında bilişsel bozukluk görülme riskinin, genel toplumla karşılaştırıldığında, daha yüksek olduğunu ortaya koymaktadır. Görülen bu bilişsel bozuklukların seyri, hastalığın kendini gösterme biçimine ve hastalığın bireylerde teşhis edilmesine kadar geçen süreye göre farklılık gösterebilir (6). Bunun yanı sıra özellikle NCGS'ye sahip bireylerde, bilişsel olarak bir bozulmadan ziyade, geçici, hemen göze çarpmayan ve kişide bellek, dikkat, karar verme gibi işlemlerde yavaşlama olarak tanımlanan "Beyin Sisi" (Brain Fog) durumu da gözlemlenen bir olaydır (7). Ayrıca Çölyak hastalığına sahip bireylerde, şizofreni ve majör depresif

bozukluk gibi hastalıkların görülme riski de genel topluma göre daha yüksektir (1). Ancak çölyak hastalığı ya da gluten duyarlılığından bağımsız olarak, uzun süreli glutensiz veya glutenli beslenmenin bilişsel fonksiyonlar ve sinir sistemi gelişimi üzerine etkileri günümüzde **henüz net olarak tanımlanmamıştır**.

Hipokampal öğrenme reseptörü olarak da bilinen N-Metil-D-Aspartat (NMDA) reseptörü glutamat duyarlı nöronal iyon kanalı proteini olup nöronal plastisitede anahtar role sahiptir. (8). Arumungham ve meslektaşları 2019'da yayınladıkları çalışmalarında, glutenin temel proteini olan gliadin ile NMDA reseptör proteini arasında amino asit dizilimi açısından bir benzerlik olabileceğini ileri sürmüşlerdir (9). Bu olası homoloji nedeniyle gliadine karşı oluşan antikorların, NMDA reseptörü ile çapraz reaksiyona girerek NMDA reseptör fonksiyonunu etkileyebileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, henüz yüksek gluten ile beslenmenin, immün yanıtı tetikleyip tetikleyemeyeceği ve gluten ile ilişkili olarak NMDA reseptörüne karşı da bir immün yanıt oluşup oluşamayacağı **bilinmemektedir**.

Yüksek oranda gluten içeren diyetin genel fiziksel gelişim ve sinir sistemi gelişimi ile birlikte öğrenme, bellek gibi bilişsel fonksiyonları etkileyebileceği ve bu olası fonksiyonel değişimlerin beyin dokusu NMDA reseptör düzeyi ile ilişkisinin olacağı **hipotezi** ileri sürülebilir. **Literatür taramamıza göre** henüz infantil dönemden itibaren uzun dönemli ve farklı düzeylerde gluten içeren diyet ile beslenmenin, bilişsel fonksiyonlara ve NMDA reseptör nöromodülasyonuna etkileri kontrollü ortam şartlarında **inceleyen bir çalışma yoktur**.

Bu tez çalışması ile standart, glutensiz ve yüksek düzeyde gluten içeren diyet ile uzun süreli beslenmenin, gluten ilişkili immün yanıt, beyin dokusu NMDA reseptör düzeyi ve bilişsel fonksiyonlar üzerine etkisini değerlendirmek **amaçlanmıştır**.

Çalışmamızın hedefleri aşağıda belirtildiği şekilde özetlenebilir:

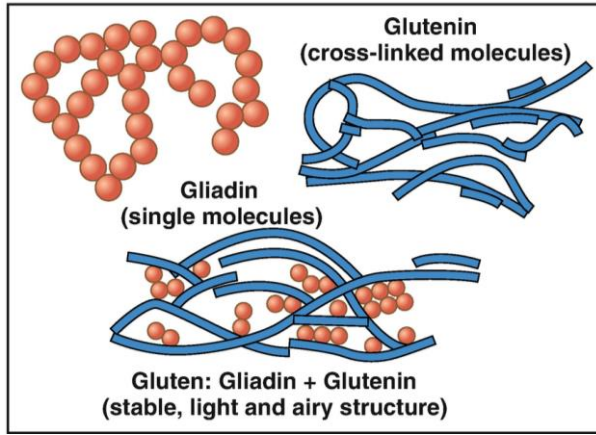
- İnfantil dönemden itibaren yüksek düzeyde glutenli veya glutensiz beslenmenin, gluten ilişkili immün yanıtı etkisinin belirlenmesi,
- Yüksek gluten ile beslenmenin genel fiziksel gelişim ve sinir sistemi gelişimi ve öğrenme, bellek gibi bilişsel fonksiyonlar üzerine etkisinin belirlenmesi,
- Günlük diyetteki gluten miktarı değişimlerinin, beyin dokusu NMDA reseptör düzeylerine etkisinin belirlenmesi,
- Sinir sistemi gelişimi ile ilişkili olası lokomotor aktivite ve bilişsel fonksiyon değişimlerinin beyin dokusu NMDA reseptör düzeyi ile ilişkisinin olup olmadığının belirlenmesi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Günlük Diyet ve Gluten

Sağlıklı yaşam ve sağlıklı beslenme her zaman olduğu gibi günümüzde de önem taşıyan konular arasındadır. Sağlıklı bir yaşama sahip olmak için uygulanması gerekenler arasında sağlıklı bir beslenme düzenine sahip olmak gelir. Son zamanlarda glutensiz beslenme gittikçe popüler hale gelmiş ve bazı kişilerce bir yaşam biçimi olarak benimsenmiştir. Glutene karşı hassasiyeti olan kişilerin yanı sıra herhangi bir sağlık problemi olmayan kişiler de “sağlıklı beslenme” ya da zayıflama amacıyla glutensiz beslenmeye başlamıştır. Ancak yeni bir trend haline gelen ve gluten bakımından zengin buğday, arpa ve çavdar içeren gıda maddelerinin azaltılmasını gerektiren bu beslenme biçiminin -özellikle buğdayın lif, demir, magnezyum ve bazı B grubu vitaminler bakımından zengin bir besin olduğu göz önüne alınırsa- sağlıklı yetişkinler üzerindeki etkileri belirsizliğini korumaktadır (10).

Tahıl tüketimi, diyetin tamamlayıcı bir parçasıdır. Günlük olarak tüketilen ekmek, makarna, kahvaltılık gevrekler gibi bazı besinler, buğday, arpa, mısır, yulaf, çavdar gibi tahıllardan elde edilen tohumların unundan yapılır. Bir tahıl tohumu 3 bileşenden oluşur: kabuk, ruşeym ve endosperm (11). Genel adıyla prolamin olarak bilinen proteinler, bir tohumun depo besinini oluşturan proteinlerdir ve endosperm kısmında bulunur. Her tahıl türünün kendine has prolamin proteinleri bulunur. Arpada bulunan prolamin proteinleri hordein, çavdardaki sekalin ve yulafta bulunan ise avenin proteinleridir. Gliadin, buğdayda bulunan prolamin proteini. Buğday gluteni, gliadin monomerleri ve glutenin polimerlerinin bir araya gelerek oluşturduğu karmaşık yapıya verilen isimdir (12). Buğday tanesinde bulunan proteinler, kuru ağırlığın %8-13'ünü oluşturur. Gluten ise toplam proteinin % 80-90'ını oluşturmaktadır (13).



Şekil 1: Gluteni oluşturan gliadin ve glutenin proteinleri (13)

Tahıl bazlı üretilen çoğu gıda buğday kullanılarak üretilir. Günlük diyetle çokça tüketilen ekmek, makarna, kek, kurabiyeler, hamur işleri ve birçok atıştırmalıkların yanı sıra işlenmiş etlerde, vejetaryen et ikamesi üretiminde, bazı şekerler, tereyağı ve soslarda kıvam artırıcı olarak, hatta ilaçlarda kaplama olarak bile buğdaydan elde edilen glutene rastlamak mümkün (14).

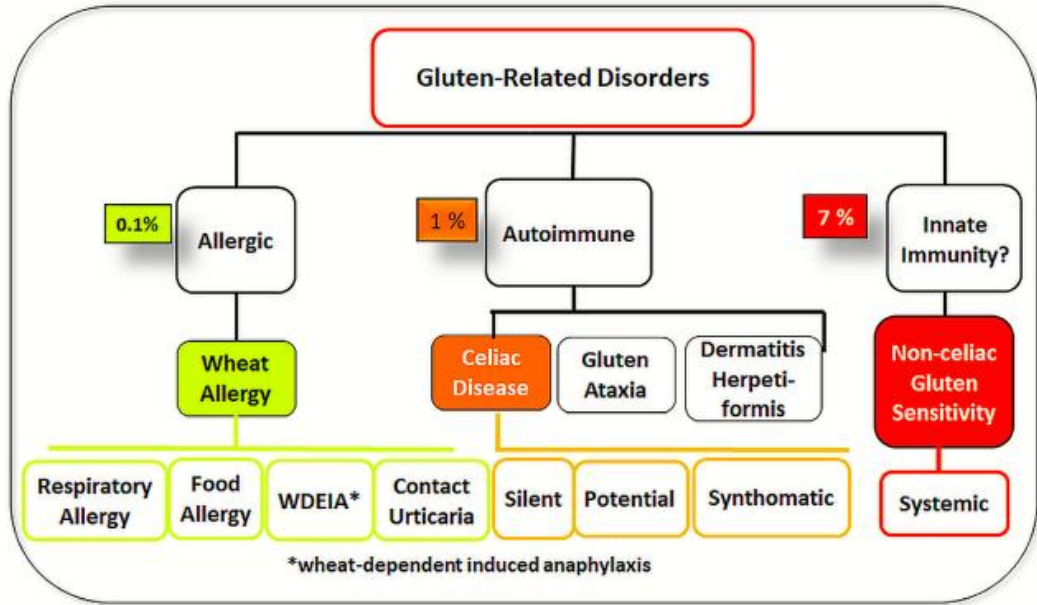
2.1.1. Proteinlerin Sindirimi ve Gluten

Diyet ile alınan proteinlerin sindirimi (proteoliz), midede pepsin enzimi ile başlar. Bir kısım peptit bağları parçalanmış polipeptitler, ince barsağın ilk bölümü olan duodenuma geçer ve burada pankreastan salgılanan tripsin gibi proteazlar sayesinde daha küçük oligopeptitlere ayrılır. Bu oligopeptitler, jejunumda, fırça kenar (*brush-border*) yüzey zarı olarak adlandırılan mikrovillüslerde bulunan eksopeptidazlar ve endopeptidazlar ile daha küçük oligopeptitlere parçalanır. Ortaya çıkan aminoasit, dipeptit ve tripeptitler barsak epiteli boyunca taşınırken kılcal damarlara sahip lamina propria tabakasından emilirler.

Gluten kompleksini oluşturan proteinlerden biri olan gliadin, epitop olarak adlandırılan bazı peptit dizilerine sahiptir. Bu gluten oligopeptitleri, gastrointestinal sistem boyunca gastrik, pankreatik ve intestinal sindirim enzimleri tarafından parçalanmaya oldukça direnç gösterir. Bunun nedeni olarak, gliadin proteininin prolin ve glutamin aminoasitleri bakımından zengin olması ileri sürülmektedir. Ayrıca, parçalanamadan intestinal boşlukta kalan oligopeptitlerin ince barsak bariyerini geçmesi sonucu vücutta bir immün yanıt oluşabilir (15).

2.2. Glutene Bağlı Gelişen Hastalıklar

Glutene bağlı gelişen hastalıklar, genel toplumun yaklaşık %1 ile %7'sini etkiler. Otoimmünite kaynaklı, alerji kaynaklı ya da bu iki nedene de bağlı olmadan gelişen olmak üzere 3 ana grupta toplanabilirler (16).



Şekil 2: Glutene bağlı oluşan hastalıklar ve toplumda yüzde görülme sıklıkları (16)

Şekil 2’de de ifade edildiği gibi glutenin tetiklediği otoimmün kaynaklı olan hastalıklar Çölyak hastalığı, gluten ataksisi ve Dermatitis Herpetiformis (Duhring) hastalığıdır. Bunlar arasında en yaygın görüleni Çölyak hastalığıdır (2).

2.2.1. Çölyak Hastalığı

Çölyak hastalığı, gluten tüketimiyle tetiklenen ve genetik bir yatkınlığa sahip kişilerde ince barsak mukozasında hasara neden olan bir otoimmün enteropatisidir. Hastalığın klasik belirtileri, kusma, ishal veya kabızlığın eşlik ettiği abdominal ağrı, şişkinlik, barsaklarda emilim bozukluğu ve kilo kaybıdır. Ayrıca atipik olan hastalarda, anemi, osteoporoz, periferik nöropati, baş ağrısı, yorgunluk gibi belirtiler görülebilir. Ancak Çölyak tanısında altın standart, ince barsak mukozasında lezyonlar, villus atrofi ve kript hiperplazisi gibi durumların tespiti. Hastalığa ait semptomların ortaya çıkması genelde belli bir zaman sonra olur. Avrupa toplumlarında

görölme sıklığı %1 civarındadır (4). İçinde Türkiye'nin de bulunduğı bir araştırmada, Asya-Pasifik bölgesinde aile geçmişinde Çölyak hastalığı olmayan kişilerde hastalığın görölme sıklığı %0,23 ile %1,41 arasında değişmektedir (17).

Çölyak hastalığının, bazı gastrointestinal belirtilerin yanı sıra gastrointestinal sistem ile doğrudan ilgili olmayan çeşitli belirtiler de içerebilmesi, hastalığın kesin olarak teşhis edilebilmesini geciktirebilir. Klinik muayene sonrası yapılacak serolojik testler ve histopatolojik değerlendirme, hastalığın doğru olarak tespit edilmesine yardımcı olabilir (18). Serolojik testlerle anti-doku transglutaminaz (tTG) olmak üzere, anti-deamide gliadin (DGP) ve anti-endomisyal (EMA) gibi bazı antikorlar tespit edilmeye çalışılır. Ayrıca Çölyak hastalığının oluşmasında genetik faktörler de önemli bir rol oynar. Çölyak tanısı almış hemen her hastada İnsan Lökosit Antijenleri'nin (HLA), DQ2 (%90-95) ya da DQ8 (%5) varyantı bulunmaktadır. Çölyak tedavisi için kabul edilen neredeyse tek tedavi yolu, ömür boyu glutensiz beslenmeye geçmektir (19).

2.2.2. Buğday Alerjisi

Buğday alerjisi, glutenin de içinde bulunduğı buğday proteinlerinin tetiklediğı ve kişide tipik alerjik bir tepkinin oluşmasında neden olan bir hastalıktır. En sık görülen besin alerjilerinden biridir. Genelde bebeklik ya da erken dönem çocukluk çağında ortaya çıkar. Hastalığın görölmeye başlandığı yaş yaklaşık 5,5 civarındır ve dünya genelinde yaygınlığı %0,5-1 arasındadır. IgE antikor artışı ile tespit edilir. Kişinin diyetinden buğday ve buğday ürünlerini çıktığında ve düzenli anti-histaminik kullanımında hastalığa ait semptomlarda azalma görölür (19).

2.2.3. Çölyak Olmayan Gluten Hassasiyeti

Çölyak olmayan gluten hassasiyeti (NCGS) ya da kısaca gluten hassasiyeti ise alerjik ya da otoimmün kaynaklı olmayan bir durumdur. Kişilerde, kilo kaybı, şişkinlik, abdominal ağrı, ishal gibi gastrointestinal belirtilerin yanı sıra yorgunluk, baş ağrısı hatta depresyon gibi semptomlar görülebilir. Ancak glutensiz beslenmeye geçildiğinde bu belirtiler ortadan kaybolur. NCGS ilk olarak Cooper ve meslektaşları (20) tarafından 1980 yılında tanımlanmıştır. Toplumda görölme sıklığı konusunda henüz kesin bir bilgi bulunmamaktadır. Bunun nedeni, hastalığın kesin teşhisinde

kullanılacak güvenilir bir biyobelirteç bulunamamasıdır. Ayrıca, NCGS ile ortaya çıkan bazı belirtiler İrritabl Barsak Sendromu ile de benzerlik gösterebilir. Ancak son zamanlarda dünyanın çeşitli bölgelerinde yapılan bazı araştırmalara göre görülme sıklığının %0,6 ile % 10,6 arasında değiştiği tahmin edilmektedir (21).

2.3. Öğrenme ve Belleğin Nörobiyolojik Temelleri

Öğrenme, duyularımız aracılığıyla çevremiz hakkında topladığımız bilgilerin davranışa yansması olarak tanımlanır. Aslında günümüzde öğrenme ile ilgili birçok kuram mevcuttur. Örneğin davranışçı kurama göre öğrenme, bir uyaran ve davranış arasında kurulan bağ sonucu ortaya çıktığını ve bu bağın pekiştirme yoluyla davranış değişimini meydana getirmesidir. Bilişsel kuramda öğrenme, kişinin çevresinde gerçekleşen şeylere bir anlam yüklemesidir. Nörobiyolojik öğrenmede ise kişinin çevresiyle olan etkileşimleri sonucu beyinde fizyolojik bir değişim gerçekleşir; bu durum öğrenme olarak tanımlanır (22). Bellek ise öğrenilen bilginin kodlanması, depolanması, pekiştirilmesi ve ihtiyaç anında geri çağırılmasıdır. Günümüze kadar yapılan çalışmalar sonucunda belleğin birçok türü olduğu ve beyinin farklı alanlarında depolandığı ortaya konulmuştur Dolayısıyla bellek türleri, işlevi (çalışma belleği-referans bellek), içeriği (episodik-semantik), depolanma süresi (kısa süreli-uzun süreli) ve bilinçli hatırlanması (açık-örtük bellek) gibi çeşitli şekillerde kategorize edilebilir (23).

2.3.1. *Hipokampus*

Hipokampus, bir gri cevher tabakası olup simetrik olarak beyin iki tarafında bulunan medial temporal lopta yer alır. Öğrenme, bellek, içgüdüsel davranışlar ve duygulanımda önemli bir rol oynayan limbik sistemin bir bölümüdür.

Hipokampus, hipokampal formasyon adı verilen, entorinal korteks ve subiculumu kapsayan parahipokampal girus ve dentat girusun da bulunduğu bir oluşumun parçasıdır. Anatomik olarak dört bölüme ayrılır: CA1,CA2,CA3 ve CA4. Hipokampusün görevleri, yeni bellek oluşumu, kısa süreli belleğin uzun süreli belleğe çevrilmesi, mekânsal bellek oluşumudur (24).

Hipokampusün multimodal duyuşal ve mekânsal bilgilerin aldığı yer entorinal kortektir. Entorinal kortekten çıkan aksonlar, dentat girusun granüler hücrelerine ulaşır. Bu yolak *perforant* yolak olarak adlandırılır. Bu bölgeden çıkan aksonlar ise yosunsu lifler yolağı olarak adlandırılan yol üzerinden hipokampusün CA3 bölgesindeki piramidal hücrelere ulaşır. Son olarak CA3 bölgesinden çıkan aksonlar, *Schaffer* kollateral yolağı üzerinden CA1 bölgesindeki piramidal hücre dentritleri ile uyarıcı sinaps oluştururlar. CA1 bölgesine ulaşan bilgi subiculum üzerinden hipokampal oluşum dıőına iletilir. Entorinal kortekten gelen bilgi,  sinaps bağlantısı üzerinden hipokampusün CA1 bölgesindeki nöronlara iletildiği için bu yolun adı trisinaptik yolak olarak adlandırılır. ğrenme ve bellek oluşumunda CA1 nöronları kritik öneme sahiptir (25).

2.3.2. *Hipokampal ğrenme Modeli*

Sinaptik plastisite, çevresel uyaranlara bağlı olarak sinapslarda meydana gelen değişimlerdir. Bu değişimler, geçici ya da kalıcı olabilir. Hücresel ve moleküler düzeyde gerçekleşen bu değişimler, uzun süreli uyarılma (*LTP*) ve uzun süreli depresyon (*LTD*) modelleri ile açıklanmaktadır. *LTP* modeli, iki nöron arasındaki sinyal iletiminin frekans artışına bağlı olarak bu nöronların sinaptik bağlantı gücünün ve sayısının kalıcı olarak artması şeklinde tanımlanır. *LTP* modelinde erken dönem *LTP* ve geç dönem *LTP* olmak üzere iki döneme ayrılır.

İstirahat membran potansiyeline yakın negatif potansiyellerde, NMDA reseptörünü bloke eden Mg^{+2} iyonları herhangi bir iyon geçişini engeller. Presinaptik nöronlardan salınan glutamat nörotransmitterleri postsinaptik nöronlarda bulunan AMPA ve NMDA reseptörlerine bağlanır. Ancak bu reseptörlerden sadece AMPA reseptörleri açılarak hücre içine Na^{+} girişine ve bir miktar K^{+} çıkışına izin verir. Presinaptik nörondan yeterli miktarda veya sıklıkta glutamat sentezlenmesi, postsinaptik nöronda depolarizasyona neden olur. Depolarizasyon, NMDA reseptörlerini bloke eden Mg^{+2} iyonlarının dıőarı atılmasını sağlar. Böylece NMDA reseptörleri, Na^{+} ve Ca^{+2} iyonlarının hücre içine girmesine izin verir.

Ca^{+2} , hücre içi sinyal yolaklarında ikincil mesajcı olarak görev yapan çok önemli bir moleküldür. Konsantrasyonu artan Ca^{+2} , hücre içinde birçok mekanizmayı

tetikleyerek postsinaptik membran üzerinde AMPA reseptör sayısını artırır ve yeni sinaptik bağlantıların kurulmasını sağlar. Bu evreye kadar gerçekleşen değişimler LTP modelinin erken döneminde gerçekleşir. Erken dönem LTP bellek edinimi olarak da tanımlanabilir.

Geç dönem LTP’de sinapslardan nöron çekirdeğine sinyal taşıyan mesajcı proteinler vasıtasıyla, yeni AMPA reseptörlerinin oluşumu ve yeni dentrit çıkıntılarının oluşmasını sağlayacak proteinlerin sentezi tetiklenir. Nöronlar arası yeni sinapsların oluştuğu (sinaptogenez) geç dönem LTP, edinilen belleğin korunmasına karşılık gelir.

NMDA reseptör bağımlı LTP modeli en çok hipokampüsün CA3 ve CA1 piramidal hücreleri arasında bulunan *Schaffer* kolleteral sinapslarında çalışılmıştır.

Sinaptik plastisitenin diğer bir formu olan LTD ise bazı sinaps bağlantılarında zayıflama durumudur. Presinaptik nörondan belli bir süre boyunca düşük frekansta gönderilen sinyaller, postsinaptik nöronda yeteri kadar güçlü olmayan depolarizasyona neden olur. Bunun sonucu hücre içine, LTP durumuna kıyasla, daha az miktarda Ca^{+2} girişi olur. Belirli bir eşik değerinin altında kalan Ca^{+2} , hücre içinde çeşitli yollarla tetikleyerek AMPA reseptörlerinin endositoz ile hücre içine alınmasına neden olur. Geçici olarak bağlantıları zayıflayan sinapslar için LTD durumu bir süre daha devam ederse artık kullanılmayan sinaptik bağlantılar ortadan kaldırılır (sinaptik budanma). LTD, hem LTP sayesinde güçlenen sinaptik bağlantıları dengelemek hem de öğrenme ve yeni hatıralar oluşturma hayat boyu devamlılığı için gereklidir (25)(26)(27).

2.3.3. Sıçanlarda Mekânsal Öğrenme ve Hipokampüs

Mekânsal öğrenme, öğrenileni hatırlama ve edinilen bu bilgiyi çevre uyaranlarla birleştirme yetisi, canlının hayatta kalmasına büyük katkı sağlayan bir davranıştır. Mekânsal bellek tanım olarak, canlının çevresini ve uzayda bulunduğu konumu kaydetmesidir. Günümüze kadar insanlar ve hayvanlarla yapılmış birçok çalışma sonucunda mekânsal yön bulma ve belleğin hipokampüs ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur (28).

Mekânsal bellek iki farklı kaynaktan gelen bilgiler doğrultusunda oluşturulur: egosantrik (canlının kendini merkez alarak oluşturduğu uzamsal bilgi) ve allosantrik

(canlının çevresine göre oluşturduğu uzamsal bilgi). O'Keefe and Nadel tarafından 1971'de yapılan çalışmalara göre sıçanların hipokampüsünde, bulundukları mekânlara ait bir kognitif harita bulunmaktadır. Hipokampüsün CA3 ve CA1 bölgelerinde bulunan ve *place cell* adı verilen piramidal hücre toplulukları bu haritanın oluşumunu sağlar. Çoğunluğu hipokampüste olan bu hücreler, hipokampal formasyonun çeşitli bölgelerinde de bulunmaktadır. Hayvan, tanıdık bir yere girdiğinde, daha önce bu yer için tanımlanmış nöronlar (*place cell*) uyarılır. Hayvan yeni bir ortama girdiğinde ise birkaç dakika içinde hipokampüste bu alana ait yeni bir haritalama yapılır. Yeni oluşturulan bu bilgiler birkaç hafta ile birkaç ay arasında korunabilir (25).

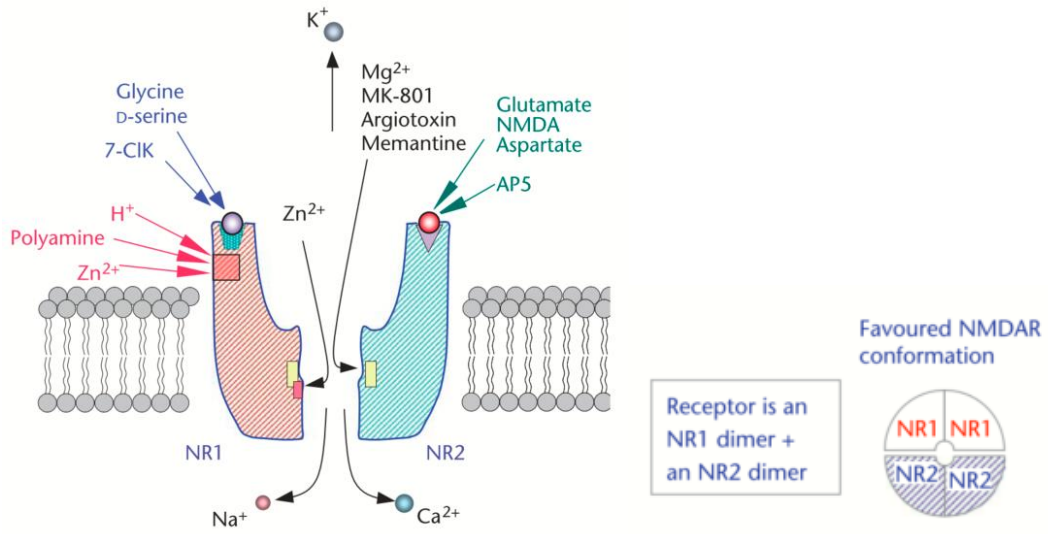
2.4. N-Metil-D-Aspartat (NMDA) Reseptörleri

N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörleri, postsinaptik nöronlarda bulunan bir tür glutamat reseptörüdür. Memeli beynindeki uyarıcı sinyal iletiminde esas aminoasit olarak görev yapan glutamatın bağlandığı glutamat reseptörlerinin, iyonotropik ve metabotropik olmak üzere iki tipi bulunur. İyonotropik glutamat reseptörleri ise NMDA reseptörleri (GluN), AMPA (2-amino-3-hidroksi-5-metil-izoksazol-4-il propanoik asit, GluA), Kainat (GluK) ve δ (GluD) reseptörleridir. Ayrıca, NMDA reseptörleri, sinaptik plastisite ve bellek oluşumunda önemli bir rol oynar (29).

2.4.1. Özellikleri, Alt Türleri

NMDA reseptör ailesi, sinaptik reseptörler arasında özel bir yere sahiptir. Bu reseptörler hem ligantlara karşı hem de voltaj değişimlerine karşı hassastır; NMDA reseptörlerinde iyon geçişi için glutamatın bağlanmasını, postsinaptik nöronun depolarize olması takip etmelidir.

NMDA reseptör ailesinin üç ana alt birimi bulunur: NR1, NR2 ve NR3 alt birimi. NR1 alt birimi tek bir genden (*GRIN1*) kodlanırken; NR2 alt birimleri *GRIN2A*, *GRIN2B*, *GRIN2C*, *GRIN2D* olmak üzere dört farklı gen tarafından; NR3 alt birimleri ise *GRIN3A* ve *GRIN3B* olmak üzere iki farklı gen tarafından kodlanır. Fonksiyonel NMDA reseptörleri heterotetramer yapıda bulunur: NR1 dimer yapısı her NMDA reseptöründe zorunlu olarak bulunurken, karşısında NR2 dimeri ya da NR3 dimeri gelir. NR1 alt birimi glisin bağlanma bölgesine sahipken, NR2 alt birimleri glutamat bağlanma bölgesine sahiptir (30).



Şekil 3: NMDA reseptör yapısı ve bağlanma (30)

2.4.2. *Kemirgen Beyninde NMDA Reseptörlerinin Yerleşimi*

Beyin gelişimi süresinde NMDA reseptör kompozisyonları değişime uğrar. Örneğin, NR1 alt birimi fetal dönem kemirgen beyinde hipokampus ve serebral korteksin temporal bölgesinde düşük düzeyde bulunur. Ancak yeni doğan dönemine gelindiğinde beyinde yaygın olarak eksprese edilir ve ömür boyu bol miktarda varlığını sürdürür (31).

NR2 alt birimleri ise ekspresyon düzeyleri olarak daha çarpıcı değişimler gösterir. Sıçanlarda, prenatal embriyonik dönemde, düşük seviyede de olsa yalnızca NR2B ve NR2D alt birimleri eksprese edilir ve zamanla ekspresyonları çoğalır. NR2B ekspresyonu, doğumdan sonraki ilk 3 hafta içinde hipokampus ve korteks bölgesinde en üst seviyeye ulaşır. Yetişkinlik döneminde ise hafifçe düşer. Postnatal 7.günde en üst seviyeye ulaşan NR2D ekspresyonu, sonrasında ciddi anlamda düşüş gösterir ve yetişkinlik döneminde sadece diensefalon ve mezensefalon bölgelerinde görülür. Başta, hipokampus ve korteks bölgesinde düşük seviyede olan NR2A ekspresyonu ise, doğumdan sonraki ilk 3 hafta içinde beyin tamamında artış gösterir. NR2C ekspresyonu, sadece serebellum ve olfaktör bulbusta görülür (32).

NR3A ve NR3B alt birimleri, embriyonik dönem gibi erken bir dönemde tespit edilebilir. NR3A ekspresyonunun olduğu bölgeler, serebral korteksin tüm alanları, amigdaloid çekirdekler, hipokampus, talamus, hipotalamus, beyin sapı ve omuriliklidir.

NR3A, sıçan beyinde, doğum sonrası erken dönemde en üst seviyede eksprese olsa da birkaç gün sonra kademeli olarak düşmeye başlar. NR3B alt birimi, sadece pons, orta beyin, medulla ve omurilikte bulunur. Postnatal yaklaşık 14.günde en üst seviyeye çıkan ekspresyon, yetişkinlik boyunca yüksek seviyede kalır (33).

2.4.3. NMDA Reseptörü ve Gliadin Homolojisi

2019 yılında Arumungham tarafından yayınlanan bir makalede, aşılarda yardımcı madde olarak kullanılan bitki proteinlerinden biri olan glutenden kaynaklanan NMDA reseptör oto-immünitesine dikkat çekilmiştir.

H1N1 virüsüne karşı geliştirilen bir aşının, H1N1 nükleoprotein peptidi ile insan hipokretin reseptör 2 proteinleri arasındaki benzerlik nedeniyle narkolepsiyi tetiklediği ortaya konmuştur. Bu benzerliği kanıtlayan BLASTP eşleşme skoru baz değer olarak alındığında, gliadin proteini ile insan NMDA reseptörü arasında da güçlü bir sekans uyumunun olduğu Arumungham'ın çalışmasıyla gösterilmiştir. Ayrıca bazı kişilerde aşılandıktan sonra buğdaya karşı artan bir alerjik tepki ile NMDA reseptörüne karşı oluşan ve daha önce var olmayan antikor yanıt bildirilmiştir. Bunun sonucu olarak, aşı yoluyla immünizasyonun ardından NMDA reseptör antikorlarının *de novo* sentezi, diyetle alınan gliadin antijenlerine maruziyet sonucu artabilir. Daha detaylı analizler sonucu, sadece buğdaya karşı değil, soya, yer fıstığı, susam, mısır gibi besinlerin de glutamat reseptörlerinin hem iyonotropik hem de metabotropik reseptör proteinleri ile güçlü bir sekans uyumunun olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla, beyin, kalp, pankreas ve bağışıklık sisteminin T hücrelerinde eksprese edilen glutamat reseptörleri, aşı ile indüklenen antikorlarla karşılaştığında tahrip olabilir (9)

2.5. Gluten ve Bilişsel Bozukluklar

Çölyak ve NCGS'nin; ataksi, periferik nöropati gibi bazı nörolojik “yan etkilere” sebep olduğu bilinen bir durumdur (3). Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar şunu gösteriyor ki gluten, kişilerde bilişsel işlev bozukluklarına da neden olabilir.

Çölyak ve NCGS hastaları, gluten tüketiminden kısa bir süre sonra ortaya çıkan ve halk arasında “Beyin Sisi” olarak ifade edilen, bilişsel işlevlerde hafif bir gerileme/yavaşlama durumu bildirmektedir. Beyin Sisi; bellek, dikkat, karar verme ve

bilişsel işlevlerin hızında yavaşlama olarak tanımlanabilir. Hemen fark edilemeyecek kadar hafif seyirli olan bu yavaşlama durumunun, kişinin gluten tüketimini kesmesiyle birlikte ortadan kalktığı ileri sürülmüştür (7).

2014 yılında yayınlanan bir boylamsal pilot çalışmada, glutensiz diyetin, hafif bilişsel bozukluk, yani “Beyin Sisi”, gösteren kişiler üzerinde etkisi incelenmiştir. Araştırmada, ortalama yaşı 30 olan ve yakın zamanda biyopsi ile Çölyak tanısı almış 11 kişilik grup, bir yıl boyunca glutensiz diyet uygulamıştır. İlk hafta ölçülen kan tTG antikor seviyesi, barsak geçirgenliği ile bilgi işleme etkinliği, bellek, dikkat gibi bilişsel işlev testlerinden elde edilen skor, çalışmada referans değer olarak alınmış ve 52 hafta sonra bu testler tekrar edilmiştir. Sonuçlar karşılaştırıldığında sıkı bir glutensiz diyet programı uygulamanın, dikkat, motor fonksiyonlar ve sözel akıcılık gibi bilişsel işlevlerde gelişmeyle birlikte, barsak mukozasında iyileşme sağladığı ortaya konulmuştur (34).

2016 yılında yayınlanan çift kör, plasebo kontrollü çapraz çalışmada, NCGS kriterlerini taşıyan kişilerde gluten tüketiminin anksiyete, depresyon ve bilişsel işlevler üzerine etkisi araştırılmıştır. Glutensiz diyet uygulayan altısı erkek toplam 16 katılımcı (ortalama yaş 51) 12 gr gluten içeren veya içermeyen (placebo) besin takviyesi tüketmiştir. 14 günlük beslenme düzenini takiben diğer diyet düzenine geçmeden 14 günlük arınma süresi verilmiştir. Beslenme dönemi öncesinde ve sonrasında kişilere Depresyon, Anksiyete ve Stres Ölçeği (*DASS*), Hafif Bilişsel Bozukluk Testi (*SCIT*) gibi testler uygulanmıştır. Alınan sonuçlara göre gruplar arasında depresyon ve anksiyete durumları arasında anlamlı bir fark bulunamamasına rağmen gluten tüketiminin, beslenme dönemi öncesi alınan baz verilere kıyasla SCIT yanıt sürelerinde yavaşlamaya neden olabileceği öne sürülmüştür (35).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırma, *in vivo* deneysel araştırma niteliğinde bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri Ve Zamanı

Araştırmada hayvanların beslenmesi, bakımı, açık alan ve Morris su tankı testleri Kasım 2019-Mart 2020 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı'nda tamamlandı. Kasım 2020-Mayıs 2021 tarihleri arasında ELISA testleri Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda, tüm sonuçların değerlendirilmesi ve istatistiksel analizler Sinirbilimler Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

3.3. Çalışma Materyali

Araştırmada, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı Laboratuvarından temin edilen, laktasyon dönemini tamamlamış ve oral yem tüketimine başlayan (yaklaşık 25 günlük) 22 adet erkek Wistar albino ırkı yavru kullanıldı. Hayvanlar, Kasım 2019 tarihinde Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı'ndan temin edildi.

3.4. Araştırmanın Değişkenleri

Bağımsız değişken, diyet yoluyla farklı oranlarda gluten alımıdır.

Bağımlı değişkenler; açık alan ve Morris su tankı test sonuçları, deney hayvanlarının ağırlıkları, boy uzunlukları, plazma anti-tTG IgG, anti-gliadin IgG, anti-NMDA IgG ve anti-NMDA reseptör IgG antikor düzeyleri, beyin dokusunda NMDA reseptör protein düzeyleri, plazma alfa-2-makroglobulin, glukoz, total protein, globulin ve albumin düzeyleridir.

3.5. Veri Toplama Araçları

3.5.1. Kullanılan Cihazlar

Araştırmada kullanılan cihazlar ve cihazların marka-model bilgisi Tablo 1’de verildi.

Tablo 1: Çalışmada kullanılan cihazlar

Kullanılan Cihaz	Markası/Kodu
Derin Dondurucu	Thermo Forma Model 705
İnkübatör	ThermoFisher Scientific, Steri-Cycle i160
TissueLyser II	Qiagen 85300
Santrifüj	Nuve NF400
Santrifuj	Eppendorf 5810 R
Mikroplak okuyucu	AMR-100
Floresan Mikroskobu	Euroimmun AG - EUROStar
Rutin biyokimya analizörü	Beckman Coulter AU5800

3.5.2. Kullanılan Kimyasallar, Kit Ve Malzemeler

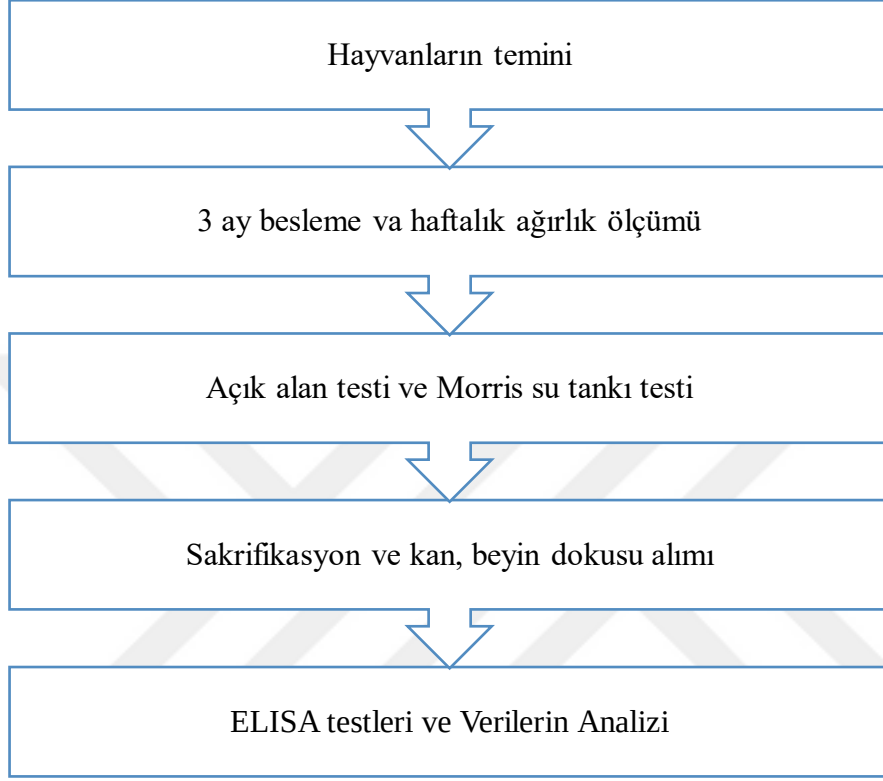
Araştırmada kullanılan tüm sarf malzemeleri Tablo 2’de verildi.

Tablo 2: Kullanılan sarf malzemeleri

Malzeme Adı	Markası/Kodu
Fosfat Tamponlu Salin (PBS)(pH 7.4)	Gibco (70011-036)
BCA Protein Tayini Kiti	ThermoFisher Scientific (23225)
Rat NMDA Reseptör 2 ELISA kit	Bioassay Technology Laboratory (E2430Ra)
Rat Anti-NMDA Ab IgG ELISA kit	Bioassay Technology Laboratory (ED0071Ra)
Rat Anti-doku Transglutaminaz ELISA kit	Bioassay Technology Laboratory (ED0072Ra)
Rat Anti-gliadin Ab IgG ELISA kit	Bioassay Technology Laboratory (ED0070Ra)
İndirekt İmmünfloresan Test (IIFT) glutamat reseptör (NMDA tip) kit	EUROIMMUN (FA 112d-1010-51)
Rat Alpha2Macroglobulin ELISA kit	LifeSpan BioScience, Inc (LS-F15622)

3.5.3. Deney Akış Şeması

Araştırma kapsamında yapılan çalışmalar akış şeması halinde Şekil 4'te gösterildi.



Şekil 4: Çalışma akış şeması

3.5.4. Gruplar ve Kullanılan Yem İçerikleri

Sıçanlar, kontrol grubu (K) (n=7), glutensiz grup (Gs) (n=8) ve yüksek glutenli grup (YG) (n=7) olmak üzere üç yem grubuna ayrıldı ve üç ay boyunca beslendi. Kullanılan yemlerin (ARDEN Araştırma & Deney, Ankara) içeriği Tablo 3'te gösterildi. Yemlerin içeriğine ait daha detaylı bilgi Ek-1'de verilmiştir. Yüksek glutenli grup, standart yem içeriğine 12 gr gluten (Vitalek) eklenerek oluşturuldu.

Tablo 3: Kullanılan yemlerin içerikleri (2900 kcal/Kg)

Diyet içeriği (gr/100gr)	Kontrol (K), (Standart Sıçan Yemi)	Glutensiz (Gs) Yem	Yüksek Glutenli (YG) Yem (+12gr gluten/100gr yem)
Toplam Protein	22	22	22
Kepek	+	-	+
Buğday	3.5	-	3.5
Soya küspesi	10	12	6.5
Mısır	3.0	-	-
Gluten (Doğal)	0.56	-	0.56
Gluten (Vitalek)	-	-	12.0
Ayçiçeği küspesi	-	-	-
Süt tozu	9.0	15,5	2,3
Kuru madde	87.76	87.76	87.76
Ham Yağ	4	4	4
Fiber	5.00	5.00	5.00
Mineral	7.74	7.74	7.74
Lizin	1.31	1.31	1.31
Metionin	0.50	0.50	0.50
Threonin	0.83	0.83	0.83
Triptofan	0.20	0.20	0.20
Metionin+Sistein	0.86	0.86	0.86
Su	5.7	4.2	5.2
ENERJİ (kcal/kg)	2900	2900	2900

3.5.5. Deney Hayvanlarının Barındırılması

Deney hayvanı çalışmaları, Dokuz Eylül Üniversitesi Multidisiplin Laboratuvarı Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (Protokol no: 14/2019) onayı ve hayvan deneyleri ile ilgili yerleşik etik kurallara uyularak gerçekleştirildi.

Çalışma başlangıcında, Dokuz Eylül Üniversitesi Multidisiplin Laboratuvarı Deney Hayvanları Biriminden yaklaşık 25 günlük, Wistar albino ırkı 22 adet erkek sıçan temin edildi. Deney süresince sıçanlar, 20-24°C oda sıcaklığında ve nisbi nem değeri %45-65 arasında olacak şekilde 12 saat gündüz/12 saat gece fotoperiyodu uygulanarak barındırıldı. Boyutları 482 x 267 X 210 mm olan polikarbon kafesler içindeki hayvanların yem ve su ihtiyacı deney boyu *ad libitum* olarak karşılandı.

Sıçanların ağırlıkları her hafta ölçüldü. Hayvanların Beden Kitle İndeksi (BKİ) hesaplaması, sakrifikasyon günü ölçülen vücut uzunluğu verileri kullanılarak vücut ağırlığı(gr)/vücut uzunluğunun karesi (cm²) şeklinde yapıldı. Çıkan sonuç 0,68 gr/cm² 'den büyükse hayvan obez olarak değerlendirildi (36).

Hayvanlarda obezite durumunu belirlemek için kullanılan Lee İndeksi hesaplaması, vücut ağırlığının küp kökü ($\sqrt[3]{gr}$)/ vücut uzunluğu(cm) şeklinde yapıldı. İlk kez Lee tarafından geliştirilen bu hesaplamada sonuç 1000 ile çarpılır, son çıkan değer 310 'dan büyükse hayvan obez olarak değerlendirilir (37). Yapılan bazı çalışmalarla Lee İndeksi ve sıçanlarda vücut yağı arasında korelasyonlar olabileceği ortaya konmuştur (38).

3.5.6. Açık Alan Testi

Açık alan testi, davranış çalışmalarında en sık kullanılan testlerden biridir. İlk olarak 1932 yılında Hall ve Ballachey tarafından, sıçanlarda anksiyete ile ilgili davranışlar, keşfetme davranışı gibi eylemleri gözlemlemek için kullanılmıştır (39).

Açık alan testinde, hayvan, 4 duvarla çevrilmiş açık bir alan içinde serbestçe dolaşır. Boyutları 100 x 100 cm² ile 60 x 60 cm² arasında değişebilen bu alan içinde hayvanın ne kadar süre merkez alanda durduğu, ne kadar süre kenar/köşe alanlarda durduğu, lokomotor aktivitesi gibi değişkenler ölçülür. Hayvanın açık alandan

kaçınması ve gezme/dolaşma davranışında bir düşüş olması anksiyete göstergesi olarak değerlendirilir (40).

Çalışmamızdaki sıçanlara, üç aylık beslenmenin ardından açık alan testi uygulandı. Davranış çalışmalarında kayıt ve bilgisayarlı veri toplama işlemi, Ethovision XT 13 (*Noldus Information Technology b.v.*, Hollanda) davranış yazılım paketi ile yapıldı.

Kullanılan açık alan 60 x 60 cm² ölçülerinde, siyah zeminli, 40 cm yüksekliğinde duvarlara sahiptir. Test alanı, sanal olarak 16 kareye bölündü ve bu karelerden ortadaki 4 tanesi “Merkez”, geri kalan kenar ve köşeleri kapsayan 12 kare “Perifer” olarak adlandırıldı. Merkez alana bırakılan sıçanların davranışları 5 dakika kayıt altına alındı.

3.5.7. Morris Su Tankı Testi

Morris su tankı testi ya da başka bir adıyla Morris su labirenti testi, ilk olarak 1984 yılında Morris tarafından, mekânsal öğrenme ve belleği ölçmek için geliştirilmiş bir testtir (41).

Testte, 120-200 cm çapında yuvarlak bir yüzme tankı, bir platform ve tankın çevresine yerleştirilmiş görsel ipuçları bulunmaktadır. Hayvan, görsel ipuçlarını kullanarak platformun yerini bulmayı öğrenir. Sıçanlar ve fareler, iyi yüzücülerdir. Kısa süreli yüzme aktiviteleri bu hayvanlarda strese neden olmaz. Hayvanın sudan kaçmak için çaba sarf etmesi ve su ortamının, koku gibi başka ipuçlarından faydalanmayı engellemesi gibi nedenlerle Morris Su Tankı testi diğer testlere göre avantajlıdır (42).

Morris su tankı testi, iki bölümden oluşur: eğitim (*trial*) ve test (*probe trial*) bölümleri. Eğitim bölümü, 2-5 gün arasında ve her gün 4 ya da 8 yüzme eğitiminden oluşur. Eğitim günlerinde hayvan, su tankı kadranının farklı yönlerinden suya bırakılır ve hayvanın, çevresel ipuçlarını kullanarak su altında bulunan platformu bulması beklenir. Test gününde ise, platform kaldırılır ve su tankı kadranının tek bir yönünden suya bırakılan hayvan, 60 saniye boyunca kamera kayıt sistemi ile kayıt altına alınır (42).

Basit olması, mekânsal öğrenme ve belleğin hipokampus ile bağlantısını açık bir şekilde ortaya koyması nedeniyle Morris su tankı testi “altın standart” olarak kabul edilir (43).

Deneyimizde sıçanlar, üç aylık beslemenin ardından glutenin öğrenme üzerine etkisini incelemek için Morris su tankı testine tâbi tutuldu. Davranış çalışmalarında kayıt ve bilgisayarlı veri toplama işlemi, Ethovision XT 13 (Noldus Information Technology b.v., Hollanda) davranış yazılım paketi ile yapıldı.

123 cm çapında, 63 cm yüksekliğinde olan tank, 40-45 cm yüksekliğe kadar su ile dolduruldu. Suyun yüzeyi, hayali olarak belirlenen, kuzey-güney ve doğu-batı eksenli olmak üzere birbirine dik iki çizgi ile 4 eşit alana ayrıldı. Bu iki çizgi arasında kalan kadranslar kuzeydoğu, kuzeybatı, güneydoğu, güneybatı olarak tanımlandı. Çapı 12 cm olan bir platform suyun yaklaşık 1 cm altında görünmeyecek şekilde güneybatı kadrana yerleştirildi. Tankın etrafına 4 ana yönde bulunacak şekilde görsel ipuçları yerleştirildi. Testin ilk 4 günü hayvanlara, 4 eğitim yüzdürmesi yapıldı. Hayvanlar yüzleri tank duvarına bakacak şekilde yavaşça suya bırakıldı. Her bir eğitim gününde suya bırakılma yön kombinasyonları değiştirildi (bu çalışma için gün gün sırasıyla güney-kuzey-doğu-batı, batı-doğu-kuzey-güney, kuzey-batı-güney-doğu, doğu-güney-batı-kuzey şeklinde). Eğitim günlerinde platformu bulmaları için sıçanlara 60 saniye verildi. Bu süre içinde platformu bulan sıçanların 10 saniye daha platformda kalmalarına izin verildikten sonra platformdan alındı. 60 saniye içinde bulamayanlar ise, araştırmacı tarafından platforma yönlendirilip platform üzerinde 10 saniye bulunmaları sağlandı. Süre sonunda sıçanlar platformdan alındı. Test günü olan 5. günde ise platform kaldırıldı ve hayvanlar tek bir yönden (kuzey) suya bırakıldı. 60 saniye kayıt alındıktan sonra hayvanlar sudan alındı. Deney süresinde sudan çıkan her bir hayvan elektrikli ısıtıcı ve havlu yardımıyla kurutuldu (44).

3.5.8. *Sakrifikasyon Sonrası Kan ve Doku Örneği Alımı*

Davranış testleri tamamlandıktan sonra sıçanlara eter anestezisi uygulandı. İlk olarak boy uzunlukları ölçüldü; burun ucu ile kuyruk başlangıcı arası boy uzunluğu olarak alındı (36). Sonrasında sıçanlar dekapitasyon yöntemi ile sakrifiye edildi. Beyin dokuları uygun yöntemler ile çıkarıldı. Çıkarılan bütün beyin dokuları buz aküsü üzerine hipokampus, frontal korteks ve serebellum bölgelerine ayrıldı ve yapılacak analizler için -80°C'lik derin dondurucuya kaldırıldı.

Ayrıca sıçanların vena kava kaudalisinden kan örneği alındı. Kan örnekleri, aynı gün 2000 g'de 10 dakika 4°C sıcaklıkta santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant plazma örnekleri ependorf tüplere ayrılarak sonraki analizlerde kullanılmak üzere -80°C'lik derin dondurucuya kaldırıldı.



Şekil 5: Bütün beyin dokusu

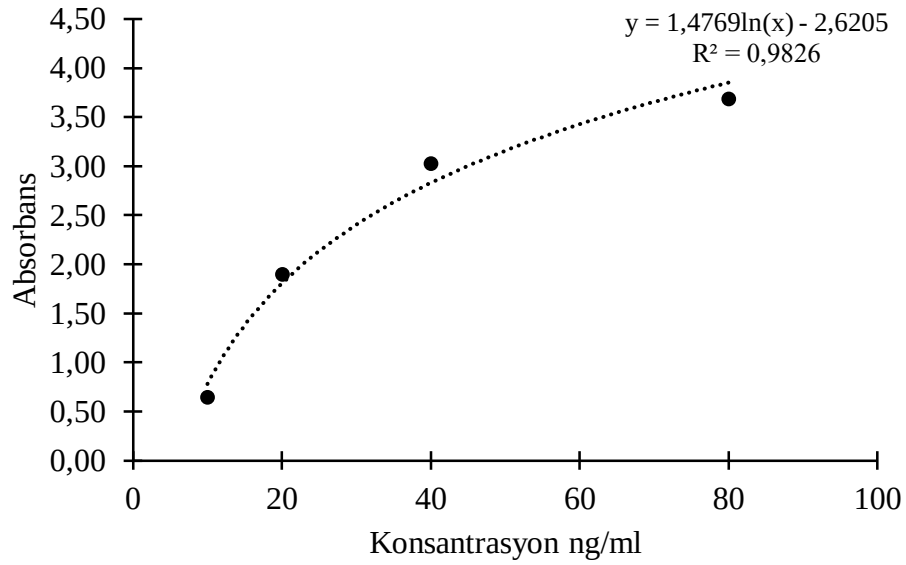
3.5.9. *Beyin Dokusu Homojenizasyonu*

Soğuk zincire uygun olarak her bir beyin dokusu tartıldı. Üzerlerine 1 mL soğuk PBS eklendi ve örnekler soğuk zincir bozulmadan *TissueLyser II (Qiagen)* kullanılarak frekans=30 (1/sn), 2 dakikalık periyotlar halinde 10 dakika homojenize edildi. Sonrasında örnekler 4°C sıcaklıkta 10.000 g'de 10 dakika santrifüjlendi. Oluşan süpernatantlar, her biri 150 µL olacak şekilde eppendorflara ayrılıp -80°C derin dondurucuya kaldırıldı.

3.5.10. *Sıçan Beyin Dokusunda NMDA Reseptör 2 Ölçümü*

Sıçanlara ait beyin örneklerinden Rat NMDA reseptör 2 konsantrasyonlarını (ng/mL) ölçmek için kantitatif *sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) yöntemi kullanıldı. Kit (*Bioassay Technology Laboratory China*, Kat No: E2430Ra) aşağıda belirtilen şekilde uygulandı.

- Beyin örnekleri PBS kullanılarak 1/200 oranında seyreltildi.
- Kit içeriğinde bulunan ve konsantrasyonu bilinen standart kullanılarak 80 ng/mL, 40 ng/mL, 20 ng/mL, 10 ng/mL, 5 ng/mL, 2,5 ng/mL, 0 ng/mL standart içerecek şekilde seri dilüsyonlar hazırlandı.
- Hazırlanan standartlar kuyucuklara 50 µL olarak, hazırlanan örnekler ise 40 µL olarak eklendi. Örneklerin üzerine kit içeriğinde bulunan 10 µL anti-NMDAR2 antikoru eklendi.
- Sonrasında 0 ng/mL standart (blank) bulunan kuyucuk hariç tüm kuyucuklara 50 µL streptavidin-HRP eklendi. İyice karıştırılıp üzeri kapatılan kuyucuklar 37°C’de 60 dakika inkübe edildi.
- Üzeri açılan kuyucuklar 0,35 mL yıkama tamponu ile her yıkama 1 dakika sürecek şekilde 5 kere yıkandı.
- Her bir kuyucuğa kit içeriğindeki Substrat A solüsyonundan 50 µL, Substrat B solüsyonundan 50 µL eklendi. Kuyucukların üzeri kapatıldı ve 37°C’de 10 dakika karanlıkta inkübe edildi.
- Kuyucuklara 50 µL sonlandırma solüsyonu eklendi. Tüm örneklerde maviden sarıya renk değişimi gözlemlendi.
- Kuyucukların absorbans değerleri plak okuyucu (BioTek ELX 800) ile 450nm dalgaboyunda ölçüldü.
- Hazırlanan standartların absorbans değerlerine göre bir standart eğrisi oluşturuldu ve örneklerin konsantrasyonları bu eğriye göre ng/mL cinsinden hesaplandı.
- Sonuçlar, eş zamanlı yapılan ve beyin dokusu örneklerinde *BCA* yöntemi ile hesaplanan protein değerlerine oranlanarak verildi (ng/mg protein).

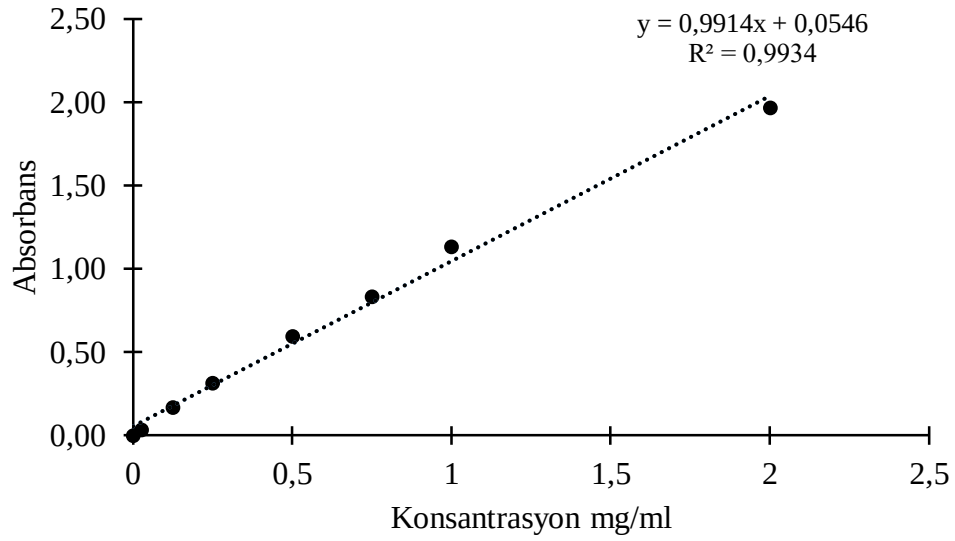


Şekil 6: NMDA reseptör 2 kalibrasyon grafiği

3.5.11. *Sıçan Beyin Dokusu Protein Ölçümü*

Her bir beyin örneğinin protein miktarı *BCA Protein Assay kit (ThermoFisher USA, Kat No: 23225)* kullanılarak ölçüldü. Kit uygulaması aşağıdaki şekilde yapıldı.

- Konsantrasyonu bilinen *Bovin Serum Albumin (BSA)* kullanılarak seri dilüsyonlar halinde 2000 µg/mL, 1000 µg/mL, 750 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 25 µg/mL ve 0 µg/mL yoğunluğunda standartlar hazırlandı.
- Kit yönergesine uygun bir şekilde *working reagent* hazırlandı.
- BSA standartları ve 1/5 oranında seyreltilen örneklerin her birinden 25 µL alınıp mikropalak kuyucuklarına konuldu.
- Her kuyucuğa 200 µL *working reagent* konuldu. Tüm kuyucukların üstü kapatıldı ve 37°C’de 30 dakika inkübe edildi.
- İnkübatörden çıkarılan plak oda sıcaklığına gelene kadar beklendi. Absorbans değeri plak okuyucu (BioTek ELX 800) ile 562 nm dalgaboyunda okutularak ölçüldü.
- Elde edilen absorbans değerlerine göre bir standart eğri grafiği oluşturuldu. Grafik eğim formülüne göre örneklerin içerdiği protein miktarı “mg/mL” cinsinden hesaplandı.



Şekil 7: BCA kalibrasyon grafiği

3.5.12. İndirekt İmmünfloresan ile Plazmada Anti-NMDAR Ölçümü

Sıçanlara ait plazma örneklerinde anti-NMDAR IgG ölçümü için semi kantitatif İndirekt İmmünfloresan test (IIFT) yöntemi kullanıldı. Kit (*EUROIMMUN Germany*, Kat No: FA 112d-1) uygulaması aşağıda belirtilen şekilde yapıldı.

- Plazma örnekleri 1/10 oranında kitin içinden çıkan ve distile suyla hazırlanan PBS-Tween ile seyreltildi.
- Hazırlanan örnekler 30 µL olarak reaktif tepsisi üzerine eklendi. Tüm örneklerin üstü kullanıma hazır BIOCHIP slaytları ile kapatılıp oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası BIOCHIP slaytları önceden hazırlanan PBS-Tween solüsyonu ile yıkanıp içinde PBS-Tween bulunan küvet içinde 5 dakika bekletildi.
- Tepsi üzerinde buluna her bir örnek üzerine 25 µL konjugat eklendi ve örneklerin kurummasına izin vermeden üzerlerine BIOCHIP slaytları kapatıldı. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda slaytlar PBS-Tween ile yıkanıp taze PBS-Tween ile doldurulan küvetlerin içinde 5 dakika bekletildi.

- Lamel üzerine max 10 µL olacak şekilde gömme ortamı (*mounting medium*) kondu ve küvetten çıkarılan slaytlar, reaksiyon yüzeyleri lamel ile temas edecek şekilde kapatıldı.
- Sonuçlar, 450-490 nm’de floresan mikroskopu (EUROSTAR) ile incelendi.

3.5.13. Sıçan Plazma Anti-gliadin Ölçümü

Sıçanlara ait plazma örneklerinde Rat Anti-gliadin IgG ölçümü için kalitatif *sandwich* ELISA yöntemi kullanıldı. Kit (*Bioassay Technology Laboratory China*, Kat No: ED0070Ra) uygulaması aşağıda belirtilen şekilde yapıldı.

- Plazma örnekleri PBS kullanılarak 1/20 oranında seyreltildi.
- Bir kuyucuk boş (*blank*) olarak seçildi ve hiçbir solüsyon eklenmedi.
- Kit içeriğinde bulunan pozitif ve negatif standartlar 50 µL olarak ayrı ayrı kuyucuklara konuldu.
- Örnek kuyucuklarına önce 40 µL *Sample Diluent*, sonra 10 µL seyreltilen örneklerden konuldu.
- Tüm kuyucukların üstü kapatılıp 37°C’de 30 dakika inkübe edildi.
- Üzeri açılan kuyucuklar 0,35 mL yıkama tamponu ile her yıkama 1 dakika sürecek şekilde 5 kere yıkandı.
- Boş (*blank*) kuyucuğu hariç tüm kuyulara 50 µL streptavidin-HRP eklendi.
- Tüm kuyucukların üstü kapatılıp 37°C’de 30 dakika inkübe edildi.
- Üzeri açılan kuyucuklar 0,35 mL yıkama tamponu ile her yıkama 1 dakika sürecek şekilde 5 kere yıkandı.
- Her bir kuyucuğa kit içeriğindeki Substrat A solüsyonundan 50 µL, Substrat B solüsyonundan 50 µL eklendi. Kuyucukların üzeri kapatıldı ve 37°C’de 10 dakika karanlıkta inkübe edildi.
- Kuyucuklara 50 µL sonlandırma solüsyonu eklendi. Tüm örneklerde maviden sarıya renk değişimi gözlemlendi.
- Kuyucukların absorbans değerleri plak okuyucu (BioTek ELX 800) ile 450nm dalgaboyunda ölçüldü.

3.5.14. *Sıçan Plazma Anti-doku Transglutaminaz Ölçümü*

Sıçanlara ait plazma örneklerinde Rat Anti-doku Transglutaminaz IgG ölçümü için kalitatif *sandwich* ELISA yöntemi kullanıldı. Kit (*Bioassay Technology Laboratory China*, Kat No: ED0072Ra) uygulaması aşağıda belirtilen şekilde yapıldı.

- Plazma örnekleri PBS kullanılarak 1/20 oranında seyreltildi.
- Bir kuyucuk boş (*blank*) olarak seçildi ve hiçbir solüsyon eklenmedi.
- Kit içeriğinde bulunan pozitif ve negatif standartlar 50 µL olarak ayrı ayrı kuyucuklara konuldu.
- Örnek kuyucuklarına önce 40 µL *Sample Diluent*, sonra 10 µL seyreltilen örneklerden konuldu.
- Tüm kuyucukların üstü kapatılıp 37°C’de 30 dakika inkübe edildi.
- Üzeri açılan kuyucuklar 0,35 mL yıkama tamponu ile her yıkama 1 dakika sürecek şekilde 5 kere yıkandı.
- Boş (*blank*) kuyucuğu hariç tüm kuyulara 50 µL streptavidin-HRP eklendi.
- Tüm kuyucukların üstü kapatılıp 37°C’de 30 dakika inkübe edildi.
- Üzeri açılan kuyucuklar 0,35 mL yıkama tamponu ile her yıkama 1 dakika sürecek şekilde 5 kere yıkandı.
- Her bir kuyucuğa kit içeriğindeki Substrat A solüsyonundan 50 µL, Substrat B solüsyonundan 50 µL eklendi. Kuyucukların üzeri kapatıldı ve 37°C’de 10 dakika karanlıkta inkübe edildi.
- Kuyucuklara 50 µL sonlandırma solüsyonu eklendi. Tüm örneklerde maviden sarıya renk değişimi gözlemlendi.
- Kuyucukların absorbans değerleri plak okuyucu (BioTek ELX 800) ile 450nm dalgaboyunda ölçüldü.

3.5.15. *Sıçan Plazma Anti-NMDA Ölçümü*

Sıçanlara ait plazma örneklerinde Rat Anti-NMDA Antibody IgG ölçümü için kalitatif *sandwich* ELISA yöntemi kullanıldı. Kit (*Bioassay Technology Laboratory China*, Kat No: ED0071Ra) uygulaması aşağıda belirtilen şekilde yapıldı.

- Plazma örnekleri PBS kullanılarak 1/20 oranında seyreltildi.
- Bir kuyucuk boş (*blank*) olarak seçildi ve hiçbir solüsyon eklenmedi.
- Kit içeriğinde bulunan pozitif ve negatif kontroller 50 µL olarak ayrı ayrı kuyucuklara konuldu.
- Örnek kuyucuklarına önce 40 µL *Sample Diluent*, sonra 10 µL seyreltilen örneklerden konuldu.
- Tüm kuyucukların üstü kapatılıp 37°C’de 30 dakika inkübe edildi.
- Üzeri açılan kuyucuklar 0,35 mL yıkama tamponu ile her yıkama 1 dakika sürecek şekilde 5 kere yıkandı.
- Boş (*blank*) kuyucuğu hariç tüm kuyulara 50 µL streptavidin-HRP eklendi.
- Tüm kuyucukların üstü kapatılıp 37°C’de 30 dakika inkübe edildi.
- Üzeri açılan kuyucuklar 0,35 mL yıkama tamponu ile her yıkama 1 dakika sürecek şekilde 5 kere yıkandı.
- Her bir kuyucuğa kit içeriğindeki Substrat A solüsyonundan 50 µL, Substrat B solüsyonundan 50 µL eklendi. Kuyucukların üzeri kapatıldı ve 37°C’de 10 dakika karanlıkta inkübe edildi.
- Kuyucuklara 50 µL sonlandırma solüsyonu eklendi. Tüm örneklerde maviden sarıya renk değişimi gözlemlendi.
- Kuyucukların absorbans değerleri plak okuyucu (BioTek ELX 800) ile 450nm dalgaboyunda ölçüldü.

3.5.16. Sıçan Plazma Rutin Biyokimyasal Ölçümler

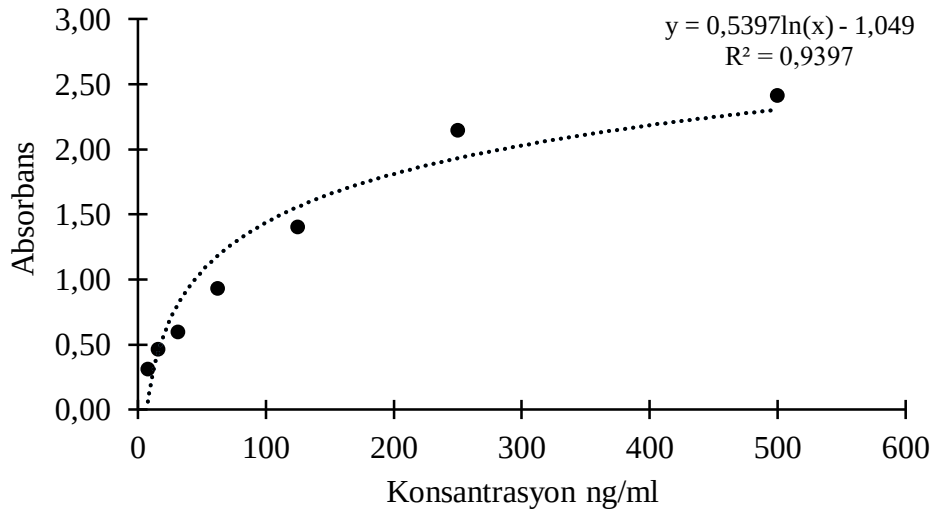
Rutin biyokimyasal analizler için TURKAK ISO15189 tıbbi laboratuvarlar için akreditasyon belgesine sahip Dokuz Eylül Üniversite Hastanesi Merkez Laboratuvarından hizmet alımı gerçekleştirildi.

Plazma glukoz, total protein, albumin ve globulin düzeyleri Beckman Coulter AU 5800 otoanalizöründe aynı marka kit kullanılarak fotometrik olarak ölçüldü.

3.5.17. Sıçan Plazma Alfa 2 Makroglobulin Ölçümü

Sıçanlara ait plazma örneklerinde Alfa-2-Makroglobulin ölçümü için kantitatif *sandwich* ELISA yöntemi kullanıldı. Kit (*LifeSpan BioSciences, Inc USA*. Kat No:LS-F15622) uygulaması aşağıda belirtilen şekilde yapıldı.

- Plazma örneklerinde bulunan antijenin kuyucuklardaki antikorlara daha iyi tutunum sağlaması için plazma örnekleri asit ile ön işlemden geçti:
50 µL plazma örneğinin üzerine 50 µL HCl eklenip vortekslendi. Tüplerin içinde ortamı nötrlemesi için 100 µL 0,1 N NaOH eklendi ve örnekler 4000 rpm'de 5 dk santrifüjlendi.
- Kit içeriğinde bulunan ve konsantrasyonu bilinen standart kullanılarak 500 ng/mL, 250 ng/mL, 125 ng/mL, 62,5 ng/mL, 31,25 ng/mL, 15,63 ng/mL, 7,815 ng/mL, 0 ng/mL standart içerecek şekilde seri dilüsyonlar hazırlandı.
- Hazırlanan standartlar ve örnekler kuyucuklara 100 µL olarak eklendi. Kuyucukların üstü kapatıldı. Plate, *shaker* üzerine yerleştirildi ve bir gece boyunca 4°C'de inkübe edildi.
- Ertesi gün kuyucuklarda bulunan sıvı çekildi ve her bir kuyucuğa 100 µL *Detection Reagent A* eklendi, kuyucukların üstü kapatıldı, 37°C'de *shaker* üzerinde 60 dakika inkübe edildi.
- Üzeri açılan kuyucuklar 0,35 mL yıkama tamponu ile her yıkama 1-1,5 dakika sürecek şekilde 3 kere yıkandı.
- Her bir kuyucuğa 100 µL *Detection Reagent B* eklendi, kuyucukların üstü kapatıldı, 37°C'de *shaker* üzerinde 60 dakika inkübe edildi.
- Üzeri açılan kuyucuklar 0,35 mL yıkama tamponu ile her yıkama 1-1,5 dakika sürecek şekilde 5 kere yıkandı.
- Kuyucuklara 90 µL *TMB solution* eklendi, kuyucukların üstü kapatıldı, yeterli renk değişimi gözlemlenene kadar (~11 dk) 37°C'de inkübe edildi.
- Kuyucuklara 50 µL sonlandırma solüsyonu eklendi. Tüm örneklerde maviden sarıya renk değişimi gözlemlendi.
- Kuyucukların absorpsiyon değerleri plak okuyucu (BioTek ELX 800) ile 450nm dalgaboyunda ölçüldü.



Şekil 8: Alfa 2 Makroglobulin kalibrasyon grafiği

3.6. Verilerin Değerlendirilmesi

Araştırmanın sonuçlarına ait istatistiksel analizler SPSS 24.0 versiyonu kullanılarak yapıldı. Çıkan sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata(SEM) olarak verildi. Sıçanların ağırlıklarının, BKİ ve Lee indeksi skorlarının, boy uzunluklarının, bütün beyin ve serebellum ağırlıklarının karşılaştırılmasında ayrıca açık alan testinde toplam alınan yol, ortalama hız, merkezde bulunma süresi ve periferde bulunma süresi değişkenlerinin karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi kullanıldı. Morris su tankı testinin 1-4.günleri için değerlendirilen platformu bulma süresi (PB) verilerinde yinelenen ölçümler varyans analiz testi kullanıldı. Morris su tankı testinin beşinci gününden elde edilen toplam alınan yol, ortalama hız, hedef kadrana girme frekansı (HKF), hedef kadranda geçirilen süre (HKS), hedef kadranı bulma süresi (HKB), platform alanına girme frekansı (PF), platform alanında geçirilen süre (PS), platformu bulma süresi (PB) ve toplam hareket edilen süre (THS) değişkenlerinin gruplar arası karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi kullanıldı. Fark yaratan grubun belirlenmesi için yapılan ikili karşılaştırmalarda, Dunn teoremine dayalı post-hoc testleri kullanıldı. Glutensiz (Gs) ve yüksek glutenli (YG) diyet gruplarının birbirleri ile karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Gs ve YG grupları arasında platformu bulma süresi (PB) ve hedef kadranı bulma süresi (HKB) değişkenleri, ortalama hız değişkenine göre kovaryans analizi kullanılarak düzeltildi. Düzeltme öncesi ortalama hız değişkeni ile bağımsız değişken olan yem grupları arasındaki olası ilişki regresyon analizi ile kontrol edildi ve herhangi bir ilişki olmadığı görüldü. Beyin dokusu NMDA reseptör 2 düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi kullanıldı. NMDA reseptörü ve açık alan değişkenleri arasındaki ilişkinin belirlenmesinde Spearman korelasyon analizi kullanıldı. Sıçanların glukoz, total protein, globulin, albumin ve alfa 2 makroglobulin değerlerinin gruplar arası karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi kullanıldı. Tüm istatistiksel verilerde anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

3.7. Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışmamızda kullanılan sıçanlar, özel olarak üretilen izokalorik yemlerle beslenmiştir. Yemlerde toplam protein miktarlarını eşitlenmek için süt tozu gibi proteinler kullanılmıştır. Saf gluten ya da gliadinin etkisi tespit edilememiştir. Ayrıca, kullanılan hayvan sayıları az olmasından dolayı gruplar arasında fark olmasına rağmen istatistiksel olarak bu farklar ortaya konulamamış olabilir. Çalışmamızda, Morris su tankı testi ile öğrenme fonksiyonları ölçüldü. Dört gün eğitim, bir gün test günü olarak uygulanan su tankı testi, tamamlandıktan bir hafta sonra tekrar edilerek sıçanların hatırlama kapasiteleri ölçülebilirdi ancak zaman ve yem kısıtı nedeniyle ölçülemedi. Ayrıca, hipokampal bölge nöron sayısı ve beyin dokusu NMDA reseptör ekspresyonu gösterebilecek histopatolojik inceleme için beyin kesitleri alınmış olsa da zaman kısıtlaması nedeni ile sonuçlar sunulamamıştır.

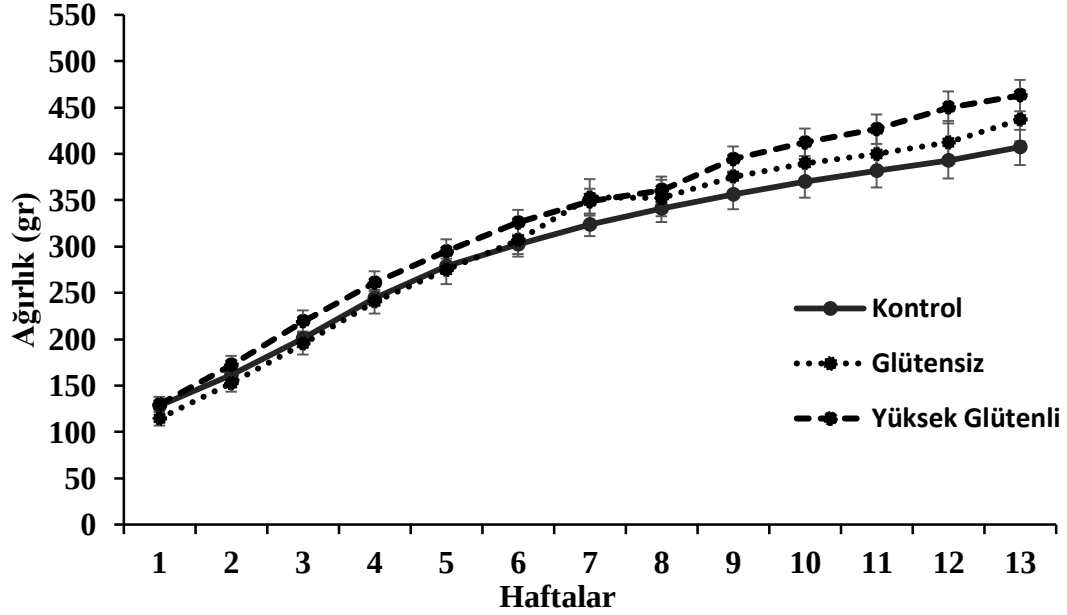
3.8. Etik Kurul Onayı

Bu çalışma 8 Mayıs 2019 tarihinde 14/2019 protokol numarası ile Dokuz Eylül Üniversitesi Multidisiplin Laboratuvarı Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. Belge Ek-2’de verilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Haftalık Ağırlık Ölçümleri

Sütten kesilmiş sıçanların katı yem ile beslenmeye başladıktan sonra yem gruplarına göre on üç haftalık ağırlık ortalamaları aşağıda Şekil 9’da gösterilmiştir.



Şekil 9: Sıçanların Kontrol, Glutensiz, Yüksek Glutenli yem gruplarına göre haftalık ağırlık ortalamaları (Ortalama $\pm$ SEM)

Sıçanların ilk hafta vücut ağırlıklarında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$). On üç haftalık beslenmenin ardından, gruplar arasında, son vücut ağırlığı ve toplam ağırlık artışı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$) (Tablo 4).

Tablo 4: Sıçanların gruplara göre ilk hafta ağırlıkları, son hafta ağırlıkları ve toplam ağırlık artışı grup ortalamaları

Ölçümler	Kontrol (K) (n=7)	Glutensiz (Gs) (n=8)	Yüksek Glutenli (YG) (n=7)	p
İlk vücut ağırlığı (gr)	128,29 $\pm$ 3,50	114,56 $\pm$ 7,87	129,64 $\pm$ 8,41	p>0,05
Son vücut ağırlığı (gr)	418,29 $\pm$ 19,13	423,25 $\pm$ 20,75	470,64 $\pm$ 18,26	p>0,05
Toplam ağırlık artışı (gr)	290,00 $\pm$ 19,42	308,69 $\pm$ 16,36	341,02 $\pm$ 12,85	p>0,05

Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak verildi.

4.2. Sıçanların Boy Uzunlukları

Sakrifikasyon günü eter anestezisi altında ölçülen boy uzunlukları, K grubunun ortalama $\pm$ SEM değeri 25,07 $\pm$ 0,07, Gs grubunun ortalama $\pm$ SEM değeri 25,75 $\pm$ 0,45 ve YG grubunun ortalama $\pm$ SEM değeri 25,43 $\pm$ 0,57 olarak ölçüldü. Gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($p > 0,05$) (Tablo 5).

Tablo 5: Sıçanların gruplara göre boy uzunlukları grup ortalamaları

Ölçümler	Kontrol (K) (n=7)	Glutensiz (Gs) (n=7)	Yüksek Glutenli (YG) (n=7)	p
Boy Uzunlukları (cm)	25,07 $\pm$ 0,07	25,75 $\pm$ 0,45	25,43 $\pm$ 0,57	$p > 0,05$

Sonuçlar Ortalama $\pm$ SEM olarak verildi.

4.3. BKİ ve Lee İndeksi Sonuçları

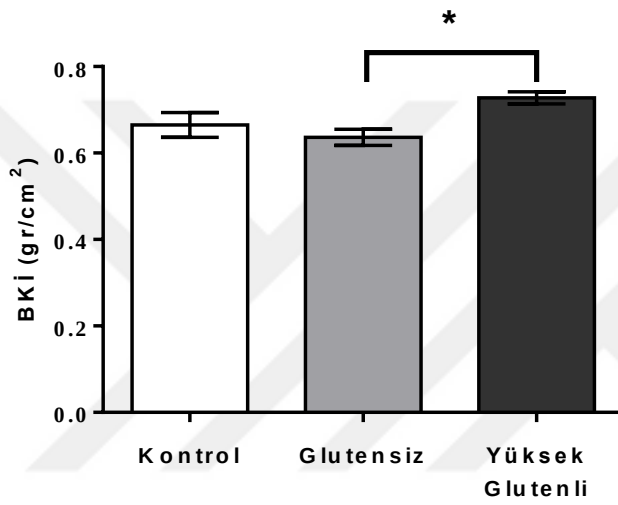
Sakrifikasyon günü ölçülen boy ve ağırlık verileri ile hesaplanan BKİ skoru, K grubunun ortalama $\pm$ SEM değeri 0,665 $\pm$ 0,03, Gs grubunun ortalama $\pm$ SEM değeri 0,636 $\pm$ 0,05 ve YG grubunun ortalama $\pm$ SEM değeri 0,727 $\pm$ 0,04 olarak hesaplandı. Gs grubunun BKİ değeri YG grubunun BKİ değerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulundu ($p = 0,023$) (Tablo 6). K grubunun BKİ değeri ile Gs ve YG gruplarının BKİ değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0,05$) (Şekil 10). Ayrıca, erkek Wistar albino sıçanlar için normal kabul edilen BKİ aralığının 0,45-0,68 g/cm² olduğu göz önünde bulundurulduğunda (36), YG grubunda bulunan sıçanların obez sınıfına girdiği belirlendi. K ve Gs yem gruplarının BKİ değerlerinin, belirtilen aralık içinde yer aldığı gözlemlendi (Tablo 6).

Sakrifikasyon günü ölçülen boy ve ağırlık verileri ile hesaplanan Lee İndeksi skoru, K grubunun ortalama $\pm$ SEM değeri 297,84 $\pm$ 11,41, Gs grubunun ortalama $\pm$ SEM değeri 291,14 $\pm$ 8,21 ve YG grubunun ortalama $\pm$ SEM değeri 306,02 $\pm$ 9,70 olarak hesaplandı. YG grubunun Lee İndeksi değeri, K ve Gs gruplarına göre yüksek olmakla birlikte bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0,05$) (Şekil 11). Sıçanlarda obezite değerlendirilmesinde 310 ve altındaki değerler normal olarak kabul edilir (37). K ve Gs grupları, bu değer altında kalırken, YG grup ortalaması 310 sınırına yakın olduğu gözlemlendi (Tablo 6).

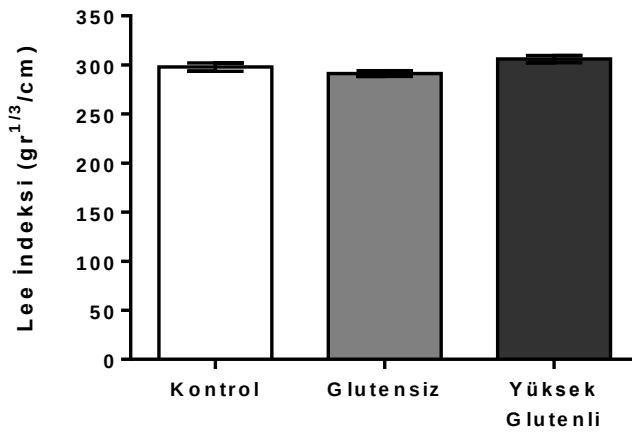
Tablo 6: Sıçanların gruplara göre BKİ ve Lee İndeks skoru grup ortalamaları

Ölçümler	Kontrol (K) (n=7)	Glutensiz (Gs) (n=8)	Yüksek Glutenli (YG) (n=7)	p ^a	p ^b
BKİ skoru (gr/cm ²)	0,665±0,03	0,636±0,05	0,727±0,04 ^c	p=0,029*	p=0,023*
Lee İndeksi skoru(³ gr/cm)	297,84±11,41	291,14±8,21	306,02±9,70	p>0,05	-

Sonuçlar Ortalama±SEM olarak verildi. a Kruskal Wallis testi. b İkili karşılaştırmalar Dunn teoremine dayalı testleri ile yapıldı. c Gs gruba göre anlamlı fark *Anlamlılık düzeyi p<0,05 olarak kabul edildi



Şekil 10: Gruplara göre BKİ (Ortalama ± SEM *İstatiksel olarak anlamlı fark p<0,05)



Şekil 11: Gruplara göre Lee İndeksi (Ortalama ± SEM)

4.4. Sıçanların Beyin Ağırlıkları

Sakrifikasyon sonrası elde edilen “bütün beyin” ağırlıkları K grubunun ortalama $\pm$ SEM değeri 2,016 $\pm$ 0,02, Gs grubunun ortalama $\pm$ SEM değeri 2,049 $\pm$ 0,05 ve YG grubunun ortalama $\pm$ SEM değeri 2,070 $\pm$ 0,10 olarak hesaplandı. Serebellum ağırlıkları K grubunun ortalama $\pm$ SEM değeri 0,300 $\pm$ 0,01, Gs grubunun ortalama $\pm$ SEM değeri 0,297 $\pm$ 0,004 ve YG grubunun ortalama $\pm$ SEM değeri 0,292 $\pm$ 0,01 olarak hesaplandı. Bütün beyin ve serebellum ağırlıkları karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($p>0,05$) (Tablo 7). Sakrifikasyon sırasında glutensiz gruba ait bir sıçanın beyin örneği alınamadığından bu grup için $n=7$ ’dir.

Tablo 7: Sıçanların bütün beyin ve serebellum ağırlığı grup ortalamaları

Ölçümler	Kontrol (K) (n=7)	Glutensiz (Gs) (n=7)	Yüksek Glutenli (YG) (n=7)	p
Bütün beyin ağırlığı (gr)	2,016 $\pm$ 0,02	2,049 $\pm$ 0,05	2,070 $\pm$ 0,10	$p>0,05$
Serebellum ağırlığı (gr)	0,300 $\pm$ 0,01	0,297 $\pm$ 0,004	0,292 $\pm$ 0,01	$p>0,05$

Sonuçlar Ortalama $\pm$ SEM olarak verildi.

4.5. Açık Alan Testi

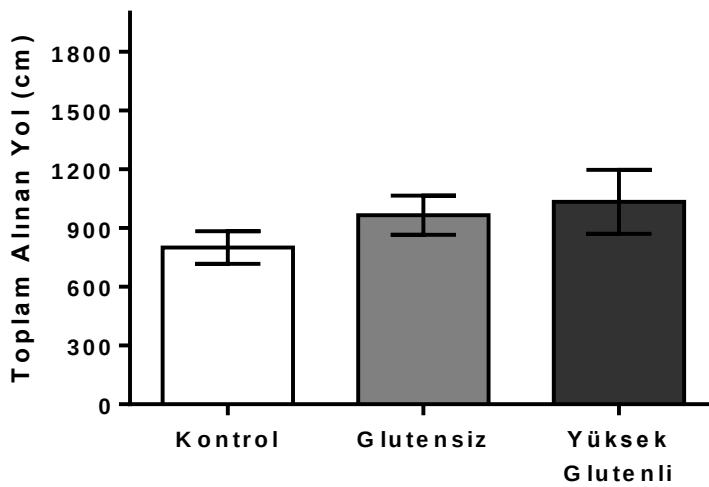
Üç aylık besleme süreleri tamamlandığında sıçanlara açık alan testi uygulandı. Açık alan testinde farklı miktarlarda gluten tüketiminin sıçanlarda lokomotor aktivite ve anksiyete üzerine etkisi değerlendirildi. Test sonucu elde edilen toplam alınan yol, ortalama hız, merkez alanda bulunma süresi, perifer alanda bulunma süresi ve toplam hareket edilen süre (THS) değişkenleri analiz edildi. Bu değişkenlere ait grup ortalamaları Tablo 8’de ifade edildi.

Tablo 8: Gruplara göre toplam alınan yol, ortalama hız, merkezde ve periferde bulunma süreleri, toplam hareket edilen süre (THS) grup ortalamaları

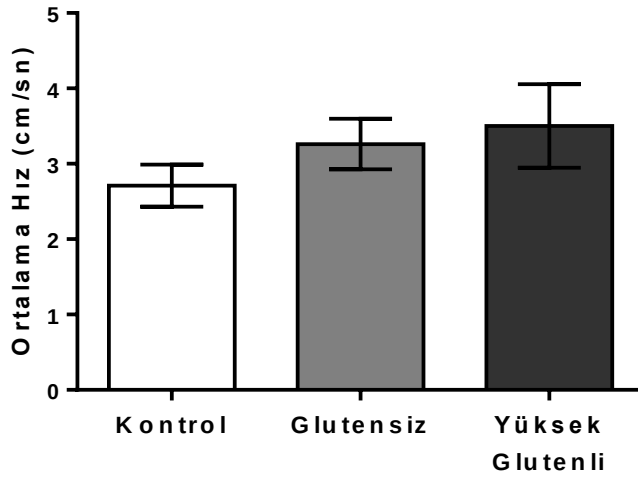
Ölçümler	Kontrol (K) (n=7)	Glutensiz (Gs) (n=8)	Yüksek Glutenli (YG) (n=7)	p
Toplam alınan yol(cm)	800,44±83,36	965,57±99,62	1034,92±163,30	p>0,05
Ortalama hız (cm/sn)	2,71±0,28	3,26±0,34	3,50±0,55	p>0,05
Merkezde bulunma(sn)	11,61±2,97	9,55±3,62	6,64±2,54	p>0,05
Periferde bulunma(sn)	283,64±2,86	286,40±3,58	288,86±2,37	p>0,05

Sonuçlar Ortalama±SEM olarak verildi.

Hayvanların lokomotor aktivitelerini karşılaştırmak için toplam alınan yol ve ortalama hız değişkenleri incelendiğinde, yem grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p>0,05) (Tablo 8) (Şekil 12) (Şekil 13).

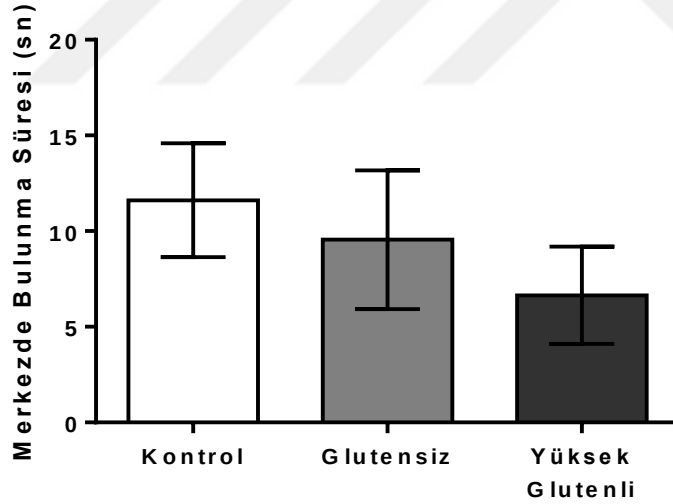


Şekil 12: Gruplara göre toplam alınan yol (Ortalama ± SEM)

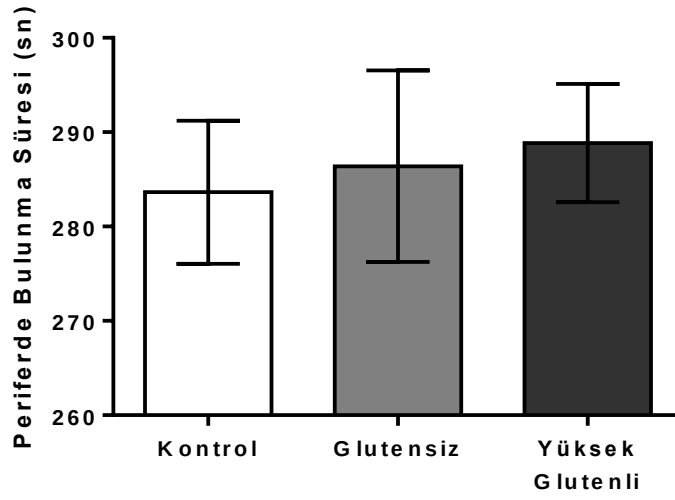


Şekil 13: Gruplara göre ortalama hız (Ortalama $\pm$ SEM)

Hayvanların anksiyete durumunu değerlendirmek için toplam hareket edilen süre (THS) ile merkez alanda ve perifer alanda geçirdikleri süreler yem gruplarına göre karşılaştırıldığında, gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$) (Tablo 8) (Şekil 14) (Şekil 15).

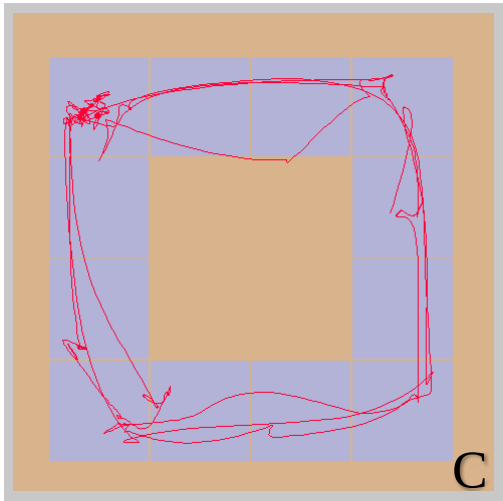
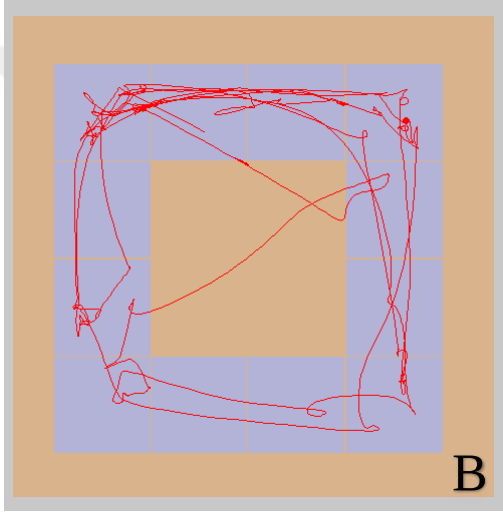
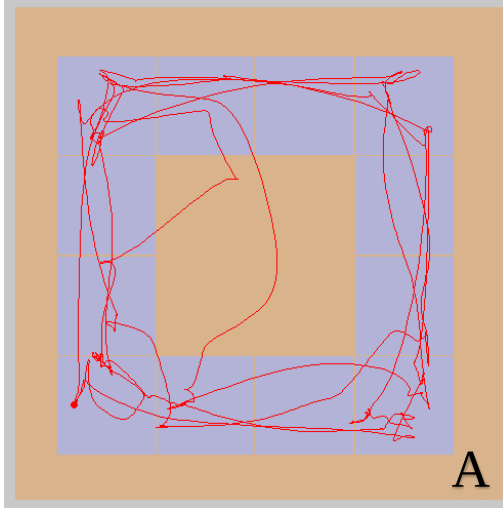


Şekil 14: Gruplara göre merkez alanda bulunma süresi (Ortalama $\pm$ SEM)



Şekil 15: Gruplara göre perifer alanda bulunma süresi (Ortalama $\pm$ SEM)

Merkezde ve periferde bulunma süreleri, grup içi birbiriyle karşılaştırıldığında, hayvanların yem grubu fark etmeksizin, perifer alanda merkez alana göre daha fazla zaman geçirdiği gözlemlendi (Tablo 8).



Şekil 16: Kontrol (A), Glutensiz (B) ve Yüksek Glutenli (C) gruplardan rastgele seçilmiş sıçanların açık alan testinde izlediği yolların şematik görünümü

4.6. Morris Su Tankı Testi

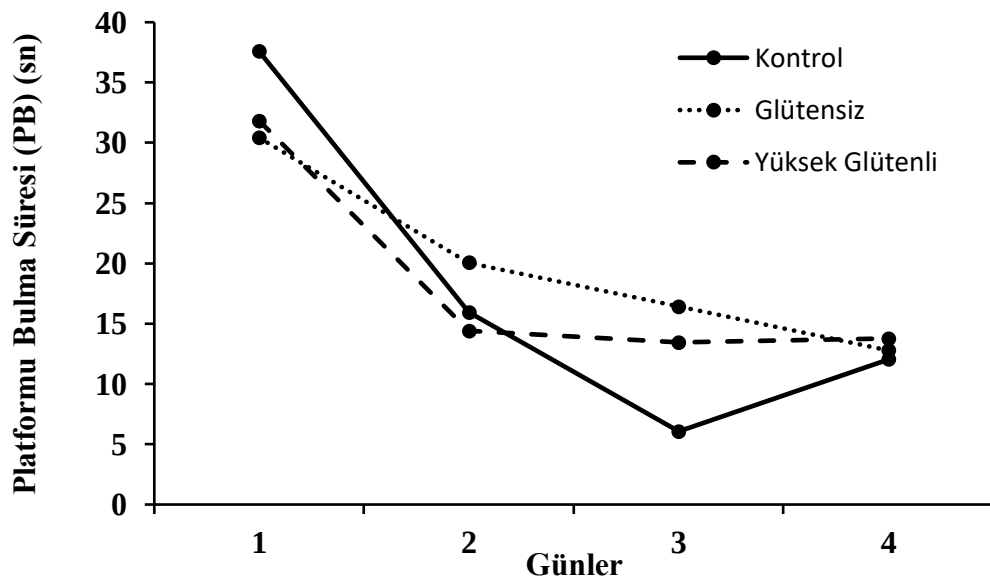
Üç aylık beslenme süreleri tamamlandığında sıçanlara Morris su tankı testi uygulandı. Morris su tankı testinde farklı miktarlarda gluten tüketiminin sıçanlarda mekânsal öğrenme üzerine etkisi değerlendirildi. Morris su tankı testinde ilk dört gün eğitim, eğitimleri takip eden gün test günü olmak üzere toplam beş gün boyunca sıçanlar yüzdürüldü. Platformun bulunduğu güneybatı kadranı, hedef kadrán olarak adlandırıldı.

İlk dört günlük eğitim yüzdürmesi sonucunda elde edilen platformu bulma (PB) sürelerinin grup ortalamaları aşağıda Tablo 9’da verildi. Ayrıca gruplara göre sıçanların 1-4. günlerdeki (eğitim günleri) PB değerinin grup ortalamaları aşağıda grafik olarak ifade edildi (Şekil 17).

Tablo 9: 1-4.günlerde platformu bulmak için geçen sürelerin (PB) grup ortalamaları

	Kontrol PB (sn) (n=7)	Glutensiz PB (sn) (n=8)	Yüksek Glutenli PB (sn) (n=7)
Günler			
1	37,58±4,14	30,42±4,17	31,83±4,40
2	15,96±3,46	20,05±3,62	14,39±3,16
3	6,07±1,02	16,41±3,67	13,45±2,99
4	12,04±3,10	12,78±2,50	13,75±2,49

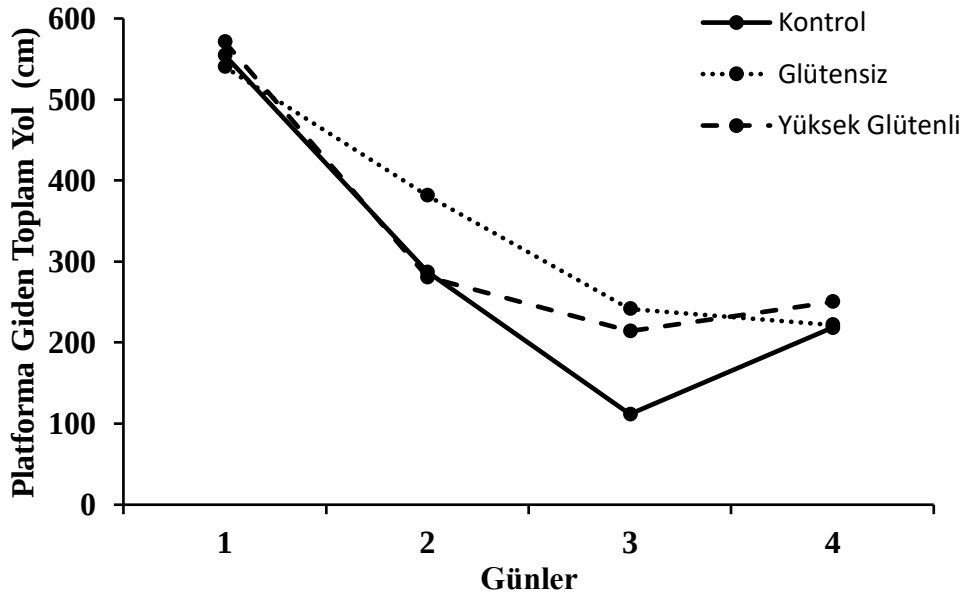
PB: Platformu bulma süresi grup ortalamaları. Sonuçlar ortalama±SEM olarak verildi.



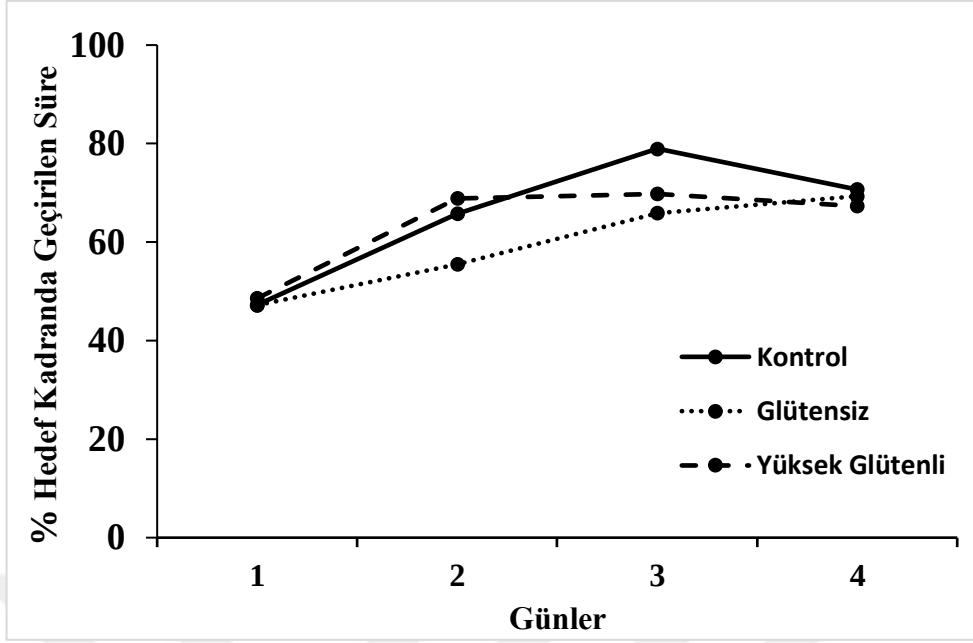
Şekil 17: Gruplara göre sıçanların 1-4. günlerdeki PB değeri grup ortalamaları

Dört günlük eğitim aşaması yinelenen ölçümler varyans analizi ile değerlendirildi. Yapılan istatistiksel analizde, 1. ve 4. günler arasında PB değerlerinde anlamlı fark bulundu ($p < 0,001$) (Şekil 17). Ancak yem grupları arasında anlamlı fark bulunmadı ($p = 0,734$). Ayrıca, günler x yem grupları etkileşimi de incelendiğinde anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($p = 0,206$).

1-4. günlerdeki eğitim yüzdürmesi sonucunda elde edilen platforma giden toplam yol ve hedef kadranda geçirilen sürelerin yüzdesine ait grup ortalamaları aşağıda grafik olarak ifade edildi (Şekil 18) (Şekil 19).



Şekil 18: Sıçanların 1-4. günlerdeki platforma giden toplam yol grup ortalamaları



Şekil 19: Sıçanların gruplara göre 1-4. günlerdeki hedef kadranda geçirilen sürelerin yüzdesi

Testin 5. günü su içine gizlenmiş platform çıkarıldı. Sıçanların ortalama hız değerleri analiz edildi. Ortalama hızlara ait grup ortalamaları Tablo 10’da ifade edildi.

Tablo 10: Yem gruplarına ait ortalama hız grup ortalamaları

Ölçüm	Kontrol (K) (n=7)	Glütensiz (Gs) (n=8)	Yüksek Glütensiz (YG) (n=7)	p
Ortalama hız (cm/sn)	17,95±1,35	16,70±1,07	19,91±1,18 ^a	p= 0,049*

Sonuçlar Ortalama±SEM olarak verildi. a Glütensiz gruba göre anlamlı fark *Anlamlılık düzeyi p<0,05 olarak kabul edildi.

Gruplar ikili olarak karşılaştırıldığında, YG grubun ortalama hızının Gs gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu belirlendi (p<0,05) (Tablo 10).

Gs ve YG yem grupları arasında ortalama hızda tespit edilen bu anlamlı farkın platformu bulma süresi (PB) ve hedef kadranı bulma süresi (HKB) değişkenleri üzerindeki etkisini ortadan kaldırmak için kovaryans analizi yapıldı. Ortalama hız değişkenine göre düzeltilen PB değişkeninin, yem grupları arasında istatistiksel bakımdan anlamlı olduğu (p=0,016) ve Gs grubun platform alanına YG grubuna kıyasla daha kısa sürede bulduğu tespit edildi (Tablo 11).

Tablo 11: Gs ve YG yem gruplarına ait düzeltilmiş PB ve HKB grup ortalamaları

Ölçüm	Glutensiz (Gs) (n=8)	Yüksek Glutenli (YG) (n=7)	p
Platformu bulma süresi PB (sn)	3,99±5,21	26,72±5,62	p= 0,016*
Hedef Kadranı Bulma Süresi HKB(sn)	4,40±2,26	3,93±2,44	p>0,05

Sonuçlar Ortalama±SEM olarak verildi. Tüm değerlere ortalama hız düzeltmesi (Ortalama hız=18,20) uygulanmıştır. *Anlamlılık düzeyi p<0,05 olarak kabul edildi.

Testin 5.gününe ait toplam alınan yol, hedef kadrana girme frekansı (HKF), hedef kadranda geçirilen süre (HKS), hedef kadranı bulma süresi (HKB), platform alanına girme frekansı (PF) ve platform alanında geçirilen süre (PS) verilerinin ortalama hız değişkenine göre düzeltilmiş sonuçları Tablo 12’de verildi.

Tablo 12: Gs ve YG yem gruplarına ait toplam alınan yol, ortalama hız, HKF, HKS, PF, PS ve THS ölçümleri grup ortalamaları

Ölçümler	Glutensiz (Gs) (n=8)	Yüksek Glutenli (YG) (n=7)	p
Toplam alınan yol(cm)	1064,46±2,83	1086,77±3,06	p<0,001*
HKF	5,13±0,27	5,57±0,29	p>0,05
HKS (sn)	24,20±2,24	23,99±2,41	p>0,05
PF	5,03±1,07	4,97±1,15	p>0,05
PS(sn)	2,62±0,64	1,71±0,69	p>0,05

Sonuçlar Ortalama±SEM olarak verildi. a Ortalama hıza göre düzeltilmiş değer (Ortalama hız=18,20). HKF: Hedef kadrana girme frekansı, HKS: Hedef kadranda geçirilen süre, PF: Platform alanına girme frekansı, PS: Platform alanında geçirilen süre

Yem grupları arasında, toplam alınan yol bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu belirlendi (p<0,001); YG grup, Gs gruba göre daha fazla mesafe kat etti. Hedef kadrana girme frekansı (HKF), hedef kadranda geçirilen süre (HKS), platform alanına girme frekansı (PF), platform alanında geçirilen süre (PS) sonuçları bakımından anlamlı bir fark bulunmadı (p>0,05) (Tablo 12).

Testin 5. gününe ait toplam hareket edilen süre (THS) değerleri analiz edildi. THS'ye ait grup ortalamaları Tablo 13'te ifade edildi.

Tablo 13: 3 yem grubuna göre THS ölçümleri grup ortalamaları

Gruplar	THS (sn)	p ^a	Post-hoc	p ^b
Kontrol (K) (n=7)	57,56±2,45	p= 0,001*	K-Gs	p=1,000
Glutensiz (Gs) (n=8)	54,69±2,46		K-YG	p=0,006*
Yüksek Glutenli (YG) (n=7)	59,23±0,13		Gs-YG	p=0,002*

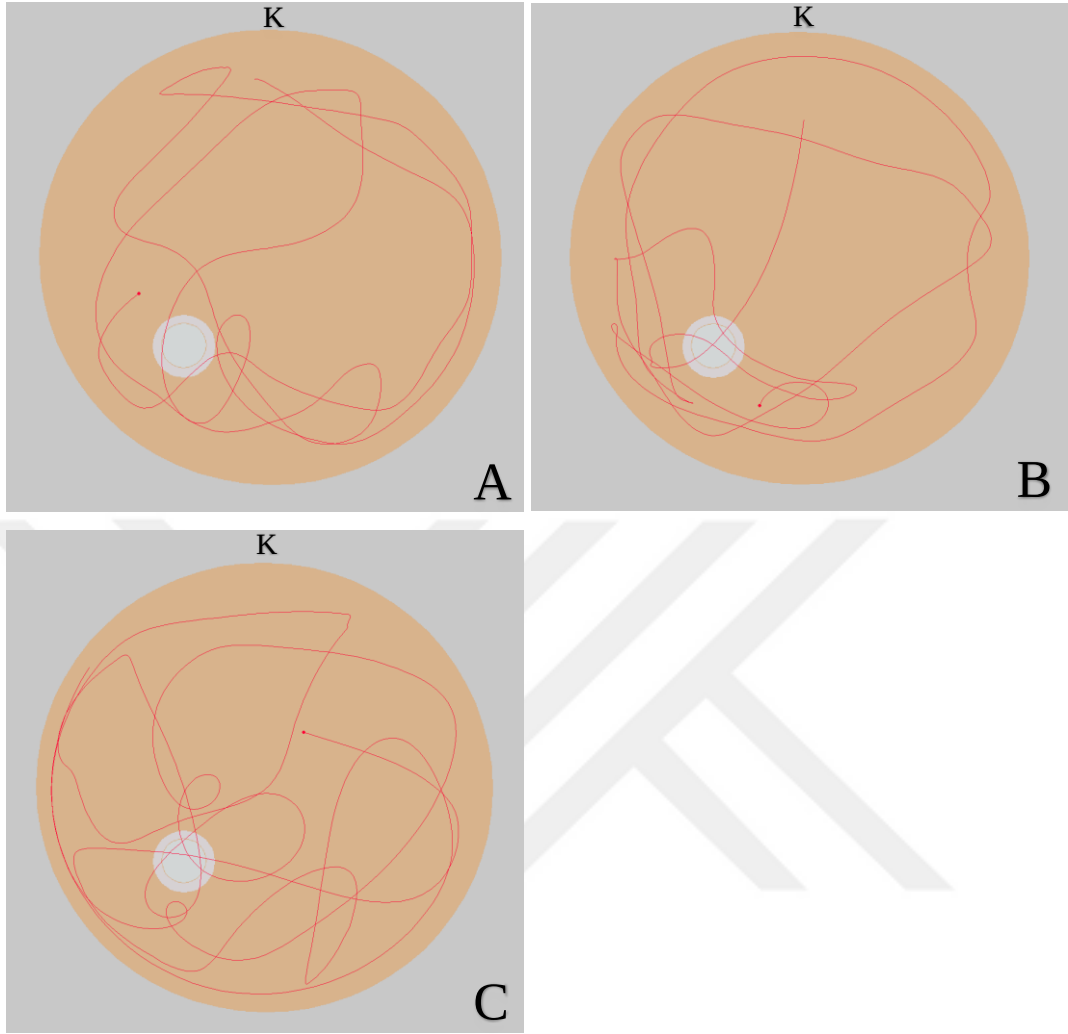
THS: Toplam hareket edilen süre. Sonuçlar Ortalama±SEM olarak verildi. a Kruskal Wallis testi yapıldı. b İkili karşılaştırmalar Dunn teoremine dayalı *post-hoc* testleri ile yapıldı. *Anlamlılık düzeyi p<0,05 olarak kabul edildi.

Sıçanların toplam hareket edilen süre (THS) sonuçları karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edildi (p=0,001). *Post-hoc* analizlerine bakıldığında, K ile Gs grupları arasında istatistiksel anlamlılık bulunmadı (p=1,000). K ve YG grupları incelendiğinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardı; YG grubunun THS değeri, K grubundan anlamlı olarak yüksekti (p=0,006). YG ile Gs grupları incelendiğinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu ve YG grubunun THS değerinin Gs grubundan anlamlı olarak yüksek olduğu gözlemlendi (p=0,002) (Tablo 13).

Ayrıca, su tankı testi 5.gün verilerine ait video görüntüleri tek tek incelendi. Yüksek glutenli grup toplam hareket süresi bakımından en çok hareket eden grup olmasına rağmen bu gruptaki sıçanların yüzme performansının platformu bulmaya yönelik olmadığı görüldü. Glutensiz gruptaki çoğu hayvanın ise suya bırakıldığı anda platformun bulunduğu alana yöneldiği gözlemlendi.



Şekil 20: Morris su tankı test günü



Şekil 21: Kontrol (A), Glutensiz (B) ve Yüksek Glutenli (C) gruplardan rastgele seçilmiş sıçanların Morris su tankı testinin 5.gününde kuzey (K) yönünden suya bırakıldığında izlediği yolların şematik görünümü

4.7. Sıçan Beyin Dokusu NMDA Reseptör 2 Düzeyi

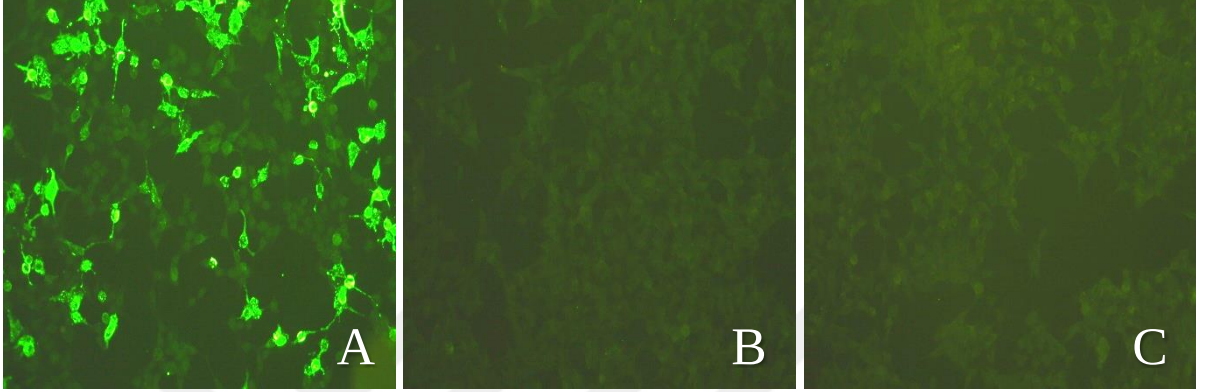
Sıçanların beyin dokusunda NMDA reseptör 2 düzeyleri K grubunda ortalama $\pm$ SEM değeri 840,22 $\pm$ 66,34 ng/mg, Gs grupta ortalama $\pm$ SEM değeri 785,32 $\pm$ 62,38 ng/mg ve YG grupta ortalama $\pm$ SEM değeri 826,56 $\pm$ 97,71 ng/mg olarak ölçüldü. Gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($p > 0,05$).

4.8. NMDA Reseptör 2 Düzeyi ve Açık Alan Testi Korelasyon Analizi

Sıçanların açık alan testi değişkenleri ile NMDA reseptör 2 düzeyleri arasındaki olası ilişkiler değerlendirildi. Glutensiz ve yüksek glutenli grubun NMDA reseptör 2 düzeyleri ile açık alan testi sonucu elde edilen merkez alanda geçirilen süre (%) değişkeni arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif yönde güçlü bir korelasyon olduğu görüldü ($r = -0,713$) ($p = 0,004$). Yani, NMDA reseptör düzeyleri arttıkça hayvanların merkez alanda geçirdiği süre azalmıştır. Bu sonucu destekleyecek şekilde, reseptör düzeyleri ve perifer alanda geçirilen süre yüzdeleri arasında ise istatistiksel olarak anlamlı pozitif yönde bir korelasyon görülmektedir ($r = 0,564$) ($p = 0,036$). Bu sonuca göre, hayvanların NMDA reseptör düzeyleri ile perifer alanda geçirdikleri süreler doğru orantılıdır; reseptör düzeyi daha fazla olan hayvanlar perifer alanı daha çok tercih etmişlerdir.

4.9. İndirekt İmmü Floresan ile Plazmada Anti-NMDAR Düzeyi

Rat plazmalarında anti-NMDAR antikor tespiti için IIFT yöntemi kullanıldı. Kit protokolüne uygun şekilde gerçekleştirilen analiz sonuçları kitin sağladığı pozitif ve negatif kontrol ile karşılaştırıldığında, tüm yem gruplarının plazma örneklerinde NMDA reseptörüne karşı anti-NMDAR IgG antikor artışı tespit edilemedi.



Şekil 22: Sıçan plazmasında anti-NMDAR antikor tespiti sonucu elde edilen 20X büyütmedeki görüntüler. Pozitif kontrol (A), Negatif kontrol (B), Örnek slayt (C)

4.10. Sıçan Plazma Anti-gliadin IgG Düzeyi

ELISA yöntemi kullanılarak kit protokolüne uygun şekilde gerçekleştirilen analiz sonuçları, kitin belirttiği *cut-off* değerine göre değerlendirildiğinde, tüm gruplara ait plazma anti-gliadin IgG sonuçları negatif *cut-off* değerinin altında kaldı.

Pozitif kontrol absorbansı=2,684

Negatif kontrol absorbansı=0,091

Cut-off değeri aşağıdaki gibi hesaplandı:

Cut-off: Negatif kontrol absorbansı + 0,15 = 0,241

4.11. Sıçan Plazma Anti-doku Transglutaminaz IgG Düzeyi

ELISA yöntemi kullanılarak kit protokolüne uygun şekilde gerçekleştirilen analiz sonuçları, kitin belirttiği *cut-off* değerine göre değerlendirildiğinde, tüm gruplara ait plazma anti-doku transglutaminaz IgG sonuçları negatif *cut-off* değerinin altında kaldı.

Pozitif kontrol absorbansı=1,737

Negatif kontrol absorbansı=0,076

Cut-off değeri aşağıdaki gibi hesaplandı:

Cut-off: Negatif kontrol absorbansı + 0,15 = 0,226

4.12. Sıçan Plazma Anti-NMDA IgG Düzeyi

ELISA yöntemi kullanılarak kit protokolüne uygun şekilde gerçekleştirilen analiz sonuçları, kitin belirttiği *cut-off* değerine göre değerlendirildiğinde, tüm gruplara ait plazma anti-NMDA IgG sonuçları negatif *cut-off* değerinin altında kaldı.

Pozitif kontrol absorbansı=1,313

Negatif kontrol absorbansı=0,064

Cut-off değeri aşağıdaki gibi hesaplandı:

Cut-off: Negatif kontrol absorbansı + 0,15= 0,241

4.13. Sıçan Plazma Biyokimyasal Analiz

Sıçanların plazmasından ölçülen glukoz, total protein, globulin ve albumin düzeyleri aşağıda Tablo 14’de verildi.

Tablo 14: Yem gruplarına ait glukoz, total protein, globulin, albumin düzeyleri

Ölçümler	Kontrol (K) (n=7)	Glutensiz (Gs) (n=7)	Yüksek Glutenli (YG) (n=7)	p
Glukoz (mg/dL)	155,57±8,16	168,57±14,18	197,43±31,17 ^a	p=0,007*
Total Protein (gr/dL)	5,97±1,94	5,84±0,21	6,34±0,28 ^b	p=0,004*
Globulin (gr/dL)	2,92±0,19	2,84±0,13	3,18±0,24 ^c	p=0,016*
Albumin (gr/dL)	3,05±0,03	3,01±0,06	3,16±0,04	p>0,05

Sonuçlar Ortalama±SEM olarak verildi. a Kontrole göre anlamlı fark b Kontrol ve Glutensiz gruba göre anlamlı fark c Glutensiz gruba göre anlamlı fark *Anlamlılık düzeyi p<0,05 olarak kabul edildi.

Yem gruplarına göre karşılaştırıldığında, YG grubun glukoz değeri, K grubuna göre yüksekti (p=0,007). Ayrıca YG grubun total protein düzeyinin, hem K hem de Gs gruba göre yüksek olduğu gözlemlendi (p=0,004) (Tablo 14).

4.14. Sıçan Plazma Alfa 2 Makroglobulin Düzeyi

Sıçanların plazmasındaki alfa 2 makroglobulin (A2MG) düzeyleri K grubunda ortalama $\pm$ SEM değeri 50,98 $\pm$ 0,48, Gs grupta ortalama $\pm$ SEM değeri 52,96 $\pm$ 1,51 ve YG grupta ortalama $\pm$ SEM değeri 51,00 $\pm$ 0,40 olarak ölçüldü. Gruplar arasında total protein düzeyleri bakımından anlamlı fark olduğu için A2MG değerleri total protein değerlerine bölündü ve gruplar yeniden karşılaştırıldı. Alfa 2 makroglobulin/total protein oranları (A2MG/TP), K grubunda ortalama $\pm$ SEM değeri 854,95 $\pm$ 16,52, Gs grupta ortalama $\pm$ SEM değeri 912,64 $\pm$ 30,14 ve YG grupta ortalama $\pm$ SEM değeri 805,48 $\pm$ 12,48 olarak hesaplandı. Elde edilen bu sonuçlara göre gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu belirlendi (p= 0,008). YG grubun A2MG/TP oranı, Gs gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüktü.

Tablo 15: Gruplara göre alfa 2 makroglobulin düzeyleri ve total proteine oranlanmış düzeyleri

Ölçümler	Kontrol (K) (n=7)	Glutensiz (Gs) (n=7)	Yüksek Glutenli (YG) (n=7)	p
A2MG (ng/mL)	50,98 $\pm$ 0,48	52,96 $\pm$ 1,51	51,00 $\pm$ 0,40	p>0,05
A2MG/TP (ng/gr)	854,95 $\pm$ 16,52	912,64 $\pm$ 30,14	805,48 $\pm$ 12,48 ^a	p=0,008*

Sonuçlar Ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. a Glutensiz gruba göre anlamlı fark *Anlamlılık düzeyi p<0,05 olarak kabul edildi.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışması ile laktasyon dönemini tamamlamış ve katı yem tüketimine başlayan, yaklaşık 25 günlük temin edilen Wistar albino erkek sıçan yavruları, infantil dönemden itibaren, pubertal dönemlerini (postnatal yaklaşık 1,5 ay) ve sosyal olgunlaşma dönemlerinin bir kısmını kapsayacak şekilde toplam 3 ay süre standart, glutensiz ve yüksek düzeyde gluten içeren yem ile kontrollü ortam şartlarında beslenmişlerdir. İnsan ömrü için 18 yaşa kadar sosyal olgunluğun tamamlandığı var sayıldığında, toplam 3 aylık beslenme süresi fiziksel ve psikososyal gelişimin etkilenmesine fırsat verebilecek, oldukça uzun bir süre olarak değerlendirilebilir (45). Standart sıçan yemlerinde doğal olarak yaklaşık ortalama 0,56gr/100gr gluten bulunurken, yüksek gluten içerikli yemlerde 12,56gr/100gr gluten oranına ulaşılmıştır. Enerji alımını dengelemek amacıyla, glutensiz ve glutenli tüm yemlerin enerji değerleri 2900 kcal/kg olacak şekilde belirlenmiştir. Wistar albino ırkı sıçanlar için genetik olarak herhangi bir gluten duyarlılığı tanımlanmamıştır (46). Transgenik hayvanlarda gluten duyarlılık modelleri oluşturmak için literatürde farklı çalışmalar mevcuttur. Örneğin, bir gluten duyarlılığı deney hayvanı modelinde, dışarıdan 7 hafta boyunca intragastrik gavaj yoluyla 2 mg glutenin haftada 3 kez olacak şekilde uygulanmasının, inflamatuvar yanıtı tetiklemeye ve intestinal hasar oluşturmaya yeterli olduğu gösterilmiştir (47). Ayrıca, farklı probiyotik türlerinin gluten duyarlılığının gelişimi üzerine etkileri olduğu ileri sürülmüştür (48). Bizim çalışmamızda, sıçan başına günlük ortalama yem tüketiminin yaklaşık 20 gr olduğu varsayıldığında (49), doğal oral beslenme yolu ile alınan gluten miktarının, yüksek glutenli grup için günlük toplam 2,5 gr gluten olduğu hesaplanabilir. Standart yem için günlük gluten alımının yaklaşık 0,112 gr olduğu hesaplandığında, yüksek gluten tüketimiyle standart yeme göre yaklaşık 22 kat daha fazla gluten alındığı görülecektir. Diğer taraftan bir grup sıçan, glutensiz yem ile kontrollü ortam şartlarında, bulaş riskine imkân vermeden beslenerek fiziksel gelişimleri takip edilmiştir. **Bizim çalışmamız ile literatür taramamıza göre ilk kez, gluten duyarlılığı olmaksızın infantil dönemden itibaren uzun dönemli glutensiz ve farklı düzeylerde gluten içeren diyet ile beslenmenin, fiziksel gelişim ve bilişsel fonksiyonlara etkisi kontrollü ortam şartlarında incelenmiştir.**

Glutene karşı herhangi bir hassasiyeti olmayan kişilerin de “sağlıklı beslenme” yöntemi olarak günlük diyetlerinden gluteni çıkarmasının sağladığı faydalar, günümüzde bir tartışma konusudur. Yapılan bazı insan ve hayvan çalışmalarında, glutensiz diyetin obezite riskini düşürdüğü, dolayısıyla obezitenin neden olduğu tip2 diyabet oluşumunu etkilediği ve ayrıca prenatal dönemde annenin uyguladığı glutensiz diyetin, postnatal dönemdeki bebekte tip1 diyabet oluşum riskini düşürdüğü ileri sürülmektedir (50). Ancak glutenin diyetten uzaklaştırılması ile ortaya çıkan bazı vitamin, mineral ve özellikle posa alımı gibi besin ögesi eksiklikleri de göz önünde bulundurulması gereken önemli faktörlerden biridir (51). Çalışmamızda, farklı oranlarda gluten içeren diyet ile üç aylık besleme süresince, sıçanların fiziksel gelişimleri takip edilerek besleme süresi sonunda vücut ağırlıkları, boyları, beyin dokusu ve serebellum ağırlıkları ölçüldü. Ayrıca kan glukoz, total protein, albumin, globulin düzeylerinin yanı sıra NMDA reseptör fonksiyonu ile ilişkili olabilecek biyokimyasal parametreler değerlendirildi. Çalışmamız ile sıçanların kan ve beyin dokusu örneklerindeki biyokimyasal değişimlerin, hayvan davranış testleri ile ilişkisi belirlenmeye çalışıldı.

İnfantil dönemden pubertal dönemi kapsayacak şekilde üç ay süren besleme süresince, yem gruplarının haftalık vücut ağırlıklarında düzenli olarak bir artış olduğu görüldü. Hayvanların ilk hafta ölçülen vücut ağırlıkları ile son hafta ölçülen vücut ağırlıklarının, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermediği belirlendi. Ayrıca son hafta ölçülen vücut ağırlıkları ile ilk hafta ölçülen vücut ağırlıklarının farkından elde edilen toplam vücut ağırlığı artışları gruplar arası karşılaştırıldı. Yüksek gluten ile beslenen grubun ortalama toplam vücut ağırlığı artışı, tüm gruplara göre en yüksek ve standart yem ile beslenen kontrol grubunda ise en düşük olmakla birlikte, vücut ağırlıkları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Yemlerin toplam kalorilerinin 2900 kcal/kg düzeyine eşitlendiği göz önüne alındığında bu durum doğal olarak kabul edilebilir. Çalışmamızda kullanılan diyetlerin toplam protein, yağ, mineral ve esansiyel aminoasit miktarları da eşitlenmiştir.

Çalışmamızdaki diyetlerde protein kaynağı olarak çeşitli besin maddeleri kullanılmakla birlikte tüm yemlerde protein miktarı 22gr/100gr yem olacak şekilde

eşitlenmeye çalışılmıştır. Ayrıca, glutensiz yem içeriğinde süt tozu miktarı yüksek glutenli yeme göre yaklaşık 7 kat daha yüksek düzeyde bulunmaktaydı. Diyet ile alınan protein çeşidinin gelişime etkisini inceleyen Alippi ve meslektaşları 2012 yılında yayınladıkları araştırmada, diyetlerinde protein kaynağı olarak sadece kazein veya sadece buğday gluteni kullanılan 30 günlük Sprague-Dawley ırkı sıçanların iki aylık gelişimlerini takip etmiştir. Protein kaynağı olarak buğday gluteni içeren yem grubundaki hayvanların, kazein içeren yem grubundaki hayvanlara göre ağırlık artışlarının daha az olduğu bulunmuştur (52). Ayrıca Alippi ve meslektaşları, gelişim süreci boyunca gluten grubundaki sıçanların boy uzunluklarının kazein grubuna göre daha kısa olduğunu belirlemişlerdir. Bununla birlikte vücut ağırlığı-boy uzunluğu arasındaki korelasyonun oldukça yüksek olduğu, yani hayvanın sahip olduğu kilo ile boyunun uyum içinde olduğu gözlemlenmiştir. Araştırmacılar, ağırlık-boy arasındaki bu ilişkiden dolayı hayvanların boy uzunluğunun, diyet içeriğindeki protein çeşidinden bağımsız olduğunu ve diyetin yeterli miktarda protein içerdiği sürece sıçanların boy uzunluğu bakımından gelişimini etkilemeyeceğini ileri sürmüşlerdir. Bizim çalışmamızda ise benzer şekilde diyet ile alınan gluten miktarının, sıçanların boy uzunluğu üzerine ayırt edici bir etkisi olmamıştır. Sıçanların ağırlık artışı bakımından ise Alippi ve meslektaşlarının bulgularının aksine, gluten ile beslenme herhangi bir değişim oluşturmamıştır. Bu farklı sonuçların olası nedeni, üç diyet içeriğinde de süt tozu (kazein) bulunması olabilir. En yüksek glutensiz diyetle (15,5gr/100gr yem) olmak üzere, kontrol diyetinde (9gr/100gr yem) ve yüksek glutenli diyetle (2,3gr/100gr yem) süt tozu bulunmaktadır. Diyetlerinden gluten proteini çıkarılan sıçanların günlük alması gereken protein ihtiyaçları, üretici firma (Arden Yem®) tarafından yemlerine süt tozu/kazein proteini eklenerek desteklenmiştir. Yemlerin içeriğinde bulunan kazein proteininin, glutenin vücut ağırlığı üzerine olası etkisini engellemiş olabileceği düşünülmüştür. Bununla birlikte çalışmamızda yüksek gluten ile beslenmenin beden kitle indeksleri (BKİ) üzerine anlamlı olarak artırıcı etkisi olduğu belirlenmiştir. Gelecekte, diyetteki protein kaynaklarına göre karşılaştırmalı olarak yapılacak metabolik çalışmalar, kazeinin etki mekanizmasının anlaşılmasına katkıda bulunabilir.

BKİ, yetişkin insanların vücut yağ oranlarını dolaylı yoldan belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. BKİ skorlaması sonucu kişilerin sahip olduğu yağ oralarına

göre belirli kategorilerde değerlendirilirler. Yaygın kullanımı, vücut yağ yüzdesini belirlemek olsa da BKİ skorlamasının insanlarda yağ yüzdesini tespit etmekte oldukça zayıf bir yöntem olduğu öne sürülmektedir (53). Ancak 2007 yılında yayınlanan bir çalışmada, sıçanlarda obezite belirtici olarak kullanılabilecek göstergeler araştırılmıştır. Erkek Wistar ırkı sıçan kullanılarak gerçekleştirilen deneylerde, BKİ değerleri ile hayvanların sahip olduğu karkas yağ arasında pozitif korelasyon olduğu ve BKİ hesaplamasının, sıçanlarda vücut yağını tahmin etmede basit ve güvenilir bir ölçüm olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca aynı çalışma kapsamında Wistar ırkı erkek sıçanlara ait BKİ değer aralığının 0,45-0,68 gr/cm² olduğu bildirilmiştir (36). Çalışmamızdaki yem grupları arasında BKİ değerleri karşılaştırıldığında glutensiz beslenen grubunun BKİ değerleri yüksek glutenli beslenen gruba göre anlamlı şekilde düşüktü. Gruplar karşılaştırıldığında BKİ değeri en yüksek olan yüksek gluten grubu (0,727±0,04 gr/cm²) olurken, kontrol grubu (0,665±0,03 gr/cm²) ve glutensiz grubun (0,636±0,05 gr/cm²) BKİ değerlerinin birbirine yakın olduğu gözlemlendi. 2013 yılında yayınlanan bir araştırmada glutensiz diyet ve vücut yağlanması arasındaki ilişki incelenmiştir. Araştırmada iki aylık C57BL/6 fareleri iki gruba ayrılmış ve bir grup yüksek yağ ve %4,5 buğday gluteni içeren yem ile beslenirken diğer grup yüksek yağ içeren ancak gluten içermeyen yemle beslenmiştir. Sekiz hafta sonunda toplam yağlanma miktarları karşılaştırıldığında, iki grubunda yem ile toplam enerji alımı aynı olsa da glutensiz grubun yağlanma miktarının diğer gruba göre düşük olduğu gözlemlenmiştir (54). Ayrıca, buğday gluteni tüketimi ve vücut yağlanması arasındaki ilişkiyi incelen başka bir araştırmada, standart diyet ve %4,5 buğday gluteni içeren standart diyet ile sekiz hafta beslenen C57BL/6 farelerin yağlanmaları karşılaştırıldığında, yem ile alınan toplam enerjiler aynı olmasına rağmen glutenli yem tüketen hayvanların iç organ yağlanması ve derialtı yağlanmasının kontrol grubuna göre anlamlı şekilde fazla olduğu tespit edilmiştir (55). Birbirini tamamlayan bu iki araştırma sonuçlarından yola çıkarak, çalışmamızdaki yüksek glutenli grubun BKİ değerinin, glutensiz beslenen gruba göre yüksek çıkması, gluten tüketimi ile vücut yağlanması arasındaki olası ilişki ile paralellik göstermektedir. Glutensiz beslenen grubun BKİ skorunun üç yem grubu arasında en düşük değerde olması, günümüzde oldukça gündemde olan glutensiz beslenmenin kilo-boy oranının korunması ve yağlanma açısından ileri sürülen olumlu etkilerini desteklemektedir.

Çalışmamızda, BKİ skorlamasının yanı sıra Lee İndeks skorlaması da yapıldı. Lee indeks skorlaması 1929 yılında Lee tarafından tanımlanmış ve sıçanlarda, insandaki BKİ skorlamasına benzer şekilde, obezite değerlendirmesinde kullanılabilecek bir gösterge olduğu ileri sürülmüştür (37). Ancak konu ile ilgili yayınlanan çalışmalara bakıldığında, Lee İndeksinin, sıçanlarda yüzde vücut yağı hesaplanmasında, dolayısıyla sıçanlarda obezitenin tespitinde, kullanılabilecek güvenilir bir ölçüm yolu olup olmadığı konusunda kesin bir karara varılamadığı görülmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda Lee İndeksi ile sıçanların vücut yağ yüzdeleri arasında önemli korelasyonlar gösterilmiştir (56)(57). Ancak bazı çalışmalarda ise, sıçanların vücut yağı yüzdelerinde istatistiksel bir fark olmasına rağmen Lee İndeks değerlerinde herhangi bir farklılık tespit edilemediği, bu nedenle Lee İndeks hesaplamasının sıçanlarda obezite değerlendirilmesinde kullanılamayacağı öne sürülmüştür (58). Çalışmamızdan elde edilen Lee indeks verileri incelendiğinde, değeri en yüksek olan grubun yüksek gluten grubu ($306,02 \pm 9,70$) olduğu, kontrol grubu ($297,84 \pm 11,41$) ve glutensiz grubun ($291,14 \pm 8,21$) değerlerinin birbirine oldukça yakın olduğu gözlemlendi. Yüksek gluten grubu en yüksek Lee İndeks değerine sahip olmasına rağmen bu fark, diğer iki gruba göre istatistiksel olarak anlamlı değildi. Gruplar arası BKİ değerleri karşılaştırmasında elde edilen istatistiksel anlamlılık, Lee İndeks değerleri arasında bulunamadı. BKİ skorlamasının genel olarak Lee İndeks değerlendirmesine göre daha duyarlı bir değerlendirme yöntemi olduğu düşünüldü.

Yem grupları arasında bütün beyin ağırlıkları karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel bir fark bulunmadı; üç grubun bütün beyin ağırlıkları birbirine oldukça yakındı. Piao ve meslektaşlarının Sprague-Dawley ırkı erkek sıçanlarla yaptığı bir araştırmada, yaklaşık 19 haftalık erkek sıçanların beyin ağırlığının 2 gr civarında olduğu belirtilmiştir (59). Çalışmamızda kullanılan sıçanlar da yaklaşık aynı yaşta sakrifiye edildi. Yem ile alınan farklı miktarlardaki glutenin bütün beyin ağırlığı üzerinde bir etkisi gözlemlenmedi. Ayrıca sıçanların serebellum ağırlıkları gruplar arasında karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel bir fark bulunmadı. Yem ile alınan farklı miktarlardaki glutenin serebellum ağırlığı üzerine bir etkisi olmadığı belirlendi.

Farklı miktarlarda glutenle beslenmenin sıçanlarda lokomotor fonksiyon ve anksiyete üzerine etkisini incelemek için hayvanlara açık alan testi uygulanmıştır. Sıçanlarda lokomotor aktivite, açık alan içinde aldığı toplam yol, toplam hareket süresi gibi verilerdeki değişimler üzerinden değerlendirilir. Kas/lokomotor fonksiyonlarında azalma olan hayvanların genelde daha az hareket etmesi, dolayısıyla daha az mesafe kat etmesi beklenir (60). Anksiyete değerlendirilmesi ise yine lokomotor aktivitedeki gibi, toplam hareket süresi, toplam alınan yol verilerindeki değişimin yanı sıra merkez/perifer alanda bulunma süresindeki değişimler üzerinden yapılır. Yeni bir ortama girdiklerinde kemirgenlerin, daha az hareket etme ve açık alanlarda daha az bulunma eğiliminde oldukları gösterilmiştir (40)(61). Çalışmamızdaki yem gruplarının toplam alınan yol verilerini incelediğimizde, en çok mesafe kat eden grubun yüksek glutenli ($1034,92 \pm 163,30$ cm) grup olduğu, onu sırasıyla glutensiz ($965,57 \pm 99,62$ cm) ve kontrol ($800,44 \pm 83,36$ cm) grubunun takip ettiği görüldü. Ancak gruplar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir fark tespit edilmedi. Dolayısıyla, çalışmamızdaki hayvanların, farklı oranlarda gluten tüketimine bağlı olarak lokomotor aktivitelerinde anlamlı bir değişim olmadığı düşünüldü. Ayrıca merkezde/periferde bulunma verileri anksiyete bakımından değerlendirildiğinde, kontrol grubunun merkezde en çok bulunan grup ve yüksek glutenli grubun yem grupları arasında açık alanda en az bulunan grup olduğu belirlendi. Ancak gruplar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir fark tespit edilmedi. Farklı miktarlarda glutenle beslenmenin, sıçanlarda anksiyete benzeri davranış farkına neden olmadığı düşünüldü. Her bir hayvanın merkez ve perifer alanda geçirdiği süreler grup içi birbiriyle karşılaştırıldığında, tüm yem grubundaki hayvanların perifer alanda geçirdiği sürenin, merkez alanda geçirdikleri süreden oldukça fazla olduğu gözlemlendi. Bu durum, yukarıda bahsedildiği gibi, kemirgenlerin yeni bir alana girdiklerinde gösterdikleri doğal bir davranış olan açık ve yabancı alandaki olası “tehlikelerden” kaçınma davranışı ile paralellik göstermektedir (61). Sonuç olarak, çalışmamızda farklı miktarlarda gluten ile beslenen sıçanların literatürdeki gibi benzer kaçınma davranışı gösterdiği, lokomotor fonksiyonlarında ve anksiyete benzeri davranışlarında anlamlı bir fark olmadığı belirlendi. Ortalamalarda gözlemlenen farkın istatistiksel olarak tespit edilememesi, denek sayısının az olmasından kaynaklanmış

olabilir. Gelecekte, denek sayısı artırılarak yapılacak benzer çalışmalarda, glutenin etkisi konusunda daha kesin sonuçlar elde edilebilir.

Mekânsal öğrenmenin değerlendirildiği Morris su tankı testinde, ilk dört gün eğitim, eğitimleri takip eden gün test günü olmak üzere toplam beş gün boyunca sıçanlar yüzdürüldü. Eğitim günlerinde hedef kadranda içine bir platform yerleştirildi. 1. ve 4. eğitim günündeki platformu bulma süreleri (PB) günler arasında karşılaştırıldığında, son gün tüm hayvanların platformu daha kısa sürede bulduğu görülmektedir. Yine benzer şekilde, platforma giden toplam yol değerleri, ilk güne kıyasla, son eğitim gününde düşmüş, hedef kadranda geçirilen süreler yüzde olarak tüm gruplarda artmıştır. İstatiksel olarak ilk gün-son gün karşılaştırması yapıldığında, bu iki gün arasında anlamlı fark olduğu belirlendi. İlk ve son günün PB verileri, yem grupları arasında karşılaştırıldığında ise, bu iki günde yem grupları arasında PB değerleri bakımından fark olmadığı görüldü. Sonuç olarak, dört günlük eğitim yüzdürmelerinin sonunda tüm hayvanların mekânsal ipuçlarını kullanarak platformun yerini öğrendiği gösterildi.

Eğitim günlerinden elde edilen PB değerleri birbirini takip eden günler arasında karşılaştırıldığında, tüm gruplarda 1.gün ve 2. gün arasında hızlı bir düşüş olduğu görülmektedir. 1. ve 2. günlerden elde edilen PB değerleri istatiksel olarak karşılaştırıldığında, tüm yem gruplarında bu iki gün arasında anlamlı fark olduğu belirlendi. 2. ve 3. günler arasında PB değerlerindeki değişim incelendiğinde, kontrol ve glutensiz yem gruplarında düşme devam ederken, yüksek glutenli grubunun PB değerinin neredeyse sabit kaldığı gözlemlendi. Ancak 1. ve 3. günler karşılaştırıldığında, ilk üç gün boyunca hayvanların, yem grubu fark etmeksizin, platforma daha kısa sürelerde ulaştığı, yani platformun yerini tespit etmede daha başarılı olduğu açık bir şekilde görülmektedir. Platforma giden toplam yol ve hedef kadranda geçirilen sürelerin yüzde verileri incelendiğinde de benzer sonuçlar gözlemlendi (Şekil 18, Şekil 19). İlk üç gün içindeki yüzdürmeler boyunca platforma giden toplam yol, tüm gruplarda düşmüş ve hedef kadranda geçirilen süre yüzdeleri günden güne artmıştır.

Son eğitim günü olan 4. gün ile 3. güne ait PB değerleri karşılaştırıldığında, glutensiz grubun PB değerinin, ilk üç gündeki gibi son eğitim gününde de istikrarlı şekilde düşüş göstermesi dikkat çekmektedir. Glutensiz grubun platformun yerini tespit etmedeki performansı gün geçtikçe artmıştır. Son eğitim gününde, kontrol grubunun PB değerlerinde bir gerileme olduğu, yüksek glutenli grubunun PB değerinin ise bir önceki günle aynı olduğu görülmektedir. Son gün, kontrol ve yüksek glutenli gruplarında görülen bu sabitleşme ve gerilemenin nedeni, eğitim günlerinin sayısı ile ilgili olabilir. Barnhart ve meslektaşlarının 2015 yılında yayınladığı bir araştırmada, Morris su tankı testinde eğitim günlerinin artırılması, hedef kadranda geçirilen sürelerinde azalmaya neden olmuştur. Son gün elde edilen hedef kadranda geçirilen süre, bir önceki günden elde edilene göre kısalmış, yani hayvanların hedefe ulaşma performansları düşmüştür (62). Farklı araştırmacılar tarafından da Wistar türü sıçanlarda iki ya da üç günlük eğitimin, platformun yerini öğrenmeleri için yeterli olabileceği ve su tankı çapının performans üzerinde etkili olabileceği ileri sürülmüştür(63)(44). Çalışmamızda, kontrol ve yüksek gluten grubunun 4. eğitim gününde bir önceki güne kıyasla, platformu bulma sürelerinin daha fazla ve hedef kadranda bulunma sürelerinin daha az olması, 2-3 günlük eğitimin öğrenme için yeterli olduğunu düşündürmüştür (Şekil 17, Şekil 19). Platformun yerini öğrendikten sonra alışma (*habituation*) nedeniyle Morris su tankı testinin, sıçanlarda öğrenme performansını ölçme gücü azalmış olabilir. Diğer taraftan, glutensiz beslenen sıçanlarda platformu bulma sürelerinin eğitim günlerinin sonuna kadar istikrarlı bir şekilde kısılması ilginçtir.

Morris su tankı testinin 5. gününde, hedef kadranda bulunan platform çıkarıldı ve 60 sn boyunca hayvanlar yüzdürüldü. Sıçanlara ait ortalama hız değerleri gruplara göre karşılaştırıldığında, glutensiz ve yüksek glutenli grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edildi. Hızdaki bu fark, diğer değişkenlerin sonucunu etkileyebileceği için (64), hıza bağlı istatistiksel bir düzeltme uygulanarak ortalama hız 18,20 cm/sn olarak hesaplandığında platformu bulma (PB) sürelerinde anlamlı farklı olduğu; glutensiz grubun, yüksek glutenli gruba göre platform alanına daha önce ulaştığı görüldü. Sıçanların ortalama hızı 18,20 cm/sn olarak kabul edildiğinde, yüksek glutenli grup, ortalama 27 saniye sonra platform alanına ulaşırken, glutensiz grup suya bırakıldıktan ortalama 4 saniye sonra platform alanına girmiştir.

Düzeltilmiş hedef kadranı bulma süreleri (HKB) bu iki grup arasında karşılaştırıldığında, sürelerin birbirine benzer olduğu gözlemlendi. Du ve meslektaşlarının 2018 yılında yayınladıkları bir araştırmada, besinlerdeki protein kaynağının öğrenme ve bellek üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, Sprague-Dawley ırkı erkek sıçanlar, standart yemin yanı sıra protein kaynağı olarak yumurta beyazı ve buğday gluteni içeren özel yemlerle beslenmiş. Besleme sonrasında uygulanan öğrenme-bellek testinde, glutenli beslenen sıçanların, standart ve yumurta beyazı içeren yem ile beslenen sıçanlara göre daha kötü performans gösterdiği belirlenmiştir (65). Bu durumun, besin ile alınan proteinlerin sindirildikten sonra dolaşıma karışması sonucu, hücre içi sinyal yollarındaki olası değişikliklerden kaynaklandığı düşünülmüştür. Ayrıca yüksek gluten ile beslenen sıçanların platformun yerini bulma performansının glutensiz beslenenlere göre daha düşük olması, gluten hassasiyetine sahip kişilerde de görülen beyin sisi durumu ile ilgili olabilir. Çölyak olmayan gluten hassasiyeti (NCGS) ya da kısaca gluten hassasiyeti, bazı kişilerde dikkat, karar verme ya da bellek gibi bilişsel işlevlerde yavaşlama olarak tanımlanan bir duruma neden olabilir. Beyin sisi olarak adlandırılan bu durum, hemen göze çarpmaz ve geçici özelliktedir. Ancak tespit edilmesinin zor olması ve kaynaklandığı olası mekanizmaların, özellikle NCGS hastalarında, henüz net olarak tanımlanamaması nedeniyle bu konu hakkında çalışmalar devam etmektedir (7)(66). Glutensiz diyetin beyin sisi üzerine etkisinin araştırıldığı, Lichtwark ve meslektaşları tarafından 2014 yılında yayınlanan boylamsal pilot çalışmada, bir senelik sıkı bir glutensiz diyet programı uygulayan kişilerin, dikkat, motor fonksiyonlar ve sözel akıcılık gibi bilişsel işlevlerinde ve barsak mukozasında eskiye göre bir “iyileşme” olduğu ileri sürülmüştür (34). Ayrıca 2016 yılında yayınlanan çift kör, plasebo kontrollü çapraz çalışmada, glutensiz ve glutenli diyet uygulanan kişilerin beslenme öncesi ve sonrası Hafif Bilişsel Bozukluk testi (SCIT) sonuçları karşılaştırıldığında, gluten tüketiminin SCIT yanıt sürelerinde bir yavaşlamaya neden olabileceği tespit edilmiştir (35). Bizim çalışmamızda da glutensiz grubun platformun yerini hatırlama gibi bilişsel bir işlemi gerçekleştirmede yüksek glutenli gruptan daha iyi performans göstermesi, yukarıda bahsedilen beyin sisi durumundan kaynaklanmış olabilir. Gluten hassasiyetinin kesin tespitini sağlamak amacıyla yapılan çalışmalarda, gluten hassasiyetine sahip kişilerin barsak geçirgenliğinin, gluten tüketimi ile birlikte arttığı

ortaya konulmuştur (67)(68). Gelecekteki çalışmalarda, kişilerde gözlemlenen beyin sisi durumu, barsak geçirgenliğindeki değişimler ve bu değişimlerin mikrobiyota üzerindeki etkileri yönünden araştırılarak beyin sisinin olası oluşum mekanizmaları ortaya konulabilir.

Diğer taraftan, glutensiz beslenen sıçanların Mg^{+2} düzeyleri, NMDA reseptörlerinin uyarılmasını etkilemiş ve hipereksitabilite durumu ortaya çıkmış olabilir. Bilindiği üzere NMDA reseptörlerinde kanal blokeri olarak görev yapan Mg^{+2} , NMDA reseptör hiperaktivitesini önler ve nöron içine giren Ca^{+2} akışını dengeler (69). Sıçanların ortalama hızları eşitlendiğinde, glutensiz grubun platformu daha kısa sürede bulması, Mg^{+2} eksikliğinde NMDA reseptörlerinin aşırı duyarlı hâle gelmesi sonucu orta çıkmış olabilir. Ancak çalışmamızda Mg^{+2} düzey ölçümü yapılamamıştır.

Sıçanların toplam aldığı yol verileri karşılaştırıldığında, yüksek glutenli ve glutensiz gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlendi; yüksek glutenli grup glutensiz gruba göre daha fazla yol almıştır. Benzer bir şekilde toplam hareket edilen süreler (THS) gruplar arasında karşılaştırıldığında, yüksek glutenli grubun tüm gruplar arasında en çok süre hareket eden grup olduğu görülmektedir. Yüksek glutenli grubun toplam hareket süresi diğer gruplara göre istatistiksel olarak daha fazla olmasına rağmen video kayıtları tek tek incelendiğinde yüksek glutenle beslenen sıçanların bu performansının, platformu bulmaya yönelik olmadığı görüldü. Glutensiz gruptaki çoğu hayvanın ise suya bırakıldığı anda platformun bulunduğu alana yöneldiği gözlemlendi. Bu durum, yüksek gluten ile beslenen sıçanların, anksiyete artışına bağlı olarak glutensiz yem ile beslenenlere göre daha hareketli olabileceğini düşündürmekle beraber, bu konuda gluten ve anksiyete benzeri davranış kalıplarının daha detaylı inceleneceği ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Merkezi sinir sistemindeki uyarıcı glutamat reseptörlerinden olan NMDA reseptörleri, sinaptik plastisiteden ve bellek işlevlerinden sorumlu reseptörlerdir. Beyindeki, özellikle hipokampus ve kortekste, sinaptik plastisitenin kapasitesi, NMDA reseptörlerinin alt türü olan NR2 alt birimlerinin kompozisyonu ile ilgilidir(8). Mekânsal öğrenme için gerekli olan bilgi, hipokampüste toplanır ve gerekli olduğunda buradan geri çağrılır. Ayrıca hipokampus, mekânsal belleğin sağlamlaştırıldığı ve

depolandığı yerdir (70). Son zamanlarda hipokampüste bulunan NMDA reseptör NR2 alt birimlerinin, LTP ve LTD gibi sinaptik plastisite modellerinde önemli bir yeri olduğu düşünülmektedir (8)(30). Çalışmamızda, sıçan beyinlerinde NMDA reseptör 2 (NR2) düzeyleri, yem grupları arasında karşılaştırıldı. Gruplar arasında, NR2 düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenemedi. Bunun nedeni, olası NR2 ekspresyon değişimlerinin, bu reseptörlerin en yoğun olduğu beyin bölgesi olan hipokampus bölgesi özelinde ölçülememesi olabilir. Hipokampal reseptör ekspresyonlarının değerlendirilmesi, reseptör düzey değişimleri hakkında daha açıklayıcı veriler elde etmemizi sağlayabilir. Gelecekteki çalışmalarda, hipokampus bölgesindeki reseptör düzeyleri ölçülerek farklı miktarlarda glutenle beslenmenin NMDA reseptör 2 ekspresyonuna etkisi ortaya konulabilir. Ayrıca beyin dokusu hipokampal nöron sayısı ve NMDA reseptör ekspresyonunu gösterebilecek histopatolojik incelemenin yapılması planlanmış, beyin dokusu kesitleri alınarak deneylere başlanılmıştır ancak süre kısıtlaması nedeni ile sonuçlar bu tez çalışmasında sunulamamıştır.

Çalışmamızda, NMDA reseptör 2 düzeyleri ve açık alan testi değişkenleri arasındaki korelasyonlara da bakıldı. NMDA reseptör 2 düzeyi ve açık alan testi merkez alanda geçirilen süre yüzdeleri arasında negatif yönde güçlü bir korelasyon olduğu görüldü ($r=-0,713$, $p=0,004$). Öğrenme reseptörü olarak bilinen NMDA reseptörü ile anksiyete arasında tespit edilen bu korelasyon oldukça ilgi uyandıran bir veri olabilir. Kavrama, anlama, değerlendirme, bellek gibi yetenekleri kapsayan bilişsel işlevler ile korku, anksiyete veya depresyon arasındaki ilişkiyi NMDA reseptörü üzerinden araştıran çalışmalar bulunmaktadır (71)(72)(73). Bu çalışmalarda, birçok NMDA reseptör antagonistinin, kemirgenlerde anksiyolitik etki yarattığı ve sosyal etkileşimi arttığı gösterilmiştir. Ayrıca, NMDA reseptörünün bazı alt birimlerine sahip olmayan *knock-out* fareler ile yapılan araştırmalarda, yine benzer sonuçlar elde edilmiştir. Barkus ve meslektaşları, hipokampal bölgede, özellikle dentat girusta bulunan granüler hücrelerde, NMDA reseptör NR1 alt birimi olmayan *knock-out* farelerin, aynı zamanda doğan ve genetik olarak normal olan farelere göre daha az anksiyete gösterdikleri görülmüştür (74). Aynı ekibin yaptığı başka bir çalışmada, hipokampal granüler ve piramidal hücrelerde, NMDA reseptör NR2B açısından *knock-out* farelerin, genetik açıdan normal olan farelere göre daha az anksiyete benzeri

davranış gösterdiği ortaya konulmuştur (75). Açık alan testinde merkez alandan kaçınma davranışı, sıçanlarda anksiyete benzeri davranışlardan biri olarak tanımlanır (76). Çalışmamızda, NMDA reseptör düzeyleri arttıkça, sıçanların perifer alanda geçirdikleri süreler artmıştır. Çalışmamızdaki sıçanların merkez alandan kaçınma davranışı göstermesi yukarıda belirtildiği gibi bir anksiyete göstergesi olabilir. Günümüzde anksiyete tedavisi için kullanılan farmakolojik tedavilerin yanı sıra yeni tedavi seçenekleri de araştırılmaktadır. Potansiyel tedavi yöntemlerinden biri olarak, glutamat sistemini değiştiren ilaçlar üzerine çalışmalar yapılmaktadır (77). NMDA reseptör düzeyleri ve anksiyete arasındaki olası ilişkinin daha kapsamlı araştırılması, anksiyete tedavisi için önemli veriler sunabilir.

Buğday glüteninde bulunan gliadin proteinine ve gliadin proteinini parçalayan doku transglutaminaz enzimine karşı oluşabilecek IgG antikor yanıtına bakılmıştır. Tüm yem gruplarındaki sıçanların anti-gliadin IgG ve anti-doku transglutaminaz IgG sonuçları, kitin belirttiği *cut-off* sınırlarında kalmıştır. Herhangi bir gluten duyarlılığı olmayan ve infantil dönemden genç yetişkin oldukları döneme kadar beslenen sıçanlarda, yem içeriğinde bulunan glutene karşı IgG antikor yanıtı gerçekleşmemiştir. Çölyak hastalığı için, gliadin ve doku transglutaminaza karşı oluşmuş IgG ve IgA antikorlarının varlığı, hastalığın tanısında en sık kullanılan serolojik belirteçlerdir (78). Glutene bağlı gelişen hastalıklardan biri olan gluten hassasiyeti ya da diğer adıyla çölyak olmayan gluten duyarlılığında (NCGS) ise, serolojik biyobelirteç belirleme çalışmaları hâlâ devam etmektedir. Ancak NCGS tanısında kullanılabilecek güvenilir ve özelleşmiş bir biyobelirteç henüz bulunamamıştır (19). Volta ve meslektaşlarının 2012 yılında yayınladığı bir çalışmada, NCGS'ye sahip kişilerin ancak %56,4'ünde anti-gliadin IgG antikor ve %7,7'sinde anti-gliadin IgA antikor tespit edilirken, hiçbir hastada anti-doku transglutaminaz IgA antikor tespit edilememiştir (79). Gluten duyarlılığının serolojik olarak kesin tespiti için çalışmalar devam etmektedir. İnsanda yapılan gluten duyarlılığı çalışmalarındaki gibi bizim çalışmamızda da, sıçanlarda gliadine ve doku transglutaminaza karşı bir antikor yanıt tespit edilememesi, söz konusu antikor testlerinin tanısız sensitivite ve spesifitesinin yetersizliğinden kaynaklanmış olabilir. Diğer taraftan, yem içeriğinde bulunan gluten, sıçanlarda barsak mikrobiyal içeriğinin değişimi ve/veya inflamatuvar yanıtın tetiklenmesi gibi farklı mekanizmalar üzerinden etki göstermiş olabilir.

Gliadin ve gliadini parçalayan bir enzim olan doku transglutaminaza karşı oluşan antikor yanıtın yanı sıra NMDA reseptörüne karşı oluşan antikor yanıt da değerlendirilmiştir. Sıçanların anti-NMDA reseptör IgG sonuçları kitin sağladığı pozitif ve negatif kontrol ile karşılaştırılmış ve tüm yem gruplarındaki hayvanların NMDA reseptör IgG bakımından anlamlı bir antikor yüksekliğine sahip olmadığı belirlenmiştir. Çalışmamızda, gliadine karşı da bir antikor yanıt oluşmadığı için, anti-gliadin antikorları ile NMDA reseptör düzeyi veya NMDA reseptörüne karşı oluşan antikor düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirilememiştir. Çalışmamızda, gliadin ve NMDA reseptör antijenik yapısı arasında bir çapraz reaksiyon olup olmadığının değerlendirilmesi mümkün olamamıştır.

Sıçanlara ait glukoz, total protein, albumin ve globulin düzeyleri değerlendirildi. Grupların glukoz değerleri karşılaştırıldığında, yüksek glutenle beslenen grubun değerlerinin diğer gruplardan anlamlı olarak yüksek olduğu görüldü. Bu durum, glisemik indeks değeri daha yüksek olan glutenli diyet için beklenen bir durum olabilir. Ayrıca gruplar arası total protein ve globulin değerleri bakımında anlamlı bir fark olduğu belirlendi. Yüksek glutenli grubun total protein değeri, hem glutensiz gruba hem de kontrol grubuna göre daha yüksekti. Globulin değerlerinin ise yine yüksek glutenli grupta glutensiz gruba göre daha yüksek olduğu gözlemlendi. Karaciğerde sentezlenen ana plazma proteini olan albuminde ise gruplar arasında bir fark gözlenemedi. Albumin düzeylerinin değişmemesi, diyet gruplarında karaciğerin protein sentez fonksiyonunda bir sorun olmadığını düşündürdü. Alfa 2 makroglobulin düzeyleri karşılaştırıldığında ise, gruplar arasında anlamlı bir fark saptanamadı; ancak alfa 2 makroglobulin düzeyi, total protein düzeyine oranlandığında, glutensiz grubun en yüksek orana sahip olduğu belirlendi. Alfa 2 makroglobulin, yaralanma, enflamasyon, stres gibi durumunda artış ya da siroz gibi karaciğeri ilgilendiren dejeneratif hastalıklarda azalma gösteren ve sıçanda kuvvetli bir şekilde pozitif yanıt veren bir akut faz proteinidir (80). Yüksek glutenli grupta alfa 2 makroglobulin düzeyinin artmaması, glutenli beslenmenin gluten intoleransı olmayan sıçanlarda inflamatuvar yanıt üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığını düşündürebilir. Ayrıca 2020 yılında yayınlanan bir çalışmada, gluten bakımından zengin yemle beslenen sıçanların total protein değerlerinin, kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu; albumin değerlerinin ise kontrol ile benzer seviyede olduğu gözlemlenmiştir (81).

Diğer taraftan, serum albumin seviyelerinin düşük olması, alfa 2 makroglobulin seviyelerini etkileyebilir. Nefrotik sendromda büyük moleküler ağırlığa sahip olan alfa 2 makroglobulinin, diğer küçük moleküler ağırlıklı proteinler atılırken, dolaşımda tutulduğu ve plazma düzeyini göreceli olarak artırdığı Stevenson ve meslektaşlarının yaptığı çalışmalarla ortaya konulmuştur (82). Bizim çalışmamızda glutensiz beslenen grubun göreceli olarak artmış alfa 2 makroglobulin seviyeleri, Stevenson ve meslektaşlarının ileri sürdüğü şekilde kan albümin düzeyi azalması durumunda, alfa 2 makroglobulin proteinin post-transkripsiyonel mekanizmalarla artışının tetiklenmesine bağlı olabilir. Ayrıca önceki çalışmalardaki plazma alfa 2 makroglobulin düzeyleriyle karşılaştırıldığında, yaklaşık 50 ng/mL düzeyinde olan sonuçlarımız çok düşük bulunmuştur (83)(84). Bu durumda kitin analitik sensitivite ve spesifisitesinin daha detaylı çalışmalarla değerlendirilmesi ve sonuçların ona göre yorumlanması uygun olabilir.

Çölyak hastalığında ya da çölyak olmayan gluten duyarlılığında (NCGS), gluteni diyetten çıkardıktan sonra gastrointestinal sistem başta olmak üzere genel olarak glutenin tetiklediği semptomlarda gerileme olması beklenmektedir. Ancak gluten duyarlılığı olduğunu iddia eden kişilerle yapılan çift kör bir çalışmada, bu kişilerin büyük bir yüzdesinin, gluten tüketiminde ortaya çıkan belirtileri hissetmediği gösterilmiştir (85). Buna ek olarak gluten tüketmenin sağlıkları için zararlı olduğuna inanan bazı ebeveynlerin, çocukları için glutensiz diyetleri benimsedikleri görülmektedir. Mevcut literatür bulgularına göre glutensiz diyet ile beslenme genel olarak diyet içeriğindeki lif ve mineral kaybı ile vitamin eksikliklerine neden olabilir(86). Bununla birlikte, bir akut faz reaktanı olan ve karaciğerde sentezlenen alfa 2 makroglobulin düzeyleri yine glutensiz beslenen grupta daha yüksek bulunmuştur. Bu durum, glutensiz diyetle beslenme durumunda, eksik kalan protein ve karbonhidrat içeriğinin süt tozu gibi farklı kaynaklardan sağlanmasına bağlı olabilir. Özellikle glutensiz diyetin benimsenmesi şüpheli olduğu durumlarda, glutensiz diyetin potansiyel zararını en aza indirmek için bir beslenme danışmanlığı alınması ve kan mineral düzeyinin takibinin yapılması uygun olacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak bu tez çalışması ile literatür taramamıza göre ilk kez infantil dönemden itibaren uzun dönem farklı düzeylerde gluten içeren diyet ile beslenmenin fiziksel gelişim, bilişsel fonksiyonlar, NMDA reseptör düzeylerine etkileri kontrollü ortam şartlarında gösterilmiştir.

Çalışmamızın sonuçları aşağıda belirtildiği şekilde özetlenebilir:

- Infantil dönemden itibaren yüksek düzeyde glutenli veya glutensiz beslenmenin, gluten ile ilişkili immün yanıt ve NMDA reseptör IgG antikor yanıtına anlamlı bir etkisi bulunamadı.
- Yüksek gluten ile beslenme genel fiziksel gelişimi etkilemekte ve kan glukoz, total protein ve globulin düzeylerini değiştirmektedir. Ancak sinir sistemi gelişimi ve öğrenme, bellek gibi bilişsel fonksiyonlar üzerine anlamlı etkisi belirlenememiştir.
- Günlük diyetteki gluten düzey değişimleri, beyin dokusu NMDA reseptörü düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı şekilde değiştirmedir. Ancak sinir sistemi gelişimi ile ilişkili olabilecek anksiyete benzeri davranışın, beyin dokusu NMDA reseptör düzeyi ile ters yönde anlamlı bir ilişkisinin olduğu gösterilmiştir.

Bu tez çalışması ile yüksek düzeyde gluten içeren diyet ile uzun süreli beslenmenin, gluten ilişkili immün yanıtı değiştirmede, anksiyete, lokomotor aktivite ve beyin dokusu NMDA reseptör düzeylerinde anlamlı etki oluşturmadığı belirlendi. Yüksek glutenle beslenen sıçanların, Morris su tankı testinde hız, toplam alınan yol ve hareket sürelerinin daha fazla olmasına rağmen vücut kütle indeks değerlerinin glutensiz beslenen gruba göre daha yüksek olduğu bulundu. Öğrenme ve bellek fonksiyonlarının dört günlük eğitimin sonunda, gluten içeriğinden bağımsız olarak tüm diyet gruplarında benzer geliştiği gözlemlendi. Ancak eğitim sonunda uygulanan test gününde gruplara uygulanan hız düzeltmesinden sonra yüksek glutenli grubun platformu bulma süresinin, glutensiz gruba göre daha uzun olması, gluten tüketimine bağlı olarak ortaya çıkan hafıza, dikkat gibi bazı bilişsel işlevlerde hafif yavaşlama olarak ortaya çıkan beyin sisi durumundan kaynaklanabileceğini düşündürdü. Ancak çalışmamızda, gluten tüketimi sonucu oluşan anti-gliadin IgG ve anti-doku transglutaminaz IgG gibi antikorlar tespit edilememiştir.

Glutensiz beslenme koşullarında d-serin gibi agonistler ile NMDA reseptör uyarımının öğrenme ve bellek fonksiyonları üzerine etkilerinin değerlendirilmesi, toplumda giderek artan bir sosyo-ekonomik problem olan demansiyel hastalıkların önlenmesi için koruyucu tıp uygulamalarına önemli veriler sunabilir.

Çalışmamızda, gruplar arasında yem tüketimi sonucu kalori bakımından bir fark oluşturmamak için izokalorik yem kullanıldı. Dolayısıyla, yemlerin içeriğindeki toplam protein miktarı, süt tozu, soya küspesi gibi besin maddeleri eklenerek eşitlendi. Süt tozunun, özellikle glutensiz yemlerde, diğer yem gruplarına göre fazla olmasının, hayvanların gelişimi ya da kan değerleri üzerinde bir etkisi olabilir. Gelecekte yapılacak çalışmalarda, saf buğday gluteni veya gliadinin intragastrik gavaj yoluyla hayvanlara verilerek glutenin olası etkileri daha net bir şekilde ortaya konulabilir. Öğrenme fonksiyonlarının ölçüldüğü Morris su tankı testi, dört gün eğitim ve bir gün test olmak üzere toplam beş gün uygulandı. Test gününde bir hafta sonra tekrar uygulanacak ikinci bir test yüzdürmesi ile hayvanların, öğrendikleri bilgiyi hatırlama kapasiteleri ölçülebilir. Ayrıca öğrenme reseptörü olarak bilinen NMDA reseptörünün, hipokampal alandaki ekspresyonu, çalışmamıza önemli bir katkı sağlayabilirdi. Planlarımız arasında, hipokampal bölge nöron sayısı ve beyin dokusu NMDA reseptör ekspresyonlarının histopatolojik olarak gösterilmesi olsa da zaman kısıtlaması nedeni ile sonuçlar sunulamadı.

7. KAYNAKLAR

1. Brietzke E, Cerqueira RO, Mansur RB, McIntyre RS. Gluten related illnesses and severe mental disorders: a comprehensive review. *Neurosci Biobehav Rev*. 2018;84(August 2017):368–75.
2. Sapone A, Bai JC, Ciacci C, Dolinsek J, Green PHR, Hadjivassiliou M, et al. Spectrum of gluten-related disorders: Consensus on new nomenclature and classification. *BMC Med*. 2012;10(1):13.
3. Hadjivassiliou M, Rao DG, Grinewald RA, Aeschlimann DP, Sarrigiannis PG, Hoggard N, et al. Neurological dysfunction in coeliac disease and non-coeliac gluten sensitivity. *Am J Gastroenterol*. 2016;111(4):561–7.
4. Watkins RD, Zawahir S. Celiac Disease and Nonceliac Gluten Sensitivity. Vol. 64, *Pediatric Clinics of North America*. W.B. Saunders; 2017. p. 563–76.
5. Catassi C, Bai JC, Bonaz B, Bouma G, Calabrò A, Carroccio A, et al. Non-celiac gluten sensitivity: The new frontier of gluten related disorders. Vol. 5, *Nutrients*. MDPI AG; 2013. p. 3839–53.
6. Makhoul S, Messelmani M, Zaouali J, Mrissa R. Cognitive impairment in celiac disease and non-celiac gluten sensitivity: review of literature on the main cognitive impairments, the imaging and the effect of gluten free diet. *Acta Neurol Belg*. 2018;118(1):21–7.
7. Yelland GW. Gluten-induced cognitive impairment (“brain fog”) in coeliac disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2017;32:90–3.
8. Li F, Tsien JZ. Memory and the NMDA Receptors. *N Engl J Med*. 2009 Jul 16;361(3):302–3.
9. Arumugham V, Trushin M V. Role of NMDA receptor autoimmunity induced by food protein containing vaccines, in the etiology of autism, type 1 diabetes, neuropsychiatric and neurodegenerative disorders. *Int J Pharm Res*. 2019;11(1):428–37.
10. Shewry PR, Hey SJ. Do we need to worry about eating wheat? *Nutr Bull*. 2016;41(1):6–13.
11. Slavin JL, Jacobs D, Marquart L. Grain processing and nutrition. Vol. 21, *Critical Reviews in Biotechnology*. CRC Press LLC; 2001. p. 49–66.
12. Tapia-Hernández JA, Del-Toro-Sánchez CL, Cinco-Moroyoqui FJ, Juárez-Onofre JE, Ruiz-Cruz S, Carvajal-Millan E, et al. Prolamins from cereal by-products: Classification, extraction, characterization and its applications in micro- and nanofabrication. *Trends Food Sci Technol*. 2019;90(December 2018):111–32.
13. Schuppan D, Gisbert-Schuppan K. Wheat, Gluten and ATI: An Overview. In: *Wheat Syndromes: How Wheat, Gluten and ATI Cause Inflammation, IBS and Autoimmune Diseases*. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 5–10.

14. Biesiekierski JR. What is gluten? Vol. 32, Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia). 2017. p. 78–81.
15. Hausch F, Shan L, Santiago NA, Gray GM, Khosla C. Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 2002;283(4 46-4):996–1003.
16. Lammers KM, Herrera MG, Doderio VI. Translational Chemistry Meets Gluten-Related Disorders. *ChemistryOpen*. 2018;7(3):217–32.
17. Ashtari S, Pourhoseingholi MA, Rostami K, Aghdaei HA, Rostami-Nejad M, Busani L, et al. Prevalence of gluten-related disorders in Asia-pacific region: A systematic review. *J Gastrointest Liver Dis*. 2019;28(1):95–105.
18. Kaswala D, Veeraraghavan G, Kelly C, Leffler D. Celiac Disease: Diagnostic Standards and Dilemmas. *Diseases*. 2015;3(2):86–101.
19. Taraghikhah N, Ashtari S, Asri N, Shahbazkhani B, Al-Dulaimi D, Rostami-Nejad M, et al. An updated overview of spectrum of gluten-related disorders: Clinical and diagnostic aspects. Vol. 20, *BMC Gastroenterology*. 2020.
20. Cooper BT, Holmes GKT, Ferguson R, Thompson RA, Allan RN, Cooke WT. Gluten-sensitive diarrhea without evidence of celiac disease. *Gastroenterology*. 1980 Nov 1;79(5):801–6.
21. Rej A, Aziz I, Sanders DS. Coeliac disease and noncoeliac wheat or gluten sensitivity. Vol. 288, *Journal of Internal Medicine*. 2020. p. 537–49.
22. Öztürk R. Öğrenme Kuramları ve Öğretim İlkeleri [Internet]. İnönü Üniversitesi. 2009. [Erişim Tarihi 17 Nisan 2021]. Erişim adresi: <http://stu.inonu.edu.tr/~e040040002/ramazan-zulfiye.htm>
23. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia A-S, McNamara JO, et al., editors. *Neuroscience*, 3rd ed. Sunderland, MA, US: Sinauer Associates; 2004.
24. Yıldırım M. Temel Nöroanatomi. 2.Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri Tic.Ltd.Şti; 2014. 94–96 p.
25. Kandel, E. R., Schwartz, J. H., & Jessell TM. *Principles of Neural Science*. 5th ed. Eric R. Kandel, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ, editors. The McGraw-Hill Companies, Inc. New York: Health Professions Division; 2013. Chapter 67.
26. Lüscher C, Malenka RC. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(6):1–15.
27. Bugra Baltacı S, Mogulkoc R, Abdulkerim , Baltacı K. Molecular Mechanisms of Early and Late LTP. *Neurochem Res*. 2019;44:281–96.
28. Bannerman DM, Sprengel R, Sanderson DJ, Mchugh SB, Rawlins JNP, Monyer H, et al. Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. *Nat Rev Neurosci*. 2014;15(3):181–92.

29. Vyklíček V, Korinek M, Smejkalová T, Balík A, Krausová B, Kaniáková M, et al. Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiol Res*. 2014;63(SUPPL.).
30. Cull-candy SG. NMDA Receptors. In eLS, John Wiley & Sons, Ltd (Ed.). 2007.
31. Mothet JP, Le Bail M, Billard JM. Time and space profiling of NMDA receptor co-agonist functions. *J Neurochem*. 2015;135(2):210–25.
32. Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*. 1994;12(3):529–40.
33. Wee KS-L, Zhang Y, Khanna S, Low CM. Immunolocalization of NMDA receptor subunit NR3B in selected structures in the rat forebrain, cerebellum, and lumbar spinal cord. *J Comp Neurol*. 2008 Jul 1;509(1):118–35.
34. Lichtwark IT, Newnham ED, Robinson SR, Shepherd SJ, Hosking P, Gibson PR, et al. Cognitive impairment in coeliac disease improves on a gluten-free diet and correlates with histological and serological indices of disease severity. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014;40(2):160–70.
35. Peters SL, Yelland G, Moore J, Ward M, Majumdar A, Muir JG, et al. No effect of gluten on anxiety or depression in patients with NCGS, but could it be brain fog? *J Gastroenterol Hepatol*. 2016;31:175–6.
36. Novelli ELB, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GMX, Rodrigues HG, Mani F, et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim*. 2007;41(1):111–9.
37. Lee MO. Determination Of The Surface Area Of The White Rat With Its Application To The Expression Of Metabolic Results. *Am J Physiol Content*. 1929;89(1):24–33.
38. Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev*. 2010;23(2):270–99.
39. Hall C, L E. A study of the rat's behavior in a field. A contribution to method in comparative psychology. *Univ Calif Publ Psychol*. 1932;6:1–12.
40. Sestakova N, Puzserova A, Kluknavsky M, Bernatova I. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: Methodological aspects and role of nitric oxide. *Interdiscip Toxicol*. 2013;6(3):126–35.
41. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*. 1984;11(1):47–60.
42. Quillfeldt J a. Behavioral Methods to Study Learning and Memory in Rats. Most. 2006;
43. Hamilton DA, Barto D. Navigation in Virtual Space: Psychological and Neural Aspects. In: *International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences: Second Edition*. Elsevier Inc.; 2015. p. 348–55.
44. Vorhees C V, Williams MT. Morris water maze: Procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc*. 2006;1(2):848–58.

45. Sengupta P. The laboratory rat: Relating its age with human's. Vol. 4, International Journal of Preventive Medicine. Wolters Kluwer -- Medknow Publications; 2013. p. 624–30.
46. Marietta E V., Murray JA. Animal models to study gluten sensitivity. *Semin Immunopathol.* 2012 Jul;34(4):497–511.
47. Natividad JM, Huang X, Slack E, Jury J, Sanz Y, David C, et al. Host responses to intestinal microbial antigens in gluten-sensitive mice. *PLoS One.* 2009 Jul 31;4(7).
48. D'Arienzo R, Maurano F, Lavermicocca P, Ricca E, Rossi M. Modulation of the immune response by probiotic strains in a mouse model of gluten sensitivity. *Cytokine.* 2009 Dec;48(3):254–9.
49. National Research Council. Nutrient Requirements of the Laboratory Rat. In: Nutrient Requirements of Laboratory Animals. National Academies Press (US); 1995. p. 11–79.
50. Haupt-Jorgensen M, Holm LJ, Josefsen K, Buschard K. Possible prevention of diabetes with a gluten-free diet. Vol. 10, *Nutrients.* 2018. p. 1746.
51. Saturni L, Ferretti G, Bacchetti T. The gluten-free diet: Safety and nutritional quality. Vol. 2, *Nutrients.* MDPI AG; 2010. p. 16–34.
52. Alippi RM, Picasso E, Huygens P, Bozzini CE, Bozzini C. Growth-dependent effects of dietary protein concentration and quality on the biomechanical properties of the diaphyseal rat femur. *Endocrinol y Nutr.* 2012;59(1):35–43.
53. Nuttall FQ. Body mass index: Obesity, BMI, and health: A critical review. Vol. 50, *Nutrition Today.* Lippincott Williams and Wilkins; 2015. p. 117–28.
54. Soares FLP, de Oliveira Matoso R, Teixeira LG, Menezes Z, Pereira SS, Alves AC, et al. Gluten-free diet reduces adiposity, inflammation and insulin resistance associated with the induction of PPAR-alpha and PPAR-gamma expression. *J Nutr Biochem.* 2013;24(6):1105–11.
55. Freire RH, Fernandes LR, Silva RB, Coelho BSL, De Araújo LPT, Ribeiro LS, et al. Wheat gluten intake increases weight gain and adiposity associated with reduced thermogenesis and energy expenditure in an animal model of obesity. *Int J Obes.* 2016;40(3):479–86.
56. Rogers P, Webb GP. Estimation of body fat in normal and obese mice. *Br J Nutr.* 1980 Jan;43(1):83–6.
57. Simson EL, Gold RM. The lee obesity index vindicated? *Physiol Behav.* 1982;29(2):371–6.
58. Stephens DN. Does the Lee obesity index measure general obesity? *Physiol Behav.* 1980 Aug 1;25(2):313–5.
59. Piao Y, Liu Y, Xie X. Change trends of organ weight background data in Sprague Dawley rats at different ages. *J Toxicol Pathol.* 2013;26(1):29–34.
60. Tatem KS, Quinn JL, Phadke A, Yu Q, Gordish-Dressman H, Nagaraju K. Behavioral and locomotor measurements using an open field activity monitoring system for skeletal muscle diseases. *J Vis Exp.* 2014;(91):1–7.

61. Gould TD, Dao DT, Kovacsics CE. Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice. *Neuromethods*. 2009;42:1–20.
62. Barnhart CD, Yang D, Lein PJ. Using the Morris water maze to assess spatial learning and memory in weanling mice. *PLoS One*. 2015;10(4):1–16.
63. Blokland A, Geraerts E, Been M. A detailed analysis of rats' spatial memory in a probe trial of a Morris task. *Behav Brain Res*. 2004;154(1):71–5.
64. Babur, E , Tan, B , Yıldız, N , Batakçı, M , Süer, C , Dursun N. Hipotiroidili sıçanlarda uzamsal öğrenme performansında cinsiyet bağımlı farklılıklar. *Sağlık Bilim Derg*. 2017;26(3):233–9.
65. Du K, Markus E, Fecych M, Rhodes JS, Beverly JL. Satiety and memory enhancing effects of a high-protein meal depend on the source of protein. *Nutr Neurosci*. 2018;21(4):257–67.
66. Croall ID, Hoggard N, Aziz I, Hadjivassiliou M, Sanders DS. Brain fog and non-coeliac gluten sensitivity: Proof of concept brain MRI pilot study. *PLoS One*. 2020;15(8 august):1–11.
67. Hollon J, Puppa EL, Greenwald B, Goldberg E, Guerrerio A, Fasano A. Effect of gliadin on permeability of intestinal biopsy explants from celiac disease patients and patients with Non-Celiac gluten sensitivity. *Nutrients*. 2015 Feb 27;7(3):1565–76.
68. Uhde M, Ajamian M, Caio G, De Giorgio R, Indart A, Green PH, et al. Intestinal cell damage and systemic immune activation in individuals reporting sensitivity to wheat in the absence of coeliac disease. *Gut*. 2016 Dec 1;65(12):1930–7.
69. Pochwat B, Szewczyk B, Sowa-Kucma M, Siwek A, Doboszewska U, Piekoszewski W, et al. Antidepressant-like activity of magnesium in the chronic mild stress model in rats: Alterations in the NMDA receptor subunits. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2014 Mar;17(3):393–405.
70. D'Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. Vol. 36, *Brain Research Reviews*. 2001. 60–90 p.
71. Corbett R, Dunn RW. Effects of 5,7 dichlorokynurenic acid on conflict, social interaction and plus maze behaviors. *Neuropharmacology*. 1993;32(5):461–6.
72. Plaznik A, Palejko W, Nazar M, Jessa M. Effects of antagonists at the NMDA receptor complex in two models of anxiety. *Eur Neuropsychopharmacol*. 1994 Dec 1;4(4):503–12.
73. Engin E, Treit D, Dickson CT. Anxiolytic- and antidepressant-like properties of ketamine in behavioral and neurophysiological animal models. *Neuroscience*. 2009 Jun 30;161(2):359–69.
74. Barkus C, McHugh SB, Sprengel R, Seeburg PH, Rawlins JNP, Bannerman DM. Hippocampal NMDA receptors and anxiety: At the interface between cognition and emotion. *Eur J Pharmacol*. 2010;626(1):49–56.

75. von Engelhardt J, Doganci B, Jensen V, Hvalby Ø, Göngrich C, Taylor A, et al. Contribution of Hippocampal and Extra-Hippocampal NR2B-Containing NMDA Receptors to Performance on Spatial Learning Tasks. *Neuron*. 2008 Dec 10;60(5):846–60.
76. Lezak KR, Missig G, Carlezon WA. Behavioral methods to study anxiety in rodents. *Dialogues Clin Neurosci*. 2017;19(2):181–91.
77. Nasir M, Trujillo D, Levine J, Dwyer JB, Rupp ZW, Bloch MH. Glutamate Systems in DSM-5 Anxiety Disorders: Their Role and a Review of Glutamate and GABA Psychopharmacology. Vol. 11, *Frontiers in Psychiatry*. Frontiers Media S.A.; 2020. p. 548505.
78. Rubio-Tapia A, Hill ID, Kelly CP, Calderwood AH, Murray JA. ACG clinical guidelines: Diagnosis and management of celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2013 May;108(5):656–76.
79. Volta U, Tovoli F, Cicola R, Parisi C, Fabbri A, Piscaglia M, Fiorini E CG. Serological tests in gluten sensitivity (nonceliac gluten intolerance). *J Clin Gastroenterol*. 2012;46(8):680–5.
80. Brechner T, Hocke G, Goel A FG. Interleukin 6 response factor binds co-operatively at two adjacent sites in the promoter upstream region of the rat alpha 2-macroglobulin gene. *Mol Biol Med*. 1991;8(2):267–85.
81. Yahaya TO, Oladele EO, Salisu TF, Ayoola ZO, Ayodeji SO. Toxicological Evaluation of Selected Gluten-Rich Diets on Rats (*Rattus norvegicus*). *Niger J Pure Appl Sci*. 2020;(May):3547–58.
82. Stevenson FT, Greene S, Kaysen GA. Serum α 2-macroglobulin and α 1-inhibitor 3 concentrations are increased in hypoalbuminemia by post-transcriptional mechanisms. *Kidney Int*. 1998;53(1):67–75.
83. Ito R, Kuribayashi T. Correlation between synthesis of α 2-macroglobulin as acute phase protein and degree of hepatopathy in rats. *Lab Anim Res*. 2019;35(1):4–9.
84. Jinbo T, Sakamoto T, Yamamoto S. Serum α 2-macroglobulin and cytokine measurements in an acute inflammation model in rats. *Lab Anim*. 2002;36(2):153–7.
85. Zanini B, Baschè R, Ferraresi A, Ricci C, Lanzarotto F, Marullo M, et al. Randomised clinical study: Gluten challenge induces symptom recurrence in only a minority of patients who meet clinical criteria for non-coeliac gluten sensitivity. *Aliment Pharmacol Ther*. 2015 Oct 1;42(8):968–76.
86. Shepherd SJ, Gibson PR. Nutritional inadequacies of the gluten-free diet in both recently-diagnosed and long-term patients with coeliac disease. *J Hum Nutr Diet*. 2013 Aug;26(4):349–58.

8. EKLER

8.1 Yem İçerikleri

Kontrol (DIET-1) yemi:



ANKARA - ARDEN DENEY

DIET-1 RAT (SIĞAN) YEMİ

Kümes No :

Hayvan Cinsi :

Hammaddeler

M. Şahin Akdenizli

Hammade Adı	Miktar
MISIR 7.	380,40
SOYA FAŞÜLYESİ KÜSPESİ 46.	178,89
AYÇİÇEK KÜSPESİ 36	126,82
SUT TOZU 35	100,00
RAZMOL .	75,00
PEYNİRALTI TOZU 7	50,00
BUĞDAY 12	35,00
503 BAKON MF STARTER YK %2,5	25,00
BİTKİSEL HAMYAĞ	18,72
MERMER TOZU..CaCO3	9,17
TUZ (NaCl).	1,00
	1000,00

Analiz

Besin Maddesi	Değer	Besin Maddesi	Değer	Besin Maddesi	Değer
DRY MATTER	87,77	DIG.LEUCINE	1,81	ZINC (Zn)	59,50
PROTEIN	22,00	ISOLEUCINE	0,97	COPPER (Cu)	5,00
M.ENERGY Poultry (kcal)	2.900,00	DIG.ISOLEUCINE	0,88	IODINE (I)	0,62
SODIUM	0,18	VALINE	1,11	SELENIUM (Se)	0,20
CALCIUM	1,00	TRYPTOPHAN	0,32	COBALT(Co)	0,00
AV.PHOSPHORUS	0,51	DIG.TRYPTOPHAN	0,27	CANTHAXANTHIN %10 (K)	0,00
C. FAT	4,00	ELECTROLYTE	256,38	APO ESTER %10 (S)	0,00
C.FIBER	4,52	SUGAR	4,73	ANTIOXIDAN	105,00
C.ASH	5,04	STARCH	34,75	PHYTASE	1.000,00
LYSINE	1,40	VITAMIN-A	12.000,00	XYLANASE	1.000,00
DIG. LYSINE	1,24	VITAMIN-D3	2.400,00	GLUCANASE	250,00
METHIONINE	0,53	VITAMIN-E	20,00	MANNANASE	100,00
DIG. METHIONINE	0,48	VITAMIN-K3	3,00	PROTEASE	100,00
METH + CYS	0,93	VTAMIN-B1	1,00	ALPHA-AMYLASE	150,00
DIG. MET + CYS	0,82	VITAMIN-B2	6,00	LIPASE	100,00
LINOLEIC ACID	2,83	VITAMIN-B6	3,00	PECTINASE	80,00
T.PHOSPHORUS	0,63	VITAMIN-B12	0,02	TOXIN BINDER	3.500,00
POTASSIUM	1,05	NIACIN	30,00	ORGANIC ACID MIX	750,00
CHLORINE	0,20	CAL.PANT.ACID	8,00	BACILLUS CEREUS	0,00
ARGININE	1,66	FOLIC ACID	1,00	HERBAL EXTRACT	200,00
DIG. ARGININE	1,52	BIOTIN	0,05	SACC.CEREVISIAE (CELL	1.000,00
THREONINE	0,90	CHOLINE	300,00	DIG..PROTEIN	23,59
DIG.THREONINE	0,76	MANGANESE (Mn)	100,25	DIG..ENERGY	2.650,40
LEUCINE	1,76	IRON (Fe)	25,25	M.E. FORMULA	2.753,53

Glutensiz (DIET-2) yem:



ANKARA - ARDEN DENEY

DIET-2 RAT (SIÇAN) YEMİ

Kümes No :

Hayvan Cinsi :

Hammaddeler

M. Şahin Akdenizli

Hammadde Adı	Miktar
MISIR 7.	449,22
AYÇİÇEK KÜSPESİ 36	209,74
SOYA FASÜLYESİ KÜSPESİ 46.	135,96
SUT TOZU 35	100,00
PEYNİRALTI TOZU 7	50,00
503 BAKON MF STARTER YK %2,5	25,00
BİTKİSEL HAMYAĞ	19,73
MERMER TOZU..CaCO3	9,34
TUZ (NaCl).	1,00
	1000,00

Analiz

Besin Maddesi	Değer	Besin Maddesi	Değer	Besin Maddesi	Değer
DRY MATTER	87,89	DIG.LEUCINE	1,85	ZINC (Zn)	59,50
PROTEIN	22,00	ISOLEUCINE	1,00	COPPER (Cu)	5,00
M.ENERGY Poultry (kcal)	2.021,78	DIG.ISOLEUCINE	0,91	IODINE (I)	0,62
SODIUM	0,18	VALINE	1,12	SELENIUM (Se)	0,20
CALCIUM	1,00	TRYPTOPHAN	0,32	COBALT(Co)	0,00
AV.PHOSPHORUS	0,51	DIG.TRYPTOPHAN	0,27	CANTHAXANTHIN %10 (K)	0,00
C. FAT	4,00	ELECTROLYTE	260,09	APO ESTER %10 (S)	0,00
C.FIBER	5,00	SUGAR	4,58	ANTIOXIDAN	105,00
C.ASH	5,11	STARCH	36,34	PHYTASE	1.000,00
LYSINE	1,35	VITAMIN-A	12.000,00	XYLANASE	1.000,00
DIG. LYSINE	1,19	VITAMIN-D3	2.400,00	GLUCANASE	250,00
METHIONINE	0,56	VITAMIN-E	20,00	MANNANASE	100,00
DIG. METHIONINE	0,51	VITAMIN-K3	3,00	PROTEASE	100,00
METH + CYS	0,98	VTAMIN-B1	1,00	ALPHA-AMYLASE	150,00
DIG. MET + CYS	0,85	VITAMIN-B2	6,00	LIPASE	100,00
LINOLEIC ACID	2,88	VITAMIN-B6	3,00	PECTINASE	80,00
T.PHOSPHORUS	0,63	VITAMIN-B12	0,02	TOXIN BINDER	3.500,00
POTASSIUM	1,07	NIACIN	30,00	ORGANIC ACID MIX	750,00
CHLORINE	0,20	CAL.PANT.ACID	8,00	BACILLUS CEREUS	0,00
ARGININE	1,70	FOLIC ACID	1,00	HERBAL EXTRACT	200,00
DIG. ARGININE	1,57	BIOTIN	0,05	SACC.CEREVISIAE (CELL)	1.000,00
THREONINE	0,91	CHOLINE	300,00	DIG. PROTEIN	23,65
DIG.THREONINE	0,76	MANGANESE (Mn)	100,25	DIG. ENERGY	2.871,86
LEUCINE	1,79	IRON (Fe)	25,25	M.E. FORMULA	2.894,44

Factory: Organize Sanayi Bölgesi, Kırıkkale / Türkiye
Tel: +90 318 321 32 93 (pbx)
www.dsa-tr.com -info@dsa-tr.com

Yüksek glutenli (DIET-3) yem:



ANKARA - ARDEN DENEY

DIET-3 RAT (SIĞAN) YEMİ

Kümes No :

Hayvan Cinsi :

Hammaddeler

M. Şahin Akdenizli

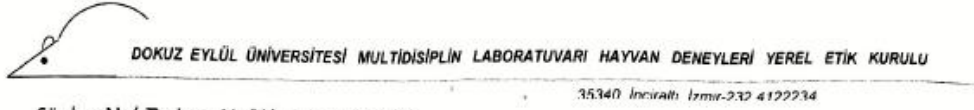
Hammadde Adı	Miktar
MISIR 7.	391,33
AYÇİÇEK KÜSPESİ 36	176,40
SOYA FASÜLYESİ KÜSPESİ 46.	124,71
SUT TOZU 35	100,00
RAZMOL .	56,16
PEYNİRLİ TOZU 7	50,00
BUĞDAY 12	35,00
503 BAKON MF STARTER YK %2,5	25,00
BITKİSEL HAMYAĞ	18,88
GLUTEN 75	12,00
MERMER TOZU .CaCO3	9,51
TUZ (NaCl).	1,00
	1000,00

Analiz

Besin Maddesi	Değer	Besin Maddesi	Değer	Besin Maddesi	Değer
DRY MATTER	87,77	DIG.LEUCINE	1,66	ZINC (Zn)	59,50
PROTEIN	22,00	ISOLEUCINE	0,95	COPPER (Cu)	5,00
M.ENERGY Poultry (kcal)	2.900,00	DIG.ISOLEUCINE	0,86	IODINE (I)	0,62
SODIUM	0,18	VALINE	1,11	SELENIUM (Se)	0,20
CALCIUM	1,00	TRYPTOPHAN	0,31	COBALT(Co)	0,00
AV.PHOSPHORUS	0,51	DIG.TRYPTOPHAN	0,26	CANTHAXANTHIN %10 (K)	0,00
C. FAT	4,00	ELECTROLYTE	247,81	APC ESTER %10 (S)	0,00
C.FIBER	5,00	SUGAR	4,54	ANTIOXIDAN	105,00
C.ASH	5,04	STARCH	35,18	PHYTASE	1.000,00
LYSINE	1,33	VITAMIN-A	12.000,00	XYLANASE	1.000,00
DIG. LYSINE	1,18	VITAMIN-D3	2.400,00	GLUCANASE	250,00
METHIONINE	0,55	VITAMIN-E	20,00	MANNANASE	100,00
DIG. METHIONINE	0,50	VITAMIN-K3	3,00	PROTEASE	100,00
METH + CYS	0,94	VTAMIN-B1	1,00	ALPHA-AMYLASE	150,00
DIG. MET + CYS	0,83	VITAMIN-B2	6,00	LIPASE	100,00
LINOLEIC ACID	2,80	VITAMIN-B6	3,00	PECTINASE	80,00
T.PHOSPHORUS	0,63	VITAMIN-B12	0,02	TOXIN BINDER	3.500,00
POTASSIUM	1,02	NIACIN	30,00	ORGANIC ACID MIX	750,00
CHLORINE	0,20	CAL.PANT.ACID	8,00	BACILLUS CEREUS	0,00
ARGININE	1,64	FOLIC ACID	1,00	HERBAL EXTRACT	200,00
DIG. ARGININE	1,50	BIOTIN	0,05	SACC.CEREVISIAE (CELL	1.000,00
THREONINE	0,89	CHOLINE	300,00	DIG.PROTEIN	23,42
DIG.THREONINE	0,75	MANGANESE (Mn)	100,25	DIG.ENERGY	2.643,29
LEUCINE	1,80	IRON (Fe)	25,25	M.E. FORMULA	2.734,14

Factory: Organize Sanayi Bölgesi, Kırıkkale / Türkiye
Tel: +90 318 321 32 93 (pbx)
www.dsa-tr.com -info@dsa-tr.com

8.2 Etik Kurul Onayı



Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 05/09/2019
Toplantı Tarihi : 08 Mayıs 2019

35340 İnciraltı İzmir-232 4122234

Sayın, Prof.Dr.Pinar AKAN
DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

14/2019 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Sıçanlarda glütenli beslenmenin bilişsel işlevlere NMDA reseptörü aracılı etkisi" isimli; Pinar Akan, Osman Yılmaz, Aydan Özkütük, Nevin Deniz Kırca, Görsev Yener, Alper Bağrıyanık, araştırmacı olduğu, 42 adet Wistar Albino Erkek Rat verilen projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Prof.Dr.Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Başkanı
(Araştırmacı)

Prof.Dr.Ali Necati GÖKMEN
Başkan Vekili

~~Prof.Dr.Safiye AKTAŞ~~
Üye

Prof.Dr. Hatice Nur OLGUN
Üye (Topl.Katılmadı)

Prof.Dr.Zekiye Sultan ALTUN
Üye

Prof.İ İM

Prof.Dr.Nergiz DURMUŞ
Üye(Topl.Katılmadı)

Prof.Dr.Pembe UYGUN KESKİNOĞLU
Danışman

~~Prof.Dr.Gamze ÇAPA KAYA~~
Üye

Prof.Dr.Şemra KOÇTÜRK
Üye

Prof.Dr.Çetin PEKÇETİN
Üye

Doç.Dr.Sefa KURT
Üye(Topl.Katılmadı)

~~Zehra KINAM~~
Üye

Vet.Hekim Aynur SERPEN

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde bold karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

8.3 Özgeçmiş

NEVİN DENİZ KIRCA

Eğitim Bilgileri

08 Ağustos 2018 - Şu Anda (2 yıl 10 ay)

Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TEMEL SİNİRBİLİMLER (YL) (TEZLİ)

Diploma Numarası: -

Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 4.0 / 4.0

03 Eylül 2012 - 23 Ocak 2018 (5 yıl 5 ay)

Lisans, Anadal/Normal Öğretim, BOĞAZİÇİ ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FEN-EDEBİYAT FAKÜLTESİ, MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PR.
(İNGİLİZCE)

Diploma Numarası: 14367

Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.17 / 4.0

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

Bildiriler

B. SERT SERDAR, N.D. KIRCA, P. AKAN, S. KOÇTÜRK,
Evaluation of Neuronal SH-SY5Y Cell Differentiation Process with Neuronal Markers
and Catecholamine Levels, Poster Sunumu, Cell Death: Degeneration and
Regeneration Uluslararası Sempozyumu 2019, 3-5 Ekim 2019.

M. ARAYICI, N.D. KIRCA, S. BÜYÜKÇOBAN, O. YILMAZ, P. AKAN,
The Effect of Gluten Content of Diet on Anxiety Behavior and Learning in Rats, Poster
Sunumu, The Virtual Congress on Brain Health, Innovation & Technologies
(Brain-HIT2020), 12-13 Ekim 2020.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam0

