



**AMNEZİ MODELİ OLUŞTURULMUŞ
SIÇANLARDA SUBAKUT TANGERETİN
UYGULAMASININ HİPOKAMPÜSTE
MEYDANA GETİRDİĞİ
DEĞİŞİKLİKLERİN ARAŞTIRILMASI
Yüksek Lisans Tezi**

**Furkan KENAR
Eskişehir 2023**

**AMNEZİ MODELİ OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA SUBAKUT
TANGERETİN UYGULAMASININ HİPOKAMPÜSTE
MEYDANA GETİRDİĞİ DEĞİŞİKLİKLERİN ARAŞTIRILMASI**

Furkan KENAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmakoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Nazlı TURAN YÜCEL

**Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Haziran 2023**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Furkan KENAR'ın "Amnezi Modeli Oluşturulmuş Sıçanlarda Subakut Tangeretin Uygulamasının Hipokampüste Meydana Getirdiği Değişikliklerin Araştırılması" başlıklı tezi 20/06/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmakoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı) :	Dr. Öğr. Üyesi Nazlı TURAN YÜCEL	
Üye :	Prof. Dr. Özgür Devrim CAN	
Üye :	Dr. Öğr. Üyesi Umut İrfan ÜÇEL	

Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ
Enstitü Müdürü

ÖZET

AMNEZİ MODELİ OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA SUBAKUT TANGERETİN UYGULAMASININ HİPOKAMPÜSTE MEYDANA GETİRDİĞİ DEĞİŞİKLİKLERİN ARAŞTIRILMASI

Furkan KENAR

Farmakoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Haziran 2023

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Nazlı TURAN YÜCEL

Bu tez çalışmasında, *Citrus* türlerinin kabuklarında yaygın olarak bulunan bir flavon türeği olan tangeretin (TNG)'in kognitif disfonksiyonlardaki terapötik potansiyelinden yola çıkılarak, bu flavonoidin skopolamin (SCP) ile amnezi modeli oluşturulmuş sıçanların hipokampuslarındaki olası etkileri araştırılmıştır.

Bu amaçla, sıçanlara 14 gün süreyle 50 ve 100 mg/kg dozlarında *per oral* olarak TNG uygulanmış ve TNG'nin öğrenme ve bellek açısından kritik rolü olan hipokampusun CA₁, CA₃ ve dentat girus bölgelerinde meydana getirdiği morfolojik farklılıklar ve immunoreaktivite değişiklikleri incelenmiştir. Elde edilen bulgular sonucunda; SCP'nin, hipokampal NeuN ve GFAP immünopozitif hücre sayılarında düşüşe yol açtığı; ayrıca Nissl cisimciklerinin bazofilitesinde zayıflamaya ve nöronların hücre yapılarında bozulmalara sebebiyet verdiği saptanmıştır. TNG uygulaması ise amnezik sıçanların hipokampuslarının ilişkili alt-alanlarında, zayıflamış olan nöronal proliferasyonu arttırmış ve astroglial gerilemeyi önemli ölçüde düzeltmiştir.

TNG'nin hipokampal nöroenez, nöroplastisite ve glial plastisite üzerindeki faydalı etkilerinin ortaya konulduğu bu çalışma, Alzheimer hastalığı başta olmak üzere bilişsel işlevlerin gerilediği çeşitli hastalıklar ve tedavilerine yönelik bir bakış açısı sağlaması açısından önem taşımaktadır.

Anahtar Sözcükler: Tangeretin, Amnezi, Hipokampus, NeuN, GFAP

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE CHANGES INDUCED BY SUBACUTE TANGERETIN ADMINISTRATION IN THE HIPPOCAMPUS OF RATS WITH AMNESIA MODEL

Furkan KENAR

Department of Pharmacology

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, June 2023

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Nazlı TURAN YÜCEL

In this thesis, based on its therapeutic potential in cognitive dysfunctions, the probable effects of tangeretin (TNG), a flavone derivative commonly found in the cortices of *Citrus* species, on the hippocampi of rats with scopolamine (SCP)-induced amnesia model were investigated.

For this purpose, rats were administered TNG per orally at 50 and 100 mg/kg doses for 14 days and the morphological differences and immunoreactivity changes caused by TNG in CA₁ and CA₃ and dentate gyrus regions of the hippocampus, which have critical roles in learning and memory, were investigated. As a result of the findings; SCP caused a reduction in the number of hippocampal NeuN and GFAP immunopositive cells, as well as weakening in basophilicity of Nissl bodies and deterioration in cell structures of neurons. On the other hand, administration of TNG increased the weakened neuronal proliferation and significantly modified astroglial regression in the associated sub-regions of the hippocampus of amnesic rats.

This study, which reveals the beneficial effects of TNG on hippocampal neurogenesis, neuroplasticity and glial plasticity, is important in terms of providing an insight into various diseases and treatments in which cognitive functions regress, especially in Alzheimer's disease.

Keywords: Tangeretin, Amnesia, Hippocampus, NeuN, GFAP

TEŞEKKÜR

Lisans ve Yüksek Lisans eğitim-öğretim hayatım sürecinde değerli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak akademik ve mesleki bilgi donanımı kazanmamı sağlayan, araştırmacı, insancıl ve anlayışlı karakterine hayranlık duyduğum saygıdeğer danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Nazlı TURAN YÜCEL'e,

Tez çalışmam esnasında her türlü sıkıntıda bana yol gösteren, bilgi, beceri ve tecrübeleriyle her daim yanımda olan, çok sevdiğim saygıdeğer hocalarım, Prof. Dr. Özgür Devrim CAN ile Prof. Dr. Ümide DEMİR ÖZKAY'a,

Tezimin tüm aşamalarında değerli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Öğr. Gör. Ümmühan KANDEMİR'e,

Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji ABD'nin değerli öğretim üyelerine ve Arş. Gör. Cevşen YAZICI'ya,

Yardım ve destekleri için Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde görevli değerli hocalarıma,

Maddi ve manevi olarak her koşulda beni destekleyen, sonsuz sabır ve fedakârlık gösterip bugüne gelmemi sağlayan annem Müyesser KENAR, babam Tekin KENAR ve kardeşim Yusuf KENAR'a,

Zorlandığım hiçbir an beni yalnız bırakmayan ve devam etmemi sağlayacak motivasyonu veren Ceren GÜNDOĞAN'a,

Sonsuz ve en içten teşekkürlerimi sunarım.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Ecz. Furkan KENAR

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Öğrenme ve Bellek	4
2.2. Bellek Türleri	4
2.2.1. Kısa süreli bellek	7
2.2.2. Orta uzun süreli bellek	7
2.2.3. Uzun süreli bellek	8
2.3. Öğrenme ve Bellekte Rol Oynayan Nöroanatomik Yapılar ve Fonksiyonları	8
2.3.1. Medial temporal lob ve hipokampus	8
2.3.2. Serebellum ve bazal gangliyonlar	9

2.3.3. Amigdala	9
2.4. Öğrenme ve Belleğin Nörofizyolojik Temeli	10
2.4.1. Nöromediyatör mekanizmaların öğrenme ve bellek üzerine katkısı	11
2.4.1.1. Asetilkolin	11
2.4.1.2. Glutamat	13
2.4.1.3. Nitrik oksit	14
2.4.1.4. GABA	15
2.4.1.5. Dopamin	15
2.4.1.6. Noradrenalin	16
2.4.1.7. Serotonin	16
2.4.2. Sinaptik plastisitenin öğrenme ve bellek üzerine katkısı ...	17
2.4.2.1. Uzun süreli potansiyalizasyon	18
2.4.2.2. Uzun süreli depresyon	19
2.4.3. Nörogenezin öğrenme ve bellek üzerine katkısı	20
2.4.4. Nörotrofik faktörlerin öğrenme ve bellek üzerine katkısı .	22
2.4.5. Glia hücrelerinin öğrenme ve bellek üzerine katkısı	23
2.5. Deneyisel Amnezi Modelleri	25
2.6. Tangeretin	26
3. GEREÇLER	31
3.1. Deney Hayvanları	31
3.2. Kullanılan Kimyasal Madde ve İlaçlar	31
3.3. Kullanılan Cihazlar	32

4. YÖNTEMLER	33
4.1. İlaç Tedavisi	33
4.2. Skopolamin ile Deneysel Amnezi Modelinin Oluşturulması	33
4.3. Deney Grupları ve Sayıları	33
4.4. Deney Hayvanlarının Perfüzyonu ve Doku İşleme Protokolü	33
4.5. Morfolojik Çalışmalar	34
4.5.1. Nissl boyama	34
4.5.2. Morfometrik analiz	34
4.6. İmmünohistokimyasal Çalışmalar	35
4.6.1. İmmünohistokimyasal boyama	35
4.6.2. İmmünoreaktivitenin değerlendirilmesi	36
4.7. İstatistiksel Analiz	37
5. BULGULAR ve TARTIŞMA	38
5.1. Morfolojik Çalışmalara İlişkin Bulgular	38
5.1.1. Hipokampal formasyona ait bölgelerde Nissl boyamasına ilişkin morfolojik bulgular	38
5.2. İmmünohistokimyasal İncelemelere İlişkin Bulgular	41
5.2.1. Hipokampal formasyona ait bölgelerde NeuN immünoreaktivitelerine ilişkin bulgular	41
5.2.2. Hipokampal formasyona ait bölgelerde GFAP immünoreaktivitelerine ilişkin bulgular	49

6. SONUÇ ve ÖNERİLER	58
KAYNAKÇA	61
ÖZGEÇMİŞ	



TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. Tangeretin'in farmakokinetik profili 27

Tablo 4.1. Deney grupları 33



ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Bellek tiplerinin kategorilendirilmesi	5
Şekil 2.2. Zamana bağlı bellek tiplerinin karşılaştırılması	7
Şekil 2.3. Koronal ekseninde alınmış hipokampus kesiti	8
Şekil 2.4. Öğrenme ve bellek ile ilişkili beyin bölümleri	10
Şekil 2.5. Asetilkolin modülasyonunun bilişsel işlevlerdeki kompleksliği	12
Şekil 2.6. Hipokampusün CA ₁ bölgesindeki VGLUT3+ nöronların lokalizasyonu	14
Şekil 2.7. Hipokampüsteki Schaffer kollaterallerinde LTP üretimi	19
Şekil 2.8. Sağlıklı insanda ve Alzheimer hastasında hipokampus morfolojisi	21
Şekil 2.9. Erişkin hipokampusündeki nörogenez oluşumu	22
Şekil 2.10. Santral sinir sisteminde glia hücreleri	24
Şekil 2.11. Tangeretin'in kimyasal yapısı	27
Şekil 4.1. Nissl boyama ile morfolojik analiz yapılan hipokampal kesitlerden alınan örneklerin temsili görüntüsü	35

Şekil 5.1.	Nissl boyama işlemi gerçekleştirilmiş sıçanların hipokampal formasyonlarının temsili görüntüleri, optik büyütme: 40X (Kontrol CA ₁ , CA ₃ , DG; A, E, I), (SCP+Kontrol CA ₁ , CA ₃ , DG; B, F, J), (SCP+TNG50 CA ₁ , CA ₃ , DG; C, G, K) (SCP+TNG100 CA ₁ , CA ₃ , DG; D, H, L)	39
Şekil 5.2.	14 gün süreyle düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol, A), SCP ile amnezi oluşturulmuş (SCP+Kontrol, B), 14 gün süreyle düzenli olarak 50 mg/kg veya 100 mg/kg TNG uygulanan ve bunu takiben SCP uygulanan amnezik (SCP+TNG50, C ve SCP+TNG100, D) sıçanların hipokampal CA ₁ alanlarında NeuN immünoreaktivitelerinin temsili görüntüleri	42
Şekil 5.3.	14 gün boyunca düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol), SCP uygulanan amnezik (SCP+Kontrol), 14 gün süreyle düzenli olarak 50 mg/kg veya 100 mg/kg TNG uygulanan ve bunu takiben SCP uygulanan amnezik (SCP+TNG50 ve SCP+TNG100) sıçanların hipokampal CA ₁ alanlarında birim alana düşen NeuN immünopozitif hücre sayıları	43
Şekil 5.4.	14 gün süreyle düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol, A), SCP ile amnezi oluşturulmuş (SCP+Kontrol, B), 14 gün süreyle düzenli olarak 50 mg/kg veya 100 mg/kg TNG uygulanan ve bunu takiben SCP uygulanan amnezik (SCP+TNG50, C ve SCP+TNG100, D) sıçanların hipokampal CA ₃ alanlarında NeuN immünoreaktivitelerinin temsili görüntüleri	44

- Şekil 5.5.** 14 gün boyunca düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol), SCP uygulanan amnezik (SCP+Kontrol), 14 gün süreyle düzenli olarak 50 mg/kg veya 100 mg/kg TNG uygulanan ve bunu takiben SCP uygulanan amnezik (SCP+TNG50 ve SCP+TNG100) sıçanların hipokampal CA₃ alanlarında birim alana düşen NeuN immünopozitif hücre sayıları 45
- Şekil 5.6.** 14 gün süreyle düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol, A), SCP ile amnezi oluşturulmuş (SCP+Kontrol, B), 14 gün süreyle düzenli olarak 50 mg/kg veya 100 mg/kg TNG uygulanan ve bunu takiben SCP uygulanan amnezik (SCP+TNG50, C ve SCP+TNG100, D) sıçanların hipokampal DG alanlarında NeuN immünoreaktivitelerinin temsili görüntüleri 46
- Şekil 5.7.** 14 gün boyunca düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol), SCP uygulanan amnezik (SCP+Kontrol), 14 gün süreyle düzenli olarak 50 mg/kg veya 100 mg/kg TNG uygulanan ve bunu takiben SCP uygulanan amnezik (SCP+TNG50 ve SCP+TNG100) sıçanların hipokampal DG alanlarında birim alana düşen NeuN immünopozitif hücre sayıları 47

- Şekil 5.8.** 14 gün süreyle düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol, A), SCP ile amnezi oluşturulmuş (SCP+Kontrol, B), 14 gün süreyle düzenli olarak 50 mg/kg veya 100 mg/kg TNG uygulanan ve bunu takiben SCP uygulanan amnezik (SCP+TNG50, C ve SCP+TNG100, D) sıçanların hipokampal CA₁ alanlarında GFAP immünoreaktivitelerinin temsili görüntüleri 50
- Şekil 5.9.** 14 gün boyunca düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol), SCP uygulanan amnezik (SCP+Kontrol), 14 gün süreyle düzenli olarak 50 mg/kg veya 100 mg/kg TNG uygulanan ve bunu takiben SCP uygulanan amnezik (SCP+TNG50 ve SCP+TNG100) sıçanların hipokampal CA₁ alanlarında birim alana düşen GFAP immünopozitif hücre sayıları 51
- Şekil 5.10.** 14 gün süreyle düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol, A), SCP ile amnezi oluşturulmuş (SCP+Kontrol, B), 14 gün süreyle düzenli olarak 50 mg/kg veya 100 mg/kg TNG uygulanan ve bunu takiben SCP uygulanan amnezik (SCP+TNG50, C ve SCP+TNG100, D) sıçanların hipokampal CA₃ alanlarında GFAP immünoreaktivitelerinin temsili görüntüleri 52

- Şekil 5.11.** 14 gün boyunca düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol), SCP uygulanan amnezik (SCP+Kontrol), 14 gün süreyle düzenli olarak 50 mg/kg veya 100 mg/kg TNG uygulanan ve bunu takiben SCP uygulanan amnezik (SCP+TNG50 ve SCP+TNG100) sıçanların hipokampal CA₃ alanlarında birim alana düşen GFAP immünopozitif hücre sayıları 53
- Şekil 5.12.** 14 gün süreyle düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol, A), SCP ile amnezi oluşturulmuş (SCP+Kontrol, B), 14 gün süreyle düzenli olarak 50 mg/kg veya 100 mg/kg TNG uygulanan ve bunu takiben SCP uygulanan amnezik (SCP+TNG50, C ve SCP+TNG100, D) sıçanların hipokampal DG alanlarında GFAP immünoreaktivitelerinin temsili görüntüleri 54
- Şekil 5.13.** 14 gün boyunca düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol), SCP uygulanan amnezik (SCP+Kontrol), 14 gün süreyle düzenli olarak 50 mg/kg veya 100 mg/kg TNG uygulanan ve bunu takiben SCP uygulanan amnezik (SCP+TNG50 ve SCP+TNG100) sıçanların hipokampal DG alanlarında birim alana düşen GFAP immünopozitif hücre sayıları 55

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACh	: Asetilkolin
AMPA	: α -amino-3-hidroksi-5-metilizoksazol-4 propiyonik asit
BDNF	: Brain derived neurotrophic factor (Beyin kökenli nörotrofik faktör)
CA	: <i>Cornu ammonis</i>
Ca ²⁺	: Kalsiyum
CRE	: cAMP yanıt elemanı
COX-2	: Siklooksijenaz-2
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DG	: Dentat girus
GFAP	: Glial fibriler asidik protein
GABA	: γ -Aminobutirik asit
GPCR	: G proteini kenetli reseptörler
IL	: İnterlökin
IL-1 β	: İnterlökin-1 beta
IL-6	: İnterlökin-6
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
JNK	: N-terminal kinaz
K ⁺	: Potasyum

LPS	: Lipopolisakkarit
LTD	: Long-term depression (Uzun süreli depresyon)
LTP	: Long-term potentiation (Uzun süreli potansiyalizasyon)
Mg ²⁺	: Magnezyum
MAPK	: Mitojenle aktive olan protein kinaz
MMP	: Matriks metaloproteinaz
MPTP	: 1-Metil-4- fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin
Na ⁺	: Sodyum
NGF	: Nerve growth factor (Sinir büyüme faktörü)
NeuN	: Neuronal nuclear protein (Nöronal nükleer protein)
NMDA	: N-metil-D-aspartat
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
NT-3	: Nörotrofin-3
PBS	: Phosphate-buffered saline (Fosfat tamponlu salin)
PGE ₂	: Prostaglandin E ₂
PSD-95	: Postsynaptic density-95 (Postsinaptik yoğunluk-95)
sAMP	: 3'-5'-siklik adenosin monofosfat
SCP	: Skopolamin

SF : Serum fizyolojik

SSS : Santral Sinir Sistemi

str : *Stratum*

TH+ : Tirozin hidroksilaz pozitif

TNG : Tangeretin

TNF- α : Tümör nekroz faktörü- α

VGLUT3 : Veziküler glutamat taşıyıcı tip 3

5-HT : 5-Hidroksitriptamin (Serotonin)

6-OHDA : 6-Hidroksidopamin

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Demans; kişinin açık bir bilinç seviyesinde başta bellek olmak üzere zihinsel ve sosyal kabiliyetlerinin, bireyin günlük yaşamsal faaliyetlerini etkileyecek düzeydeki tahribatı olarak tanımlanabilir. Bu tahribat, ilk olarak bellekte görülürken ilerleyen safhalarda dikkat, görsel-alansal beceriler, lisan, problem çözme ve algısal bozuklukları da beraberinde getirmektedir. Bu tabloya, kişilik değişiklikleri, davranışsal ve psikiyatrik semptomlar da eklenebilmektedir (Yavlal ve Güngör, 2016). Bunların yanı sıra; demans hastalarının yaşam kalitesindeki ciddi bir düşüşe, diğer yandan da ulusal ve global ekonomide ciddi yüke sebebiyet veren kognitif bozuklukların tedavisinde kullanılan terapötik ilaç sayısı oldukça sınırlıdır (Wimo ve Wimbland, 2003; Şahin vd., 2005).

Nöronal kök hücrelerinin oluştuğu proses “nörogenez” olarak adlandırılmaktadır. Nörogeneze özellikle, hipokampal *gyrus dentatus* (dentat girus, DG) ve subgranüler tabakada rastlanılmaktadır (Altman, 1963). Yetişkin canlılardaki nörogenezin kognitif ve emosyonel proseslere olan katkı potansiyelleri bilinmektedir. Yetişkin memeli beyinde DG ve *bulbus olfactorius* gibi bazı spesifik bölgelerde progenitor hücrelerin mitotik etkinlik göstermelerinin, olgun nöronlara transformasyonları sonucu fonksiyonelleşmeleri ve bölgesel olarak sinir ağı ile bütünleşmelerinin bildirilmesi, bilim dünyasına yeni bir bakış açısı kazandırmıştır (Bruehl-Jungerman vd., 2007). Yapılan çalışmalar sonucunda, bu nöral rejenerasyon prosesinin; uzamsal bellek, epizodik bellek ve diğer kognitif fonksiyonlara olan ciddi katkıları rapor edilmiştir (Essa vd., 2022).

Glialar ise santral ve periferik sinir sisteminde bulunan, destek ve korumadan sorumlu yapılar olup astrositler de nöronları sarmalayan yıldızsı glial hücrelerdir (Genoud vd., 2006). Yapılan çalışmalar sonucunda; astrositlerin bilgi işleme ve bellek oluşumunun altyapısını ve nöronal etkinliği ilgilendiren “sinaptik transmisyon”, “nöromodülasyon”, ve “plastisite” gibi fonksiyonlara olan katkıları bildirilmiştir (Eroglu ve Barres, 2010).

Sahip oldukları çeşitli etkileriyle flavonoidler, sağlık üzerinde önemli olumlu özelliklere sahiptir. Yüksek antioksidan potansiyelleri ile serbest radikalleri uzaklaştırarak vücudu korumaktadırlar. Flavonoidler, nöronları korumanın yanında; nöronal fonksiyonların artmasına ve nöronların yenilenmesine de katkı sağlamaktadır. Antioksidan etkilerinin yanı sıra antikanseröz, antiinflamatuvar, antibakteriyel, antiviral ve hepatoprotektif özellikler de göstermektedirler. Bu geniş etki yelpazesi; profilaktik ve

terapötik etkileri sebebiyle flavonoidleri, sağlık endüstrisinde güçlü bir aday haline getirmektedir (Youdim ve Joseph, 2001; Fatima ve Siddique, 2019).

Tangeretin (TNG) (5,6,7,8,4'-pentametoksi flavon) ise *Citrus reticulata* ve *Citrus sinensis* gibi turunçgillerin korteksinde bulunan antiinflamatuvar, antioksidan ve nöroprotektif etkinlikleri bilinen O-polimetoksillenmiş bir flavondur (Funaro vd., 2016; Hung vd., 2018). TNG'nin kolinerjik fonksiyon bozukluklarını zayıflattığı, nörotoksik amiloid-beta peptidlerinin dengesiz birikimini azalttığı, N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör hipofonksiyonunu regüle ettiği, iskemik hasarı iyileştirdiği, tau proteininin hiperfosforilasyonunu baskıladığı, çeşitli sinyal kaskadlarını modüle ettiği ve 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) ile indüklenen toksisiteye karşı profilaktik etki gösterdiği rapor edilmiştir (Braidı vd., 2017). TNG'nin kimyasal yapısında glikozid bağlarını içermemesi, bağırsaklardan kolay absorpsiyonunu; lipofilik profili ise kan-beyin bariyerini rahatlıkla aşabilmesine ve santral sinir sistemi (SSS)'ne ulaşmasına olanak sağlamaktadır (Datla vd., 2001; Assini vd., 2013).

Bir polimetoksiflavon türeві olan TNG'nin kognitif fonksiyonlar üzerindeki olumlu etkileri ve bu süreçlerden sorumlu yapılar üzerindeki protektif özellikleri çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (Datla vd., 2001; Guo vd., 2017; Yang vd., 2017; Hung vd., 2018; Yang vd., 2020). Yang ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada; nöroinflamasyon aracılığıyla iskemi/reperfüzyon patogenezi oluşturulmuş sıçanlara 5 mg/kg, 10 mg/kg ve 20 mg/kg dozlarında TNG tedavisi uygulandığında; TNG'nin serebral iskemi/reperfüzyon hasarına karşı, özellikle hipokampal alanda nöronal hasar ve nöron ölümünün yol açtığı kognitif disfonksiyonları önlediği belgelenmiştir (Yang vd., 2020). Wu ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada; nefrektomik farelerde TNG'nin 50 mg/kg, 100 mg/kg ve 200 mg/kg dozlarında intragastrik olarak 30 gün boyunca uygulanmasının farelerde bozulan kognitif disfonksiyonları önemli ölçüde iyileştirdiği rapor edilmiştir (Wu vd., 2018). TNG ve insan alfa sinüklein üzerinde yapılan moleküler docking çalışmaları ise TNG'nin alfa sinüklein ile bir kompleks oluşturabileceğini ve Lewy cisimciklerinin oluşumunu önleyerek kognitif hasarlarda iyileştirici etki gösterebileceğini göstermiştir (Fatima vd., 2019).

Sinir hücrelerinin ve onları destekleyen yapıların canlılığının, morfolojik ve fonksiyonel işleyişinin değerlendirilmesinde; çeşitli patolojik durumların sinir sisteminin farklı bölgelerindeki etkilerinin araştırılmasında immünohistokimyasal yöntemler önemli rol oynamaktadır (Alekseeva vd., 2015). Bu tez çalışmasında da kognitif fonksiyonlar üzerindeki potansiyel terapötik etkisinden yola çıkarak, morfolojik analiz ve immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak TNG'nin skopolamin (SCP) aracılıklı deneysel amnezi modeli oluşturulmuş sıçanlarda hipokampal formasyona olan etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Öğrenme ve Bellek

Öğrenme ve bellek, insanların ve hayvanların bağımsız olarak hayatta kalabilmesi ve sahip oldukları tüm fonksiyonlarının işleyişi için son derece gereklidir. Çevre hakkında bilgi edinmekten kaynaklanan davranış değişikliğini ve bu bilginin anlamlandırıldığı, daha sonra anımsandığı bir süreci ifade etmektedir (Kandel vd., 2014). Memeli SSS'nin avantajlarından biri de büyük miktarlarda bilgi depolama ve işleme kabiliyetinin olmasıdır (Gasparini vd., 1998). Öğrenme, bir uyarıcıya karşı belirli ölçülerde davranışsal reaksiyon olasılığındaki artışla tanımlanabilmektedir. Ödüller veya cezalar, çevresel etkileşim ve manipülasyon gibi etkenler öğrenmenin önemli komponentlerinden biridir. Bellek ise edinilmiş bilgilerin nispeten kalıcı depolanma biçimidir (Widmaier vd., 2019).

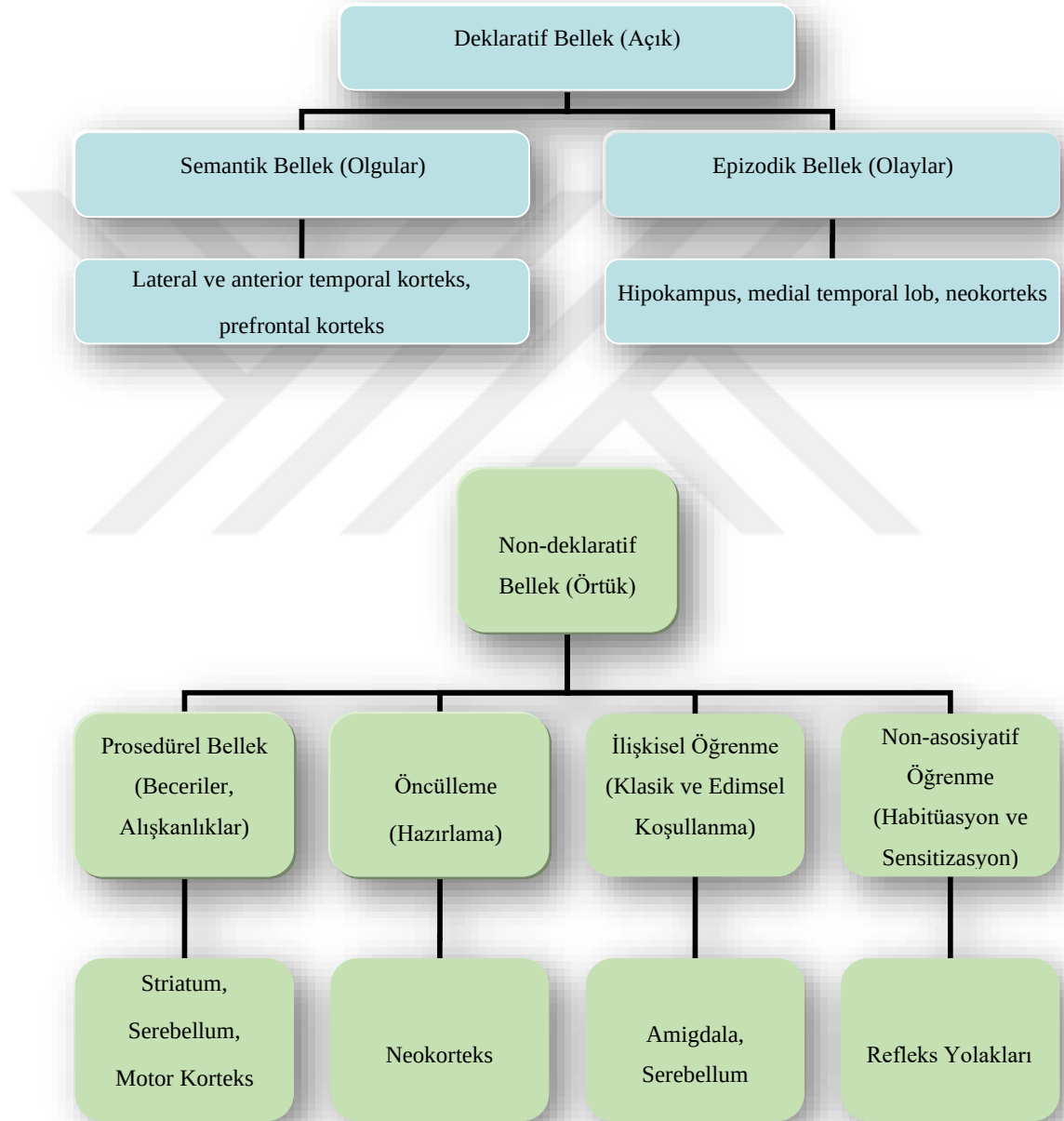
2.2. Bellek Türleri

Anılar, önceki nöronal aktivitenin bir sonucu olarak, nöronlar arasındaki sinaptik transmisyonun temel duyarlılığını değiştirerek beyinde depolanmaktadır. Yeni veya optimize edilmiş yollara bellek izleri denmektedir. Bir kez kurulan izler, anıları yeniden üretmek için bilinç tarafından spesifik olarak etkinleştirilebilmektedirler. Yapılan hayvan deneyleri, bellek izlerinin SSS'nin tüm düzeylerinde oluşabileceğini göstermektedir. Uzun süreli bellek, beynin alt merkezlerindeki sinaptik iletimden kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte entelektüel proseslerle bağdaştırdığımız çoğu anı, serebral korteksteki bellek izlerine dayanmaktadır (Hall ve Guyton, 2011).

Bellek türlerinin; tipine göre (klasik koşullanma, habitüasyon, prosedürel vb.), içeriğine göre (semantik, epizodik vb.), temporal karakterine göre (kısa veya uzun süreli) ve işlem seviyesine göre (kodlama, geri çağırma) ayrı formlarda çeşitli işlevleri bulunmaktadır (Gasparini vd., 1998). Bu sebeplerden dolayı belleğin; tek bir anatomik yapıda lokalize olmak yerine farklı işlevlerini, beynin farklı bölgeleri aracılığıyla gerçekleştirebileceği ortaya konulmuştur (Poldrack ve Packard, 2003; Widmaier vd., 2019).

Fizyolojik olarak bellek, açık (deklaratif) ve örtük (non-deklaratif) bellek olarak ikiye ayrılır. Deklaratif bellek, bilinçle veya en azından farkındalıkla ilgili olmakla birlikte: insanlar, yerler ve olaylar hakkında olgusal bilgi içermektedir. Saklanması ise hipokampus, medial temporal loblar, neokorteks ve prefrontal korteksin bütünlüğü ile

ilişkilidir. Non-deklaratif bellek ise bilinç içermez ve saklanması için hipokampus veri işlemez. Bunun yanı sıra; amigdala, striatum, serebellum ve neokorteksle refleks yollarının bütünlüğünü gerektirmektedir. Aynı zamanda non-deklaratif bellek; refleksif motor, algısal beceri gelişimi, klasik şartlanma, alışkanlık ve duyarlılık için kritik öneme sahiptir (Barrett vd., 2019). Bellek tipleriyle ilgili detaylı kategorilendirme ise Şekil 2.1’de sunulmaktadır.

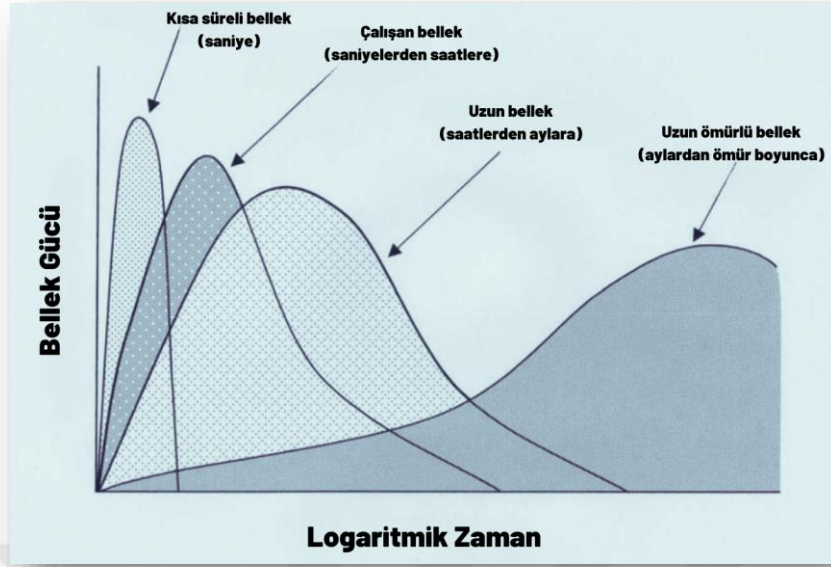


Şekil 2.1. Bellek tiplerinin kategorilendirilmesi (Barrett vd., 2019).

Deklaratif belleğe: kodlama, depolama, birleştirme ve geri çağırma gibi birbiriyle ilişkili; ancak farklı işlem türlerinin aracılık ettiği bilinmektedir. Bu sürece ilişkin temel bilgiler aşağıda özetlenmiştir (Kandel vd., 2014).

- i. Kodlama: Yeni bilgilerin edinildiği ve bellekteki var olan bilgilere bağlandığı bir dizi prosedürdür.
- ii. Depolama: Belleğin belirli bir süre içerisinde tutulduğu nöral mekanizmaları ve yerleri belirtmektedir. Uzun süreli depolama, görünüşte sınırsız bir kapasiteye sahiptir ve bilinen bir limiti yoktur; ancak çalışan belleğin depolaması çok kısıtlıdır, bu bellek herhangi bir anda az miktarda bilgi tutabilmektedir.
- iii. Birleştirme: Önbellekte geçici olarak saklanan bilgileri daha kararlı hale getirme işlemidir. Bu proses aynı zamanda, sinapslarda yapısal farklılıklara yol açan gen ekspresyonunu ve protein sentezini içermektedir.
- iv. Geri çağırma: Farklı bölgelerde saklanan farklı bilgi türlerini geri çağırma sürecidir.

Dört alt kategoride incelenen non-deklaratif bellek, refleks motor ve algısal becerilerin gelişimi için büyük önem taşımaktadır. Neokorteks ile ilişkili olan öncülleme, önceden maruz kalma yoluyla objelerin ve sözcüklerin ayırt edilmesini kolaylaştırmaktadır. Striatumda işlenen prosedürel bellek, bir kere kazanıldığında bilinçsiz ve otomatik duruma gelen yetenek ve şartlanılmış davranışları içermektedir. Emosyonel tepkiler için amigdalaya ve motor tepkiler içinse serebelluma bağımlı olan asosiyatif öğrenme; bir uyarıcının diğeriyle bağlantısını öğrenerek klasik ve edimsel şartlanmayı ele almaktadır. Habitüasyon ve sensitizasyonu içeren non-asosiyatif bellek ise çeşitli refleks yollarına dayanmaktadır (Barrett vd., 2019).



Şekil 2.2. Zamana bağlı bellek tiplerinin karşılaştırılması (Robertson, 2002).

Belleğin farklı aşamalarının oluşturulmasının altında zamana bağlı bir proses yatmaktadır. Logaritmik olarak zamanın, bellek gücüne olan etkisi Şekil 2.2’de gösterilmiştir (Robertson, 2002).

2.2.1. Kısa süreli bellek

Kısa süreli bellekte bilgiler, saniyelerce ya da dakikalarca tutulmaktadır. Bu proses, presinaptik fasilasyon ve inhibisyon ile açıklanmakta; presinaptik uçlarda yer alan nörotransmitter salınımıyla gerçekleşmektedir.

2.2.2. Orta uzun süreli bellek

Orta uzun süreli bellek, bilgilerin birkaç dakika ya da haftalarca tutulduğu bellektir. İlkel hayvanlar üzerinde yapılan deneylere göre orta uzun süreli bellek, presinaptik terminaller ile postsinaptik membranda geçici bir kimyasal ve/veya fiziksel değişiklikler ile oluşmaktadır (Hall ve Guyton, 2011).

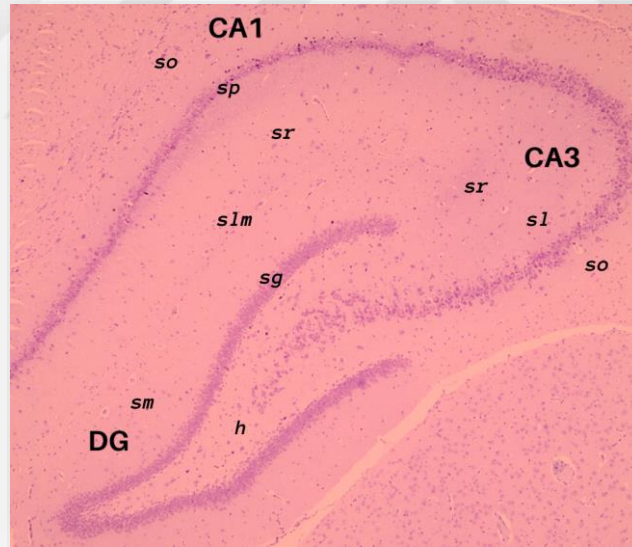
2.2.3. Uzun süreli bellek

Uzun süreli bellek, edinilen bilgileri yıllarca veya yaşam boyu muhafaza edebilmektedir. Uzun süreli bellek ile orta uzun süreli bellek arasında net bir çizgi bulunmamaktadır. Ancak, uzun süreli bellekte sinapslardaki kimyasal değişikliklerin yerine yapısal değişikliklerin daha yaygın olduğu düşünülmektedir (Hall ve Guyton, 2011; Barrett vd., 2019).

2.3. Öğrenme ve Bellekte Rol Oynayan Nöroanatomik Yapılar ve Fonksiyonları

2.3.1. Medial temporal lob ve hipokampus

Hipokampus, beyin üzerinde en kapsamlı araştırma yapılan bölgelerden biridir. Nörobiyolojik temeller üzerine yapılan çalışmalar sonucunda; duyuşal, duygusal ve kognitif fonksiyonların oluşumunda ve gelişiminde hipokampusün kritik rolü bildirilmiştir (Knierim, 2015).



Şekil 2.3. Koronal ekseninde alınmış hipokampus kesiti. Stratum oriens (so), stratum pyramidale (sp), stratum radiatum (sr), stratum lacunosum-moleculare (slm), stratum moleculare (sm), stratum granulosum (sg), stratum lucidum (sl), hilus (hl)

Hipokampüs, medial temporal lobun derinliklerine gömülü uzun bir yapıdır. Aynı zamanda, lateral ventrikülün temporal boynuzu doğrultusunda uzanan gri cevherin bir katmanıdır. Koronal kesitlerde C harfi şeklinde görülmekle beraber (Şekil 2.3.), dış yüzeyi koç boynuzunu çağrıştırdığından dolayı “*cornu ammonis*” (CA) olarak isimlendirilmektedir (Amaral vd., 1990; Knierim, 2015).

Hipokampüse ana girdiyi sağlayan ve subikulum aracılığıyla CA₁ alanından output alan entorinal korteks: biri DG ve CA₃ alanlarına, diğeri CA₁ ve subikuluma uzanmakta olan iki yoldan hipokampüse ileti sağlamaktadır. Çalışan bellek alanları ise hipokampüse ve medial temporal korteksin komşu olduğu parahipokampal bölgeye bağlanmaktadır. Hipokampüs üzerinden çıkmakta olan ileti, subikulum ve entorinal korteks yoluyla ayrılır ve farklı neokortikal bölgelerdeki sistemleri birbirine bağlar. Böylece, farklı ipuçları aracılığıyla tetiklenebilen kalıcı bellekleri oluşmaktadır (Wible, 2013; Barrett vd., 2019).

2.3.2 Serebellum ve bazal gangliyonlar

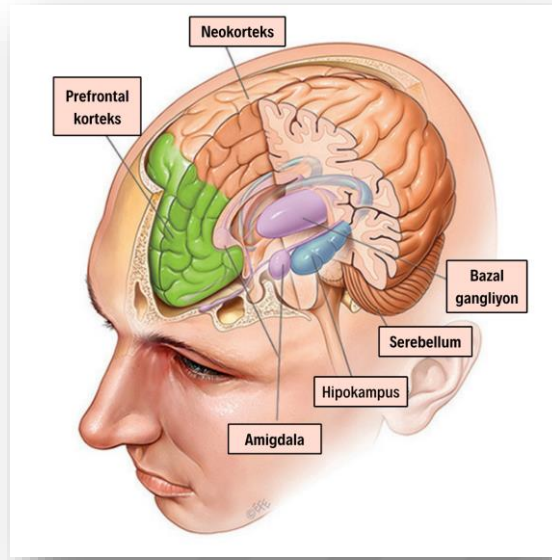
Subkortikal çekirdekler, serebral hemisferin derinliklerinde bulunan heterojen gri madde takımlarıdır. Bunların içerisinde; hareket, postür ve kompleks davranışlar üzerinde önemli görevleri olan bazal gangliyonlar baskın durumdadır (Widmaier vd., 2019).

Ek olarak bazal gangliyonların, soyut düşüncenin istemli bir aksiyona çevrildiği proselere olan katkıları bilinmektedir. Motor korteksi, talamus aracılığıyla ve kortikospinal yol üzerinden (motor nöronlara giden son ortak yol) etkilemektedirler.

Ayrıca bazal gangliyonların (özellikle kaudat nükleus), kognitif proseslerde kritik rol oynadıkları bilinmektedir (Barrett vd., 2019).

2.3.3. Amigdala

Amigdala, emosyonel içerikli bellek kodlamak ve anımsamakla görevlidir. Aynı zamanda, hipokampüsle yakından bağlantılıdır (Şekil 2.4.). Bellekteki, korku yüklü anıların hatırlanması esnasında amigdala ve hipokampüs teta ritimleri eşleşmektedir. Sağlıklı bireylerde; güçlü ve olumlu emosyonel olaylar, emosyonel olmayan durumlardan daha iyi anımsanmaktadır. Ancak, bilateral amigdala lezyonu olan hastalarda bu ayırım gözlenmemektedir (Barrett vd., 2019).



Şekil 2.4. Öğrenme ve bellek ile ilişkili beyin bölümleri (<http-1>)

2.4. Öğrenme ve Belleğin Nörofizyolojik Temeli

Sinaptik bağlantılardaki kompleksliğin derecesi, belleğin kilit noktası niteliğindedir. İkincil haberci sistemler, öğrenme ve bellek için gerekli olan nöral döngüdeki değişimlere yardımcı olmaktadır. Plazma membranı kanallarındaki farklılıklar çoğunlukla öğrenme ve bellek ile ilişkilendirilmektedir. Kısa süreli işleyen bellekten uzun süreli belleğe geçiş, çoğunlukla protein sentezi ve gen aktivasyonunu içermektedir. Bazı koşullarda, uzun süreli öğrenilmiş reaksiyonlar korunabilmektedir. Örneğin, elektroşok uygulaması veya konküzyondan hemen önceki olaylar için bellek kaybı mevcuttur. Retrograd amnezi olarak adlandırılan bu durum, tetikleyici olaydan birkaç gün öncesine kadar uzanabilirken uzun süreli bellek herhangi bir fonksiyon kaybına uğramamaktadır (Barrett vd., 2019).

Omurgasız hayvanlar üzerinde yapılan mikroskopik incelemelerde, uzun süreli bellek izlerinin oluşumu esnasında birçok sinapta yapısal değişiklikler rapor edilmiştir. Presinaptik nöronda protein replikasyonunun deoksiribonükleik asit (DNA) stimülasyonunu bloke eden bir ilaç uygulandığında yapısal farklılıklar meydana gelememekte; dolayısıyla kalıcı bellek izleri oluşamamaktadır. Dolayısıyla; uzun süreli

belleğin gelişimi, sinirsel iletim hassasiyetini değiştirecek şekilde sinapsların fiziksel yeniden yapılandırılmasına bağlı olduğu görülmektedir.

Yapılan araştırmalar, aynı bilginin zihinde düzenli olarak yapılan tekrarının kısa süreli belleğin uzun süreli belleğe dönüşümünü hızlandığını ve pekiştirdiğini; dolayısıyla konsolidasyonu kolaylaştırdığını göstermektedir.

Uzun süreli hafızanın gelişimi esnasında birbirini takip eden önemli olaylar aşağıda belirtilmiştir (Hall ve Guyton, 2011).

- i. Transmitterin salgılanması için vezikül boşaltım alanlarındaki artış,
- ii. Serbest bırakılan transmitter veziküllerin sayısındaki artış,
- iii. Presinaptik terminallerin miktarında artış,
- iv. Daha kuvvetli sinyallerin iletilmesine yardımcı olan dentritik dikenlerin yapılarındaki konfigürasyonlar.

2.4.1. Nöromediyatör mekanizmaların öğrenme ve bellek üzerine katkısı

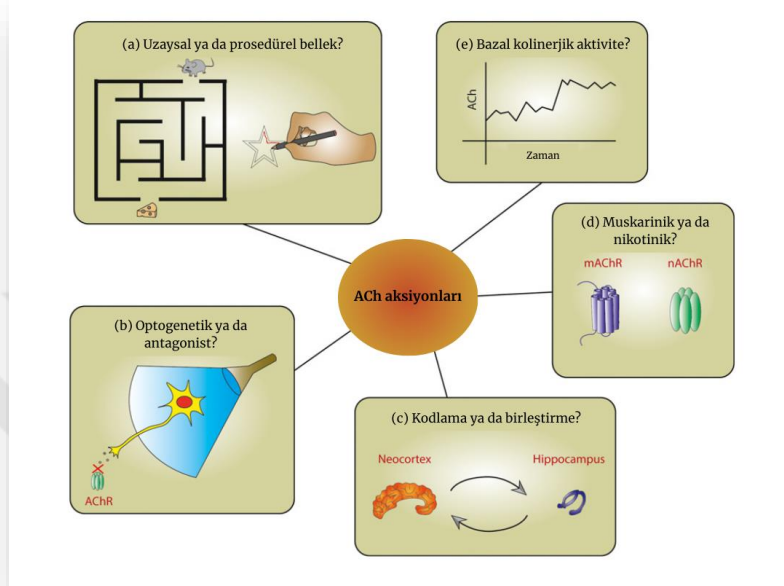
Öğrenme ve bellek üzerine önemli katkıları olduğu bilinen bazı nörotransmitter maddeler aşağıda belirtilmiştir.

2.4.1.1. Asetilkolin

Asetilkolin (ACh), nöromusküler yolak üzerinde görev alan önemli bir nörotransmitterdir. Keşfedildiği andan itibaren kognitif fonksiyonların önemli bir modülatörü olarak ilgi odağı olmuştur. Alzheimer hastalığı dahil olmak üzere demans vb. nörodejeneratif hastalıklardaki kolinerjik sistem üzerinde saptanan patolojik bulgular dikkat çekmektedir. Ek olarak bilişsel bozukluk yaşayan deneklerde, kolinerjik sistem atrofi göze çarpmaktadır (Teipel vd., 2014). Öte yandan gastrointestinal sistem rahatsızlıkları ve baş dönmesi için semptomatik olarak kullanılan antikolinerjik ilaçların demansı tetikleyebilmesi, kolinerjik sistemin öğrenme ve bellek üzerindeki rolüne işaret etmektedir (Gray vd., 2015).

ACh'nin, öğrenme ve bellek üzerindeki etkilerinin kompleks olmasının sebeplerinden biri (Şekil 2.5.); bellek fonksiyonlarındaki ACh modülasyonunun, yalnızca

belirli öğrenme türlerine (hipokampüse bağımlı öğrenme) selektif olmasıdır. Kolinerjik reseptör antagonistleri veya kolin taşıyıcı inhibitörler ile yapılan çalışmalar, kolinerjik reseptör aktivasyonunun epizodik ve uzamsal bellek için önemli olduğunu ancak prosedürel bellek için önemli olmadığını göstermektedir (von Linstow Roloff vd., 2007).



Şekil 2.5. Asetilkolin modülasyonunun bilişsel işlevlerdeki kompleksliği (Haam ve Yakel, 2017).

İkinci sebep ise ACh salınımını manipüle edebilecek çeşitli tekniklerin olmasıdır. Kolinerjik nöronlar genellikle γ -aminobutirik asit (GABA) ve glutamat gibi diğer nörotransmitterlerle birlikte salınabilmektedir (Haam ve Yakel, 2017).

Üçüncü sebep ise ACh'nin bellek üzerine her zaman fasilitatör etkiye sahip olmayıp etkisinin bellek oluşum basamaklarına bağlı olmasıdır. Yapılan çalışmalar, ACh'nin bellek kodlama ve birleştirme süreçleri esnasında, iki proses arasında geçiş yapabilen bir nöromodülatör olduğunu göstermektedir. ACh'nin, konsolidasyon sürecini inhibe ederken, bellek kodlamayı da desteklediği savunulmuştur. Hipokampüsteki ACh seviyeleri, bellek kodlama esnasında yüksek seviyelerdeyken; bellek pekiştirme esnasında düşük seviyelerde seyretmektedir. Bunlara ek olarak, muskarinik reseptörler SCP ile farmakolojik olarak bloke edildiğinde bellek kodlamasında disfonksiyon meydana gelirken uzun süreli bellekte herhangi bir hasar meydana gelmemektedir. SCP kullanımı, daha sonraları deneysel amnezi modeli indüklemek için yaygın olarak kullanılan bir ajan haline gelmiştir (Atri vd., 2004; Haam ve Yakel, 2017).

Dördüncü sebep ise farklı desensitizasyon spesifikliğine sahip çeşitli reseptör alt tiplerinden kaynaklanabilmesidir. Hipokampal CA₁ bölgesindeki ACh'nin, piramidal nöronlarda ve GABAerjik internöronlarda bulunan $\alpha 7$ veya $\alpha 7$ olmayan nikotinik ACh reseptörlerinin etkinleşmesi aracılığıyla Schaffer kollateral yolunu konsolide ettiği bilinmektedir. Ancak, Schaffer kollateral yolunun ACh tarafından inhibisyona uğratıldığını gösteren çalışmalar da literatürde yer bulmaktadır. Bu uyumsuzluk, ACh'nin sinaptik plastisite üzerindeki etkisinin zamanlamaya bağlı olmasıyla ilgilidir. Ayrıca, ACh'nin etkisi farklı şartlarda hangi kolinerjik reseptör alt tipinin aktif olduğuna bağlı olarak değişebilmektedir. Elektronörofizyolojik bir çalışma sonucunda, kolinerjik nöronların yüksek frekanslı uyarımının hipokampal internöronlarda depolarize edici bir reaksiyona sebep olabileceği; kolinerjik aktivasyonun düşük frekanslı uyarımının ise farklı ACh reseptör alt tiplerinin aktivasyonu aracılığıyla hiperpolarize edici bir cevaba yol açtığı belirtilmiştir.

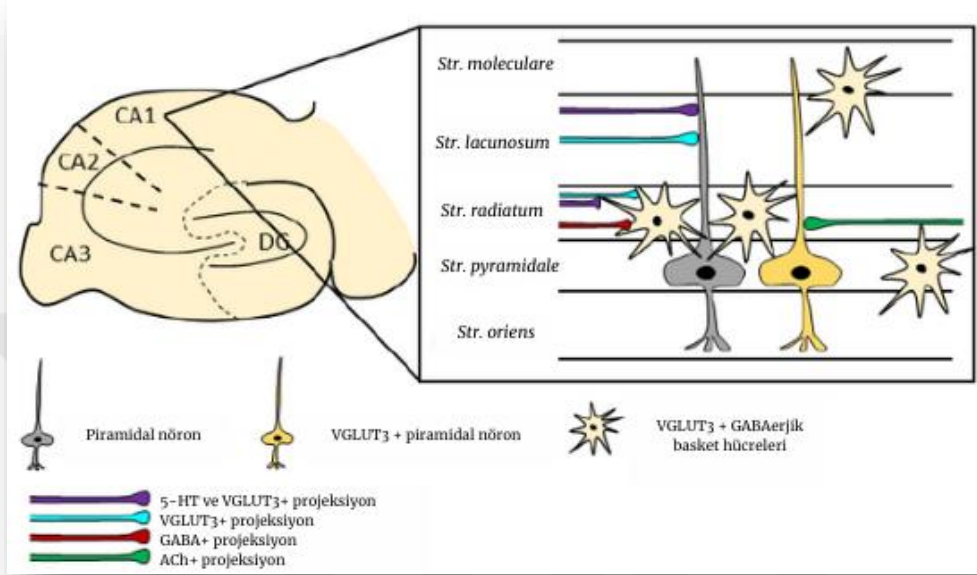
Son olarak, bellek fonksiyonlarının kolinerjik artışının bazal kolinerjik aktiviteye bağımlı olmasıdır. Daha düşük performansa sahip bireylerin, ACh seviyelerinde farmakolojik bir artışa yanıt olarak daha belirgin bilişsel gelişim gösterdiği; oysa daha yüksek temel bir performansa sahip bireylerin daha az seviyede belirgin etki gösterdiği bildirilmiştir (Kukolja vd., 2009; Haam ve Yakel, 2017).

2.4.1.2. Glutamat

Glutamat, SSS'de fazla miktarda bulunan eksitatör bir aminoasittir. Aynı zamanda, öğrenme ve bellek prosesine önemli katkıları bilinmektedir (Fazekas vd., 2022). Glutamaterjik sistem hem hızlı stimülasyon hem de sinaptik iletimin dereceli değişimiyle bağlantılıdır (Griego ve Galván, 2021). Glutamat, gelişimsel olarak nörogenez ve sinaptogenez esnasında rol oynamaktadır. Buna bağlı olarak eksikliğini takiben; meydana gelen nöronal dejenerasyonlar sonucunda oluşan Alzheimer ve Parkinson hastalığı ile bazı epileptik formların etiyolojisiyle ilişkili bulunmuştur (Rodríguez-Moreno ve Sihra, 2011).

Glutamat fonksiyonel olarak, iyonik ve metabotropik reseptör türlerine sahiptir. Bunlardan, α -amino-3-hidroksi-5-metilizoksazol-4 propiyonik asit (AMPA)/kainat ve NMDA reseptörleri, iyonotropik glutamat reseptörleri; G proteini kenetli reseptörleri (GPCR) ise metabotropik reseptörler olarak adlandırılmaktadır (Brunton vd., 2018).

Reseptör türleri kendi içerisinde karşılaştırıldığında, NMDA reseptörlerinin öğrenme ve bellek prosesleriyle direkt ilişkisi bulunurken; AMPA reseptörlerinin öğrenme ve bellek proseslerine olan katkısı daha kısıtlı ve dolaylı olarak literatüre geçmiştir (Riedel vd., 2003).



Şekil 2.6. Hipokampusün CA₁ bölgesindeki VGLUT3+ nöronlarının lokalizasyonu, VGLUT3: Veziküler glutamat taşıyıcı tip 3; 5-HT: serotonin; str: stratum (Fazekas vd., 2022).

VGLUT3'ler ise ana nörotransmitterler olarak tanımlanan diğer moleküllerle birlikte ifade edilebilmektedir. VGLUT3 tarafından manipüle edilen glutamat, diğer nörotransmitterlerin sekresyonunu da regüle edebilir. VGLUT3'ün, sensitif proseslere olan katkısının yanı sıra öğrenme ve bellek süreçlerine olan etkisi de göz önüne alınmalıdır. Şekil 2.6.'da yer alan, hipokampusün CA₁ bölgesindeki VGLUT3 nöronlarının ve aksonlarının morfolojik yapılandırılması görselleştirilmiştir. Görsel, aynı zamanda GABAerjik internöronların VGLUT3'ü eksprese etmesi ve hipokampusün işlevselliğine katkıda bulunmasına yönelik prosesler hakkında bakış açısı kazanılmasını sağlamaktadır (Fazekas vd., 2022).

2.4.1.3. Nitrik oksit

Nitrik oksit (NO), endojen bir sinyal molekülü olarak bilinen serbest radikal niteliğinde bir gazdır. NO, L-arjinin üzerinden üç türde (nöronal, endotelial,

indüklenebilir) ve nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ile lokal olarak sentezlenebilmektedir (Brunton vd., 2018).

Kemirgenler üzerinde yapılan çalışmalarda, NOS inhibitörlerinin sistemik ya da intrahipokampal uygulanması sonucunda öğrenme ve bellek üzerinde işlev bozukluğuna yol açtığı bildirilmiştir (Estall vd., 1993). Ayrıca noradrenalin ve dopamin sekresyonunun regülasyonuna etki eden NO, sinaptik iletimi ve bu maddelerin fonksiyonlarının transformasyonunu sağlamaktadır. Bu sebeple NO'nun öğrenme ve bellek üzerine olan dolaylı etkisinden söz edilmektedir (Savaş vd., 2002; Andreazza vd., 2008). Ek olarak, NO ve süperoksit üretimi arasındaki dengesizliğin bazı nörodejeneratif hastalıkları tetikleyebileceği ileri sürülmektedir (Purves, 2004).

2.4.1.4. GABA

GABA, SSS üzerinde ana inhibitör nörotransmitterdir. Yıllar boyunca yapılan çalışmalar sonucunda, öğrenme ve bellek prosesindeki katkıları bildirilmiştir (Heaney ve Kinney, 2016).

Hipokampüsteki yetersiz GABAerjik inputlar, dendrit başkalaşımına ve olgunlaşmamış nöronların uyumsal sorunlarına yol açabilmektedir. Bu durum, spesifik fonksiyonel beyin alanlarındaki lokal nöronların stimülasyonunu, inhibisyonunu ve hipokampal nöronların oluşumunu olumsuz olarak etkilemektedir. Şizofreni ve diğer nöropsikolojik bozuklukları tedavi etmede, GABA_A ve GABA_B reseptörlerinin eşlik ettiği sinaptik GABAerjik uyarımın farmakolojik modülasyonu, piramidal nöronal inhibisyonu eski haline getirerek, hipokampal nöronal sekresyonu normalize edebilmektedir.

Sonuç olarak: nöropsikolojik hastalıklardaki epizodik bellek ve çalışan bellek ile ilişkili nörobilişsel bozukluklar, GABAerjik modülasyon sayesinde rehabilite edilebilmektedir (Yang vd., 2023).

2.4.1.5. Dopamin

Motivasyon, öğrenme ve bellek için kritik bir modülatördür. Yavaş (tonik) dopamin değişikliklerinin motivasyonu, hızlı (fazik) dopamin dalgalanmalarının ise öğrenme için ödül mekanizmasıyla ilgili olduğu bildirilmiştir (Berke, 2018).

Substantia nigra üzerinden *striatum* üzerine çıkıntı yapan dopaminerjik nöronlar motor fonksiyonlar üzerine önemli katkı sağlarken; ventral tegmental bölgeden kaynaklanan, *nucleus accumbens*, hipokampus ve diğer kortikal yapılara çıkıntı yapan dopaminerjik nöronlar ise ödüllendirici öğrenmeyi regüle etmektedir.

Son yapılan araştırmalarda, dopaminin; öğrenmedeki fonksiyonlarının yanı sıra depolanmış bilgileri kontrol eden endojen kaynaklı aktif unutma mekanizması komponentlerinden biri olduğu ve birleştirilmiş bir belleğin silinmesine katkıda bulunduğu anlaşılmıştır. (Castillo Díaz vd., 2021).

2.4.1.6. Noradrenalin

Noradrenalin; uyanıklık, uyarılma, dikkat, motivasyon, ödül ve ayrıca öğrenme bellek modülasyonu dahil olmak üzere çeşitli durumları etkileyen bir nörotransmitterdir. (Prokopová, 2010).

Noradrenerjik nöronların, beyin sapında bulunan lateral tegmental alan ve *locus coeruleus*'ta bulunmakta olup hücre topluluklarından orijin alarak, birbirinden farklı aksonal yollar vasıtasıyla; korteks, hipokampus ve amigdalayı da kapsayan beyin lokalizasyonlarındaki varlıkları bilinmektedir (Kobayashi ve Yasoshima, 2001; Tully ve Bolshakov, 2010).

Seymour Kety tarafından öğrenmenin kuvvetlendirilmesi için noradrenalin aktivasyonunun gerekliliği hipotetiği; amigdala ve hipokampus gibi lokalizasyonlarda beta-adrenerjik agonistlerinin infüzyonunun çeşitli durumlarda bellek geliştirici etkisi üzerinden, deney hayvanları araştırmaları ile desteklenmiştir. Ek olarak strese olan maruziyetin, kısmen amigdaladaki NA düzeyini arttırarak bellek konsolidasyonunu arttırdığı ve insan katılımcılarla yapılan bir araştırma grubunda da çalışma sonrası yohimbin kullanımıyla birlikte noradrenerjik stimülasyonunun belleği olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir (Kety, 1972; Baidoo vd., 2020).

2.4.1.7. Serotonin

Serotonin, SSS'de yer alan stratejik bir nöromodülatör ve nörotransmitterdir. Reseptörleri aracılığıyla öğrenme ve bellek prosesine katkıda bulunan monoamin türüdür. Beyin sapında yer alan rafe nükleuslarındaki serotonerjik nöronlar tarafından sentezlenmektedir. Memeli türleri üzerinde yapılan incelemeler sonucunda; *substantia*

nigra, bazal ganglionlar ve hipokampus bölgelerinde yüksek seviyelerde serotonin bağlantısı olduğu bildirilmiştir (Afshar vd., 2023).

Hayvan modellemeleri üzerindeki araştırmalara göre, 5-HT₁₋₇ reseptörlerinin kognitif fonksiyonlar üzerinde çoklu etkileri olduğu gözlenmektedir. 5-HT_{1A} reseptörü belleğin obje tanıma için, 5-HT_{2C} ise belleğin korku-stres odaklı güçlendirilmesi için önemli rol oynamaktadır. 5-HT₆ reseptörünün inhibisyonu, belleği obje tanımada olumlu olarak etkilerken; 5-HT₇ etkinliği, otizm ve fragil-X sendromunda tavsiye edilen terapötik potansiyel ile uzamsal, kognitif ve bağlamsal belleği kuvvetlendirmektedir (Bazzari ve Parri, 2019; Afshar vd., 2023).

5-HT_{1D} reseptörünün etkinliği ise birçok beyin lokalizasyonunda asetilkolin, glutamat ve serotonin sekresyonundaki düşüş ile bağlantılı olmakla beraber, öğrenme ve belleği bazı yönleriyle zayıflatabilmektedir. Bu bilgiler ışığında serotonerjik mekanizmalardaki hasarlar; öğrenme ve bellek üzerindeki fonksiyonel süreci, diğer nörotransmitter düzeneklerin manipülasyonlarıyla birlikte bozabilmektedir (Adams vd., 2008; Afshar vd., 2023).

2.4.2. Sinaptik plastisitenin öğrenme ve bellek üzerine katkısı

Nöroplastisite, çeşitli çevresel uyaranlara bağlı olarak beyindeki nöronlar ve bu nöronların meydana getirdiği sinapslardaki adaptif yapısal ve fonksiyonel değişiklikleri içeren bir süreçtir (Yasui vd., 2005; Mateos-Aparicio ve Rodríguez-Moreno, 2019).

Presinaptik veya postsinaptik konumda gerçekleşen deşarjlarla birlikte sinaptik fonksiyonlarda kısa ve uzun vadeli değişiklikler meydana gelebilmektedir. Bu değişikliklerin öğrenme ve bellek türleri açısından büyük öneme sahip oldukları bilinmektedir.

Posttetanik potansiyalizasyonu, impulsa bağlı olarak gittikçe artan gelişmiş postsinaptik potansiyeller oluşturmaktadır. Presinaptik nörondaki ortaya çıkan tetanizan faktörler, postsinaptik potansiyelin güçlendirilmesini 60 saniye kadar sürdürebilmektedir. Tetanizan faktörler, kalsiyumun (Ca²⁺) presinaptik nöronda birikmesi sonucu; sitoplazmik Ca²⁺'nın seviyesini düşük tutan hücre içi reseptör bölgelerinin işgaline sebep olmaktadır (Barrett vd., 2019).

Habitüasyon, non-asosiyatif öğrenmenin bir örneğidir. Habitüasyon mekanizmasının, Ca^{2+} kanallarının moleküler düzeydeki duyu terminal membranlarında gerçekleşmekte olan kademeli kapanma ile bağlantısı ve ideal koşullarda hayatta kalabilmek için evrimsel kökenli bir davranım olduğu ileri sürülmüştür. Ayrıca tekrar eden uyarana karşı, refleksif tepkinin kademeli olarak azalması ile ayırt edilmektedir. (Hall ve Guyton, 2011; Bailey vd., 2015; Tan vd., 2022).

Sensitizasyon ile habitüasyon bir anlamda karşıt mekanizmalardır. Sensitizasyon, zararlı bir uyarana oluşan kombinasyonlar sonucu postsinaptik tepkilerin uzun süreli oluşumunu ifade etmektedir. Sensitizasyonun kısa süreli uzaması, artan sıklık adenosin monofosfat (sAMP) sentezine yol açan adenilat siklazdaki Ca^{2+} aracılı değişikliklere bağlanmaktadır ve güçlü ardışık uyarana karşı artan reaktivite ile karakterizedir (Duerr ve Quinn, 1982; Barrett vd., 2019).

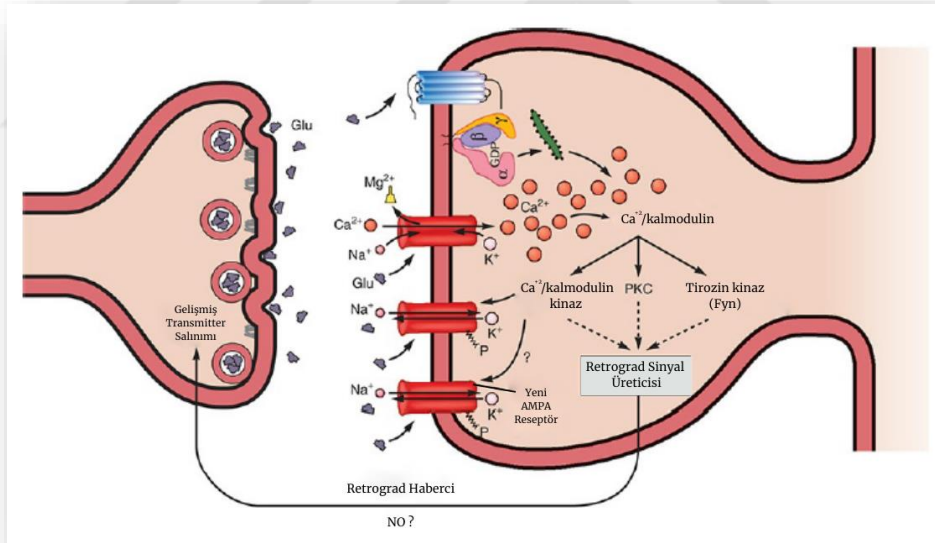
2.4.2.1. Uzun süreli potansiyalizasyon

NMDA reseptör kanalının açılmasına eşlik eden hücre içi Ca^{2+} 'daki artış “uzun süreli potansiyalizasyon (LTP)” olarak adlandırılmaktadır. Sinaptik plastisitenin ana türlerinden biri olan; saatlerce hatta günlerce süren sinaptik güçteki uzun süreli bir artışla sonuçlanan bu proses, aynı zamanda öğrenme bellek sürecindeki önemli bir hücresel mekanizma olarak kabul edilmektedir. (Katzung, 2017). Presinaptik ve postsinaptik nöronların yanı sıra bu nöronların bağlantılarının gelişmesini sağlayan LTP, ayrıca protein sentezini de kapsamaktadır. (Bliss ve Gardner-Medwin, 1973; Lauri vd., 2007;; Barrett vd., 2019).

LTP, SSS'nin pek çok kompartmanında gerçekleşebilmektedir. Ancak, hipokampüsteki CA alanları içerisinde; CA₃'teki bir piramidal hücreyle CA₁ bölgesindeki bir piramidal hücre arasındaki Schaffer kollateralleri aracılığıyla oluşan bağlantılar dikkat çekmektedir. SSS'deki LTP uyarımı, oluşumu ve sürekliliği için birden fazla moleküler mekanizmanın görev aldığı rapor edilmektedir (Kumar, 2011; Barrett vd., 2019).

Schaffer kollateralleri, LTP mekanizmasının temelini özetlemektedir. Dinlenme zar potansiyelinde, presinaptik bir nörondan glutamat salınımı; postsinaptik bir nöron üzerindeki hem NMDA hem de AMPA reseptörlerine bağlanmaktadır. Sodyum (Na^+) ve

potasyum (K^+)'un yalnızca AMPA reseptörleri üzerinden geçebilmesinin sebebi: NMDA reseptörlerindeki magnezyum (Mg^{2+})'un varlığı ve blokajıdır. Bununla birlikte, presinaptik nöronun yüksek frekanslı tetanik impulsuna cevap olarak oluşan zar depolarizasyonu, Mg^{2+} 'yi NMDA reseptörlerinden geçirmek için elverişlidir ve Ca^{2+} 'nın postsinaptik nörona geçmesini sağlamaktadır. Bu elektriksel aktivite; LTP'yi uyaran Ca^{2+} /kalmodulin kinaz, protein kinaz C ve tirozin kinaz aktivasyonuna sebep olmaktadır. Ca^{2+} /kalmodulin kinaz, AMPA reseptörlerinin fosforilasyonunu sağlar ve iletkenliklerini artırarak bu reseptörlerin sitoplazmik depolama bölgelerinden, sinaptik hücre membranına transportasyonunu arttırmaktadır. LTP'nin uyarılması, postsinaptik nöron aracılığıyla salınan kimyasal bir işaret olan NO sekresyonunu tetiklemektedir. Gerçekleşen bu elektrokimyasal komponentlerin sekansları sonucunda, salgılanan kimyasal madde; retrograd olarak presinaptik nörona iletilmekte ve glutamatin kuantal sekresyonunda uzun süreli bir yükselme meydana getirmektedir (Barrett vd., 2019). LTP indüklemesi esnasında sinaptik seviyede gelişen olaylar Şekil 2.7.'de gösterilmiştir



Şekil 2.7. Hipokampüsteki Schaffer kollaterallerinde LTP üretimi (Barrett vd., 2019).

2.4.2.2. Uzun süreli depresyon

LTP'ye birçok yönden benzeyen “uzun süreli depresyon (LTD)”, sinaptik güçteki azalma ile karakterizedir. Presinaptik nöronların daha geç indüklenmesiyle üretilmekte ve hücre içi Ca^{2+} 'da LTP'de olduğundan daha az bir yükselişle ilişkilendirilmektedir

(Barrett vd., 2019). LTD mekanizmasında görevli ana nörotransmitterin glutamat olduğu; L-glutamatın NMDA, AMPA ve metabotropik glutamat reseptörleri üzerinden işlev gördüğü bildirilmiştir (Massey ve Bashir, 2007).

LTD'nin hipokampusle ilgili olarak, bellek türlerine ait verilerin kodlanma prosesinde görev aldığı ve hipokampal LTD'nin kullanılmayan bellek izlerini ortadan kaldırmadaki kritik rolü rapor edilmiştir (Malenka ve Bear, 2004; Nicholls vd., 2008; Malleret vd., 2010).

LTD, LTP'nin sebep olduğu sinaptik aktivasyondan faydalanabilmek için özgül sinapslarda, spesifik zayıflatıcı reaksiyon gösteren birkaç prostenen biridir. Sinaptik gücün aralıksız yükselişi sonucunda, maksimum aktivasyon seviyesine ulaşan sinapsların yeni verileri kodlayamayacak olması; sözü edilen sinapslardaki zayıflatıcı reaksiyonun yaşamsal önemini gözler önüne sermektedir (Purves, 2004).

Son yıllarda yapılan araştırmalar sonucunda; sinaptik plastisitenin, LTP ve LTD beraberinde sinapslar üzerinde meydana gelen yapısal değişiklikler ile de bağlantılı olduğu vurgulanmaktadır. Yeni ve fonksiyonel dentritik çıkıntılar (spine) ya da mevcut uzantıların gelişip büyümesi gibi farklılıklar; kognitif fonksiyonlar ve bu fonksiyonların gelişiminde kritik rol oynayan sinaptik plastisite açısından önem taşımaktadır (Malenka ve Bear, 2004).

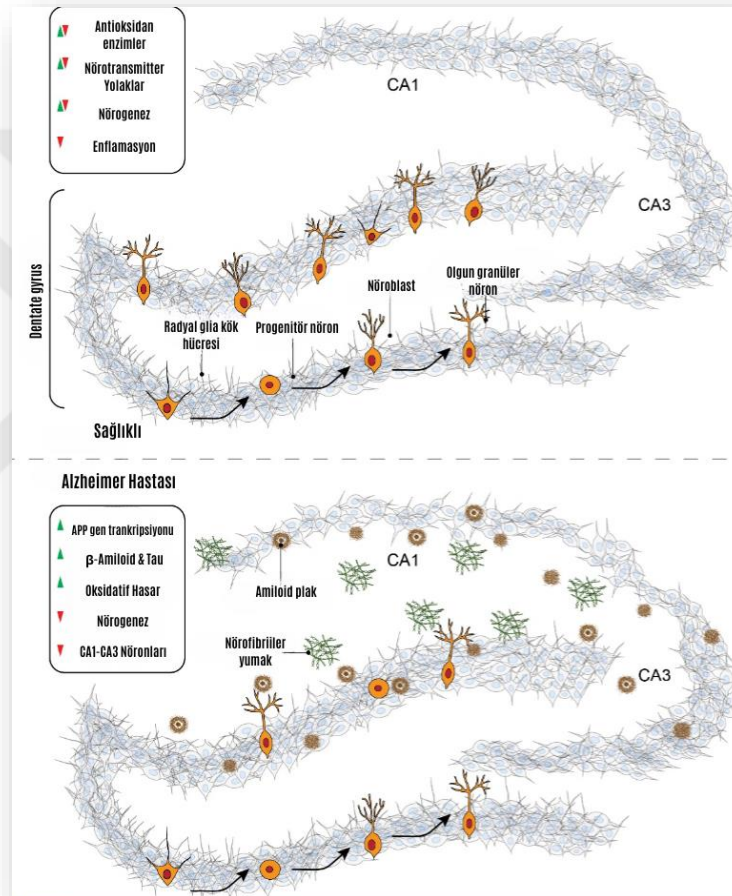
2.4.3. Nörogenezin öğrenme ve bellek üzerine katkısı

Doğum sonrası beyin hücrelerinin sayısal olarak artmadığına dair geleneksel görüşün aksine yaşam boyunca en az iki alanda (*bulbus olfactorius* ve *hippocampus*) kök hücrelerinden yeni nöronlar oluşmaktadır. Nörogenez adı verilen bu süreçle birlikte; özellikle DG üzerindeki granüler hücrelerin tecrübeye bağlı olarak büyümesi ve gelişmesi, nörogenezin öğrenme ve bellek üzerindeki önemini göstermektedir (Barrett vd., 2019).

Yaşlanmayla birlikte nörogenezdeki belirgin zayıflama: proliferasyon hızı, toplam progenitör hücre sayısı ve nöroblast hücre sayısındaki düşüş ile açıklanmaktadır. Nörogenezdeki bu azalış; hipokampal işlevi tehlikeye sokabileceği gibi öğrenme ve belleği, özellikle yaşlılarda bozabileceği ihtimalini ortaya koymaktadır. Yapılan bir çalışmada, DG'nin granül hücreleri üzerinde oluşan sinaptik etkileşimlerin yoğunluğunun

yaşa bağılı olarak azaldığı gözlemlenirken; CA₁ ve CA₃ üzerindeki piramidal nöronların dentritik kompleksliği ve spine yoğunluğunda bir düşüş meydana gelmediği bildirilmiştir (Lazarov ve Hollands, 2016).

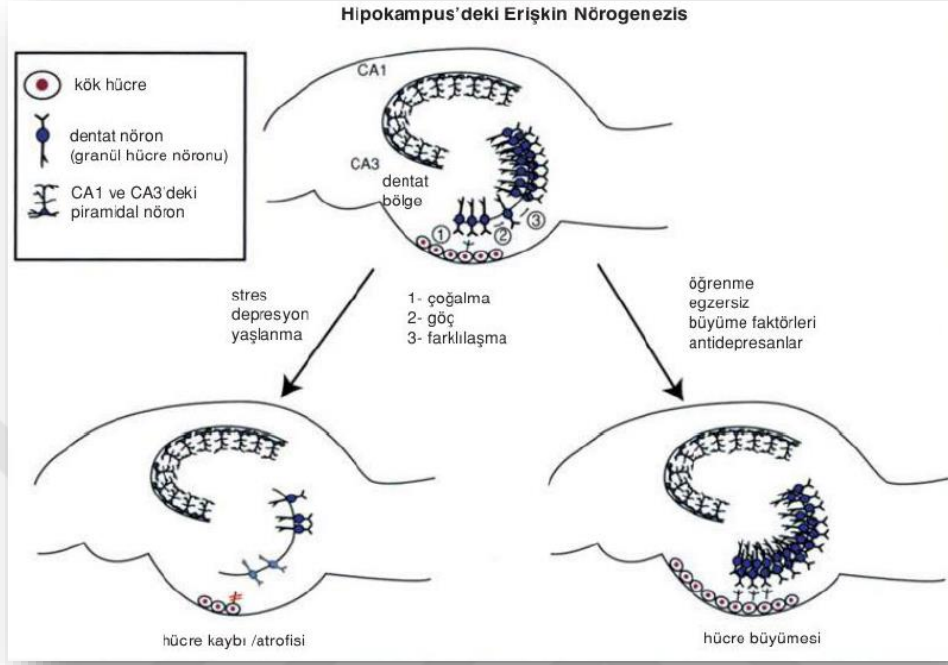
Deneyssel Alzheimer modeli oluşturulmuş farelerde ise nörogenezin bozulduğu rapor edilmekle birlikte; amiloid plak birikimi, hücre içi nörofibriller yumak oluşumu ve hipokampusun DG bölgesindeki nöronların kayıpları (Şekil 2.8.) başta olmak üzere, çeşitli patolojik olaylar görülmüştür (Essa vd., 2022).



Şekil 2.8. Sağlıklı insanda ve Alzheimer hastasında hipokampus morfolojisi (Essa vd., 2022).

Ayrıca, kemirgen türlerinde, hipokampal nörogenez düzeylerinin yaşamları boyunca durağan olmadıkları bilinmektedir. Çevresel zenginleştirme ve öğrenme, nörogenezi arttırıcı etkilerde bulunurken; stres ve sosyal izolasyon, nörogenezi baskılayabilmektedir (Gould vd., 1997; Gould vd., 1999; van Praag vd., 2000; Kreisel

vd., 2014). Bununla ilişkili olarak, Şekil 2.9.'da çeşitli uyarıların, nörojenizle ilişkisine ait bir şema sunulmuştur.



Şekil 2.9. Erişkin hipokampusündeki nörojeniz oluşumu (Stahl, 2012).

2.4.4. Nörotrofik faktörlerin öğrenme ve bellek üzerine katkısı

Nöronların hayatta kalabilmesi, büyümesi ve gelişebilmesi için gerekli olan nörotrofinlerin bazıları, nöronların uyardığı kasların veya diğer yapıların ürünleridir. Ancak büyük bir çoğunluğu, SSS üzerindeki astrositler tarafından sentezlenmektedir. Nöronların uç reseptörlerine bağlanan bu proteinler daha sonraları hayatta kalma, nöronal büyüme ve gelişim ile ilişkili protein sentezini indükledikleri nöronal hücre gövdesine retrograd taşıma ile taşınmaktadırlar. Diğer nörotrofinler ise somada üretilmekte ve postsinaptik nöronun bütünlüğünü korudukları sinir ucuna taşınmaktadırlar.

Tanımlanan ilk nörotrofin olan sinir büyüme faktörü (NGF), sempatik nöronlar ile bazı duyuşal nöronların büyümesi ve bakımı için gerekli olmakla birlikte 2 adet α , 2 adet β ve 2 adet γ birimden oluşmaktadır. NGF'nin, bazal ön beyin ve striatumdaki kolinerjik nöronların büyümesinden ve korunmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir. NGF

aracılığıyla nöronların canlılığını sürdürmesi, hücre metabolizmasının teşvik edilmesinden çok apoptozun baskılanmasından kaynaklanmaktadır.

NGF'ye ek olarak; beyin kökenli nörotrofik faktör (BDNF), nörotrofin-3 (NT-3) ve NT-4/5 dahil olmak üzere başka nörotrofin türleri de bildirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda; BDNF eksikliği olan farelerde periferik duyu nöronlarında azalma, vestibüler gangliyonlarda ciddi bir düzeyde dejenerasyon ve LTP düzeyindeki belirgin azalış göze çarpmaktadır (Barrett vd., 2019).

Nöronların gelişimi ve değişimine olan katkılarının yanı sıra; BDNF'nin, nöronları çeşitli toksinlere karşı savunduğu, dendritlerin gelişimine katkı sağladığı, nöronal süreklilik ve plastisite üzerinde regülatör etki gösterdiği de bilinmektedir (Kotan vd., 2009).

2.4.5. Glia hücrelerinin öğrenme ve bellek üzerine katkısı

Keşfedildikten sonraki yıllar boyunca bağ doku olarak sınıflandırılmış olan nöroglia hücreleri (Şekil 2.10.), nöronlarla beraber SSS içerisindeki iletişimde önemli katkılarıyla bilinmektedir. Çoğu nöronun aksine, glia hücreleri olgunlaşma proseslerinde hücre bölünmesini sürdürmekte ve çoğalma yetenekleri özellikle beyin hasarından (felç gibi) sonra fark edilmektedir. Glia hücrelerinin işlevsel olarak nöronlardan başlıca farkları; glianın destekleyici fonksiyonlarının sinaptik bağlantıları belirleme ve sinyal iletimine yardımcı olmasına rağmen, sinaptik etkileşime ve elektriksel sinyalizasyona direkt olarak katılmamasıdır (Purves, 2004; Barrett vd., 2019).

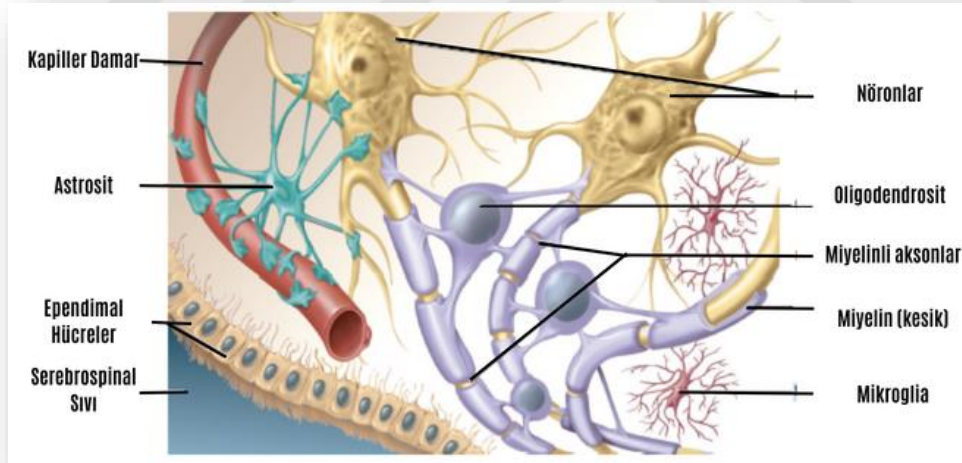
Boyutlarına göre mikroglia ve makroglia olarak sınıflandırılmaktadırlar. Mikroglialar, bağışıklık sisteminin önemli bir parçasıdır. Doku makrofajlarına benzeyen, yaralanma, enfeksiyon, Parkinson ve Alzheimer hastalığı gibi patolojik oluşumlardan kaynaklanan kalıntıları temizleyen hücrelerdir. Mikroglialar; sinir sisteminin dışındaki makrofajlardan kaynaklanmakta, fizyolojik ve embriyolojik olarak diğer nöral hücre tipleriyle ilgileri bulunmamaktadır. Makroglialar ise periferik sinir sisteminde bulunan miyelinli Schwann hücrelerinin SSS'de eşdeğeri olan astrositler ve oligodendrositlerden oluşmaktadır.

Nöronlarla yakın etkileşim içerisinde olan astrositler, sinaptik terminali sarmakta ve kılcal damarlardan gelen endotelial hücrelerle kompleks bağlantılar kurmaktadır.

Hipokampüsün DG bölgesinde, birçok omurgalıda yaşam boyu yeni nöronların oluşumuna katkıda bulunmaktadır (Kurosinski ve Götz, 2002; Barrett vd., 2019).

Yapılan çalışmalar glial hücrelerin; sitoskeletal filamentlerin oluşumu yoluyla öğrenme ve bellek ile ilişkili sinyalleri işlediklerini, sinaptik aktiviteyi regüle ettiklerini ve bellek oluşum mekanizmalarını kontrol edebildiklerini göstermektedir (Kurosinski ve Götz, 2002; Konar vd., 2011).

Oligodendrositler; miyelinasyonu, nöronal aktivitedeki ani yükseliş zamanlamasını ve sekresyonunu etkileyerek iletim hızını artırabilmektedir. Astrositler, sinaptik iletimin regülasyonunda rol oynamaktadırlar. Mikroglialar ise nöronal ağları değiştirerek aktiviteye bağlı olarak sinaptik bağlantıları inhibe edebilmektedir. Yapılan çalışmaların ışığında; glial hücrelerin, öğrenme ve bellek proseslerinde çeşitli mekanizmalar üzerinden etkili olabilecek biyolojik fonksiyonlara sahip oldukları söylenebilmektedir (Fields vd., 2014).



Şekil 2.10. SSS'de glia hücreleri (Widmaier vd., 2019).

2.5. Deneysel Amnezi Modelleri

Amnezi, anıları hatırlama ve oluşturma konusunda yaşanan patolojik yetersizlik olarak tanımlanabilir (Purves, 2004). Beyindeki lezyonlara (nörojenik amnezi) veya psikolojik faktörlere (psikojenik amnezi) bağlı oluşabilmektedir. Hastalık (organik veya psikojenik) başlangıcından sonraki dönemle ilgili olduğunda epizodik belleğin kodlamasında, tutulmasında veya geri alınmasındaki bozulma anterograd amnezi olarak tanımlanmaktadır. Hastalığın başlangıcından önceki zaman dilimi söz konusu olduğunda ise hasar görmüş otobiyografik hafıza retrograd amnezi ile ilişkilendirilmektedir. Amnezi; belleğe erişme sıkıntısı ve konfabulasyonlarla karakterizedir. Hastalar hem hatırlama hem tanıma sürecinde sıkıntı yaşamakta ve bazen bu bellek eksikliklerinin farkına bile varmamaktadırlar (Cubelli ve Della Sala, 2021).

Öğrenme ve belleğin çalışma mekanizmasının nörolojik ve fizyolojik açılarından anlaşılması, amneziye karşı terapötik etki potansiyeli bulunan ilaçların deneysel olarak araştırılması ve nörotoksik kimyasalların etkilerinin test edilmesinde, deney hayvanı modelleri büyük katkı sağlamaktadır. Benzeri alandaki araştırmalara yönelik en sık kullanılan prosedür, kognitif bozuklukların farmakolojik ajanlar ile oluşturulduğu modellerdir. Kullanılan bu farmakolojik modeller; yaşlanma ile bağlantılı demans olgularının, Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi kognitif bozukluklara sebebiyet veren patolojilerin tedavisinde kullanılabilecek potansiyel nootropik ajanların etkilerini ve mekanizmalarının araştırılmasında kritik rol oynamaktadır (Levin ve Buccafusco, 2006).

Kolinerjik mekanizmanın, kognitif fonksiyonlar için kritik rolü anlaşıldıktan sonra hayvan modellerinde kognitif disfonksiyonu indüklemek için seçici olmayan muskarinik reseptör antagonisti “SCP” kullanımı yaygınlaşmıştır (Pepeu ve Spignoli, 1989; Terry Jr vd., 1999). SCP; beyin üzerindeki muskarinik reseptör yolları, apoptoz, hücre iskeleti rekonstrüksiyonu ve hücre diferansiyasyonu gibi geniş bir gen spektrumunun ekspresyonunu etkileyerek kısa süreli belleği bozmaktadır. Özellikle kemirgen modellerinde amneziyi indüklemesi için kullanılan SCP; moleküler, biyokimyasal, davranışsal değişiklikleri kavramak ve bellek bozukluğunun terapötik hedeflerinin tanımlanmasında önemli katkı sağlamaktadır (Konar vd., 2011).

Bunlara ek olarak, SCP ile indüklenmiş deneysel amnezi modelleri; pasif sakınma (Ogura vd., 2000; Moosavi vd., 2018), Morris su labirenti (Buhot vd., 2003; Ucel vd.,

2020) ve radyal kollu labirent (Barak ve Weiner, 2011) gibi öğrenme ve bellek testleriyle birlikte kombine olarak kullanılmaya başlanmıştır.

SCP'nin yanı sıra deneysel amnezi modeli oluşturmak için atropin (Giordano ve Prado-Alcalá, 1986), triheksifenidil, biperiden (Kimura vd., 1999), ve pirenzepin (Svoboda vd., 2017) gibi başka muskarinik reseptör antagonistlerinin de kullanılabileceği rapor edilmiştir.

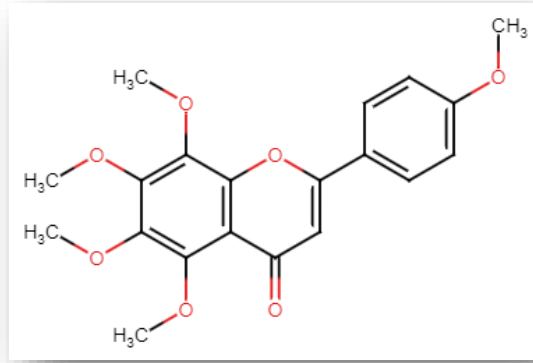
Ayrıca, rodentlerde alkolle ilişkili nörolojik bozuklukları modellemek için üç etiyolojik protokol (kronik etanol tüketimi, kronik aralıklı etanol tüketimi ve piritiamin kaynaklı tiamin yoksunluğu) sıklıkla kullanılmaktadır. Kognitif disfonksiyonun seviyesi, değişken derecelerdeki etanol maruziyetine ve tiamin yoksunluğunun düzeyine bağlıdır (Vetreno vd., 2011).

Son olarak, benzodiazepin türevleriyle oluşturulmuş kognitif disfonksiyonlar da literatürde yer almaktadır (Gamzu, 1988).

2.6. Tangeretin

Son yıllarda; nörodejeneratif hastalıklar, *diabetes mellitus* ve kanser gibi olguların önüne geçilmesi ve terapisi için çok sayıda sentetik ilaç geliştirilmiştir. Aynı zamanda bu ilaçların yan etki ve düşük farmakolojik aktiviteleri dahil olmak üzere türlü dezavantajları mevcuttur. Bilim insanları, bu problemlerin çözümü olabilecek etki gücü yüksek farmakolojik aktiviteleri ve düşük yan etki profilleri sebebiyle bitkisel doğal ürünlere odaklanmışlardır (Ashrafizadeh vd., 2020).

Flavonoidler, meyvelerde ve sebzelerde bulunan doğal olarak oluşan bileşikler olup bir dizi farmakolojik-terapötik etki göstermektedir. TNG (Şekil 2.11.) de, narenciye kabuklarında yüksek miktarda bulunan; nöroprotektif, renoprotektif, antidiyabetik, hepatoprotektif, immünomodülatör, ve melanogenez modülasyonu üzerinde etkilere sahip önemli bir polimetoksiflavondur (Ashrafizadeh vd., 2020; Bao vd., 2022).



Şekil 2.11. Tangeretin'in kimyasal yapısı [5,6,7,8-tetrametoksi-2-(4-metoksifenil)-4H-1-benzopiran-4-on]

TNG'nin farmakokinetik profilinin aydınlatılmasına yönelik gerçekleştirilen bir çalışmada, oral yolla 50 mg/kg TNG uygulaması sonucu ölçülen bazı değerler Tablo 2.1.'de sunulmaktadır. Bunun yanı sıra, demetilasyona uğrayan ve sülfat-glukuronat konjugatları halinde elimine olabilen TNG'nin %92'sinin metabolitlerine parçalandığı bildirilmiştir (Hung vd., 2018).

Tablo 2.1. Tangeretin'in farmakokinetik profili, C_{max} : Maksimum konsantrasyon, T_{max} : maksimum kan konsantrasyonuna ulaşma süresi, $t_{1/2}$: Yarılanma ömrü

Farmakokinetik Parametreler	Sayısal Değerler
C_{max}	$0.87 \pm 0.33 \mu\text{g/mL}$
T_{max}	$340.00 \pm 48.99 \text{ dk}$
$t_{1/2}$	$342.43 \pm 71.27 \text{ dk}$
Mutlak biyoyararlanım	%27,11

Çoğunlukla ilaç metabolizmasından sorumlu enzimlerin (sitokrom P450, CYP3A4, CYP1A2 gibi) substratları ile TNG'nin gıda-ilaç etkileşimi açısından incelenmesi sonucunda; TNG'nin CYP3A4 indüksiyonuna sebep olduğu bildirilmiştir. Bu sebeple yeterli preklinik çalışmalar yapılana kadar TNG ile CYP3A ve/veya CYP1A substratları alan hastaların olası etkileşimlere karşı dikkatli olması gerekmektedir (Weiss vd., 2020).

İmmünomodülatör etkinlik ve metabolitik fonksiyonların gerçekleştirilmesi gibi bazı önemli rolleri olan böbreğin homeostazını sağlama ve onu toksik ajanlara karşı

korumada TNG büyük potansiyel göstermektedir. Yapılan çalışmalarda; TNG'nin serum kreatinin, kan üre nitrojeni, renal ve üriner tübüler hücre tahribatı belirteçleriyle birlikte NO ve interlökin (IL) gibi inflamatuvar sitokinleri de azaltarak böbrek disfonksiyonunu önemli ölçüde hafiflettiği belirlenmiştir (Ashrafizadeh vd., 2020).

TNG aynı zamanda, mitokondriyal disfonksiyon ile mesane kanseri hücrelerinin canlılığı ve proliferasyonu üzerinde inhibitör etkinlik göstermiştir. TNG'nin, insan meme kanseri hücrelerinin canlılığı üzerinde G1 faz blokasyonu ile inhibe edici etkisi, antitümoral profilinin varlığına işaret etmektedir.

Streptozosin kaynaklı apoptoza karşı, TNG'nin protektif etkisi üzerine yapılan çalışmalarda; TNG uygulamasının apoptozu, Bax ekspresyonunu, insülin sekresyon disfonksiyonu ve reaktif oksijen türlerin düzeyini azaltıcı etkileri rapor edilmiştir (Ashrafizadeh vd., 2020).

Karaciğer hücrelerindeki oksidatif hasara karşı TNG uygulamasının iyileştirici etkisinin yanı sıra, glutatyon seviyelerinde artışa sebep olduğu gözlenmiştir. TNG'nin lipid peroksidasyon artışını, histopatolojik yapısal hasarını ve inflamatuvar yanıtların seviyesini düşürdüğü bildirilmiştir. Ayrıca, TNG'nin antioksidan ve antiinflamatuvar aktivitesinde Nrf-2 sinyal yolağı üzerinden yaptığı regülasyonların önem taşıdığı dikkati çekmektedir (Ashrafizadeh vd., 2020).

Melanogenezi ve takiben cilt pigmentasyonunu etkileyebilecek olan 3,3',4',5,6,7,8-hepatometoksiflavon, nobiletin ve TNG kombinasyonu üzerinde yapılan çalışmalar sonucu; kullanılan kombinasyonunun hücre içi asidik ortam oluşturmamasının yanı sıra lizozomlardaki tirozinazı parçalayarak, insan melanom hücrelerinde melanogenezi etkili bir şekilde baskıladığı bildirilmiştir (Yoon vd., 2015; Yoshizaki vd., 2017).

Farelerdeki astım modeli üzerine yapılan çalışmalarda, TNG'nin bronkoalveoler lavaj sıvısındaki; ovalbümin, spesifik İmmünoglobulin E düzeyi ve sitokin kitlesinde inflamatuvar hücre infiltrasyonunu azaltarak antiastmatik etki gösterdiği rapor edilmektedir (Mohrherr vd., 2019; Xu vd., 2019).

TNG'nin hipertrofik yağ dokusu hücreleri ve makrofajlarda glukoz tüketimi üzerindeki etkisine ilişkin araştırma sonuçları, TNG'nin NO seviyesini düşürerek interlökin-6 (IL-6), interlökin-1 beta (IL-1 β), tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) üzerinde azaltıcı etkisiyle insülin direncini ve glukoz tüketimini iyileştirdiğini göstermektedir (Ashrafizadeh vd., 2020).

Antioksidan ve antiinflamatuvar profili bilinen doğal kaynaklı bileşikler, bir dizi nörodejeneratif bozuklukluk tedavisinde de kullanılabilmektedir. Bu kapsamda TNG'nin oksijen-glukoz yoksunluğunun sebep olduğu hasara karşı nöroprotektif etkisi incelendiğinde, insan beynindeki mikrovasküler endotel hücrelerinin canlılığını ve süperoksit dismutaz düzeylerini yükselttiği, reaktif oksijen türleri ve 3,4-metilenedioksi-N-metilamfetamin seviyelerini azalttığı görülmüştür. TNG'nin bu koruyucu etkileri, c-Jun N-terminal kinaz yolağı ile regüle ettiği rapor edilmiştir (Ashrafizadeh vd., 2020).

Travma sonrası stres bozukluğu modeli oluşturulmuş farelerde yapılan bir araştırmada 14 gün boyunca 100 mg/kg TNG uygulaması sonrasında TNG'nin; davranışsal bozukluk ve bellek bozukluklarını iyileştirdiği, hipokampus ve amigdala nörokimyasal anomalileri düzelttiği; stres kaynaklı azalmış olan dopamin ve 5-HT seviyelerini arttırdığı belirlenmiştir. TNG'nin bu etkilerinin, kısmen tirozin hidroksilaz ve triptofan hidroksilaz-1'in ekspresyonundan sorumlu hipokampal genlerin indüksiyonuyla ilişkilendirilebileceği bildirilmiştir (Lee vd., 2018).

1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin aracılıklı Parkinson hastalığı oluşturulan sıçanlarda TNG'nin, nöroinflamasyonu inhibe edici etkisi incelendiği bir çalışmada, TNG'nin: 23 gün boyunca 50, 100 ve 200 mg/kg'lık dozlarda uygulanmasını takiben dopaminerjik dejenerasyonu, hipokampal nöronal kaybını ve IL-1 β , IL-6, IL-2 gibi inflamatuvar sitokin seviyelerini azalttığı; motor disfonksiyon ve nörobilişsel bozukluklar üzerinde ise kayda değer terapötik etki gösterdiği gözlenmiştir. TNG'nin bu terapötik etkileri; TNF- α , siklooksijenaz-2 ve iNOS sinyal yollarının ekspresyonunu inhibe ederek sağladığı bildirilmiştir (Yang vd., 2017).

Parkinson hastalığı üzerindeki etkileri açısından TNG'nin değerlendirildiği bir diğer araştırmada, antioksidan özellikli TNG kullanımı ile hastalığın progresif özelliğinin baskılanması amaçlanmıştır. Parkinson hastalık modeli oluşturulmuş sineklere 24 gün boyunca TNG içerikli diyetler 5, 10 ve 20 μ M'lik dozlarda uygulandığında, TNG'nin kognitif bozuklukları önleyici etkisi olduğu saptanmıştır (Fatima vd., 2019).

APP^{swe}/PSEN1^{dE9} transgenik farelerde günlük 100 mg/kg TNG uygulamasının demans üzerine etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada, bu flavonoidin davranışsal testlerde farelerin kognitif bozukluklarını hafiflettiği görülmüştür. Bu etkiler, TNG sonrası sinaptik hasar ve β -amiloid birikimindeki azalış ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca

TNG'nin β -amiloid oluşum prosesinde kritik role sahip β -sekretaz'a karşı gl inhibitor aktiviteye sahip olduğu ileri sürülmüştür (Bao vd., 2022).

TNG'nin nöronal apoptoza karşı koruyucu etkileri de yapılan araştırmalar sonucunda rapor edilmiştir (Ashrafizadeh vd., 2020).

Bu bilgilerin ışığında, bu tez çalışmasında, kognitif fonksiyonları iyileştirici potansiyeli olan TNG'nin hipokampüsteki nöronal morfoloji, glial morfoloji ve immünoreaktivite değişiklikleri üzerine olası etkilerinin araştırılması tasarlanmıştır.



3. GEREÇLER

3.1. Deney Hayvanları

Bu tez çalışması için, Anadolu Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Birimi'nden 300-350 g ağırlığında, aynı yaşta, erkek Sprague-Dawley türü sıçanlar temin edilmiştir. Deney hayvanları; 12 saat aydınlık 12 saat karanlık döngüsünde, $24\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıktaki düzenli ve iyi havalandırılan odalarda bulundurulmuş, her hayvanın yem ve suya rekabetsiz bir şekilde ulaşımı sağlanmıştır. Deney hayvanları, standart hayvan yemi ile beslenmiştir. Anadolu Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu tarafından çalışmanın deneysel protokolü onaylanmıştır.

3.2. Kullanılan Kimyasal Madde ve İlaçlar

Tangeretin (TNG)	(Sigma, St. Louis, MO, ABD)
Skopolamin hidrobromür (SCP)	(Sigma, St. Louis, MO, ABD)
Anti-GFAP (glial fibriler asidik protein) antibody Ab-6 [EP672Y]	(Thermo Scientific, MA, ABD)
Anti-NeuN (nöronal nükleer protein) antibody [EPR12763]	(Abcam, Cambridge, Birleşik Krallık)
UltrAB diluent (antijen seyreltici)	(Thermo Scientific, MA, ABD)
UltraVision quanto detection system HRP	(Thermo Scientific, MA, ABD)
DAB kromojen (3,3'-diaminobenzidin)	(Thermo Scientific, MA, ABD)
Krezil viyole (ab246816)	(Abcam, Cambridge, Birleşik Krallık)
Ketamin (Alfamine® %10 Enjeksiyonluk Çözelti)	(Alfasan International B.V., Woerden, Hollanda)
Ksilazin (Alfazyne® %2 çözelti)	(Alfasan International B.V., Woerden, Hollanda)
Serum fizyolojik (SF)	(Osel, İstanbul, Türkiye)
Sodyum karboksimetil selüloz	(Sigma, St. Louis, MO, ABD)
Tween® 80	(Sigma, St. Louis, MO, ABD)
Glasiyel asetik asit	(Sigma, St. Louis, MO, ABD)
Sitrat Tamponu (pH:6)	(Thermo Scientific, MA, ABD)
Hidrojen peroksit	(Thermo Scientific, MA, ABD)

Monobazik potasyum fosfat	(Sigma, St. Louis, MO, ABD)
Dibazik sodyum fosfat	(Sigma, St. Louis, MO, ABD)
Parafin	(Sigma, St. Louis, MO, ABD)
Paraformaldehit	(Sigma, St. Louis, MO, ABD)
Etanol	(Sigma, St. Louis, MO, ABD)
Ksilen	(Sigma, St. Louis, MO, ABD)

3.3. Kullanılan Cihazlar

Perfüzyon cihazı	(Cole-Parmer Instrument Co., Vera Manostat® pump, IL, ABD)
Mikrotom cihazı	(Thermo Scientific, Shandon AS325, MA, ABD)
Sequenza Immunostaining Center	(Thermo Scientific, MA, ABD)
Işık mikroskobu	(Olympus CX31RTSF, Olympus GmbH, Hamburg, Almanya)
LCmicro görüntüleme programı	(Olympus GmbH, Hamburg, Almanya)
ImageJ görüntü analiz programı	(National Institutes of Health, Bethesda, MD, ABD)
Hassas terazi	(Ohaus, E 12140, Greifensee, İsviçre)

4. YÖNTEMLER

4.1. İlaç Tedavisi

TNG, deney hayvanlarına 50 ve 100 mg/kg dozlarında oral olarak 14 gün süresince subakut olarak uygulanmıştır (Yang vd., 2017). Kontrol gruplarına ise tedavi gruplarının çözücüsü olarak kullanılmış %5 karboksimetilselüloz-Na/%0,04'lük Tween 80 (w/w) çözeltisi oral olarak 14 gün süresince subakut olarak uygulanmıştır.

4.2. Skopolamin ile Deneysel Amnezi Modelinin Oluşturulması

14 günlük ilaç uygulamasından sonra, SCP ile indüklenmiş amnezi modeli oluşturmak amacıyla ilgili deney gruplarına 0,5 mg/kg (*i.p.*) dozunda SCP uygulanmıştır (Guan vd., 2010; Ucel vd., 2020).

4.3. Deney Grupları ve Sayıları

Çalışmalar için oluşturulan deney grupları Tablo 4.1.'de sunulmuştur.

Tablo 4.1. *Deney grupları*

Grup No	Deney grupları
1	Kontrol (0,1 ml x 14 gün) + SF (0,1 ml x 5 gün)
2	Kontrol (0,1 ml x 14 gün) + SCP (0,5 mg/kg x 5 gün)
3	TNG (50 mg/kg x 14 gün) + SCP (0,5 mg/kg x 5 gün)
4	TNG (100 mg/kg x 14 gün) + SCP (0,5 mg/kg x 5 gün)

4.4. Deney Hayvanlarının Perfüzyonu ve Doku İşleme Protokolü

Deney gruplarındaki sıçanlar; ilaç uygulama proseslerinin ardından immünohistokimyasal ve morfolojik incelemeler için, ketamin (100 mg/kg, *i.p.*) ve ksilazin (5 mg/kg, *i.p.*) uygulanarak anestezi altına alınmıştır (Demir Özkay vd., 2017). Gerçekleştirilmiş olan anestezi prosesini takiben 0.1 M fosfat tamponlu serum fizyolojik (pH 7,4) ve peşi sıra %4'lük paraformaldehit içeren fosfat tamponu ile sıçanlar transkardiyal olarak perfüze edilmiş ve beyinlerinin diseksiyonu gerçekleştirilmiştir. %4'lük paraformaldehit içerisinde post-fiksasyona maruz bırakılarak sertleştirme prosesi

uygulanmış olan beyin dokuları, dehidrate edildikten sonra parafin bloklara gömülmüştür.

Mikroskopik incelemeler için, parafin bloklardaki dokulardan mikrotom aracılığıyla koronal ekseninde 4 µm kalınlığında doku kesitleri alınmıştır. Alınan kesitler arasından hipokampusu ayırt etmek amacıyla; bregma referans noktasına göre -2,52 mm, -3,00 mm ve -3,48 mm koordinatları ile uyumlu seçilenler, poli-L-lizin-kaplı şarjlı lamlara yapıştırıldıktan sonra etüvde 30 dakika kadar bekletilmiş ve deparafinizasyon işlemi uygulanmıştır (Paxinos ve Watson, 2007; Ucel vd., 2020). 25° C’de soğutulan preparatlar boyama prosesine alınmıştır.

4.5. Morfolojik Çalışmalar

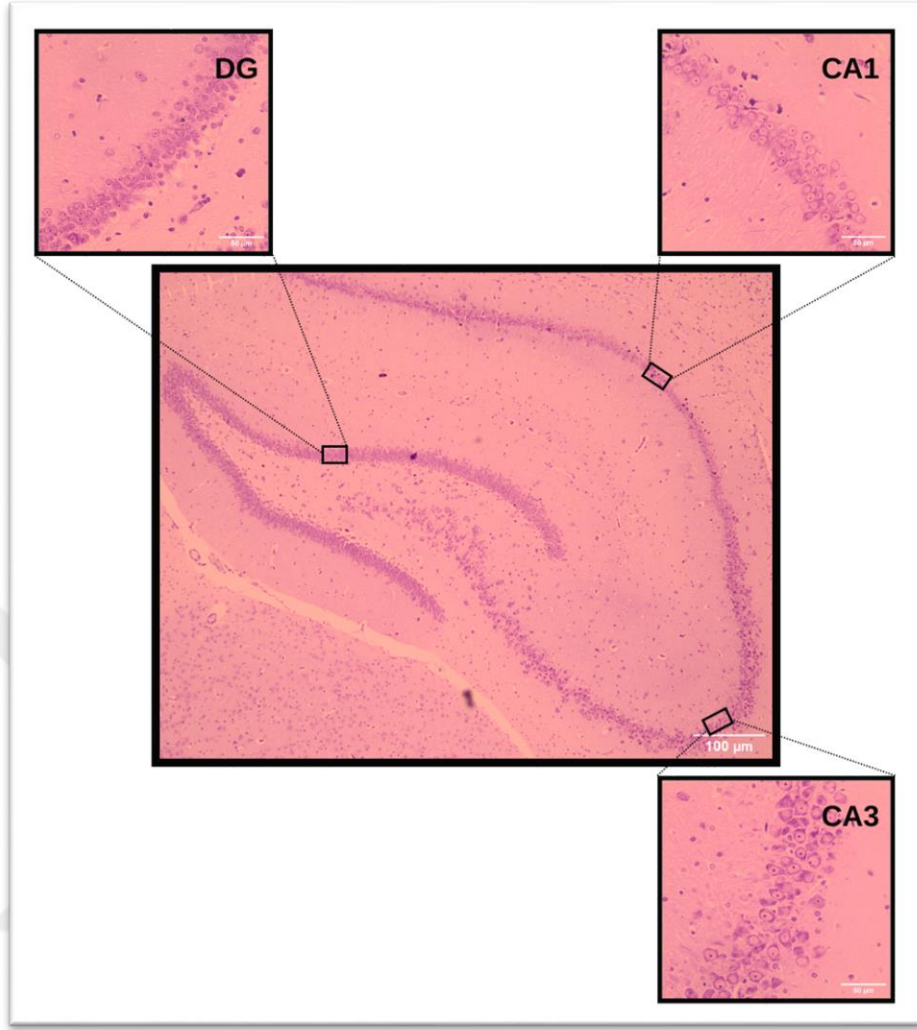
4.5.1. Nissl boyama

Deparafinize edilmiş preparatlar, %0,1 krezil viyole çözeltisi ile 5 dakika süresince boyama prosesine tabi tutulmuştur. Numuneler; distile su ile yıkandıktan sonra birkaç damla glasiyel asetik asit içeren %70’lik etil alkol içerisinde, 2-5 dakika süresince diferensiyasyona maruz bırakılmıştır. Son olarak %70, %95 ve %100’lük etanol içerisinde dehidrate edilerek, ksilen ile temizlenmiş ve entellan ile kaplanmıştır (Dai vd., 2022).

4.5.2. Morfolojik analiz

Morfolojik analiz için, 40X objektif lensli entegre kameralı Olympus CX31RTSF model (Olympus GmbH, Hamburg, Almanya) ışık mikroskobu ve LCmicro (Olympus GmbH, Hamburg, Almanya) bilgisayar destekli görüntüleme programı kullanılmıştır. Çekilen dijital fotomikrograflar daha sonra, ImageJ 1.53t (U.S. NIH, Bethesda, MD, ABD) görüntü analiz sistemine aktarılıp değerlendirilmiştir.

Morfolojik analiz için, hipokampus üzerinden alınmış koronal kesitlerin temsili görüntüleri Şekil 4.1.’de gösterilmektedir.



Şekil 4.1. Nissl boyama ile morfolojik analiz yapılan hipokampal kesitlerden alınan örneklerin temsili görüntüsü

4.6. İmmünohistokimyasal Çalışmalar

4.6.1. İmmünohistokimyasal boyama

4 µm kalınlığında alınan kesitlerin, 60 °C etüvde 1 saat bekletildikten sonra 3x5 dakika ksilolde tutularak deparafinizasyonları sağlanmıştır. Daha sonra numuneler sırasıyla azalan konsantrasyondaki etanol serilerinden (%100, %96, %80, %70) geçirilip rehidrate edilmiştir. Alkolü uzaklaştırmak için, alınan numuneler 2x1 dakika aralıklı olarak distile su ile yıkanmıştır.

Parafinden arındırılmış kesitlerde immünohistokimyasal boyama öncesinde oluşabilecek antijen maskeleymesini önlemek amacıyla, kesitler 1:10 dilüe ve pH:6 düzeyinde sitrat tamponu içerisinde yüksek basınçta kaynama noktasına kadar ısıtılarak

antijen retrieval protokolü uygulamasına geçilmiştir. 25 °C’de soğutulan preparatlar, 5 dakika boyunca paraformaldehit içeren fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkanmasının ardından boyama prosesine alınmıştır.

Bunlara ek olarak hipokampal formasyonda; astrosit tespiti için anti-Glial fibriler asidik protein (anti-GFAP), nöronal belirteç olarak ise anti-nöronal nükleer protein (anti-NeuN) kullanılmış olup, immünohistokimyasal boyama sürecinin tamamı kapalı bir kutu içerisinde ve nemli bir ortamda yapılmıştır.

Boyama esnasında, kesitlerde endojen peroksidaz etkinliğinin eliminasyonunu sağlamak amacıyla %3’lük hidrojen peroksit çözeltisi ve non-spesifik zemin boyanmasını önlemek için 10 dakika boyunca blokaj solüsyonu uygulanmıştır. Prosesin devamında primer antikorlar (anti-GFAP antibody ve anti-NeuN antibody) uygulanıp daha sonra ise preparatlar +4 °C’de 1 gece boyunca inkübasyonda bekletilmiştir.

Kesitlerin görünebilmesi amacıyla, 3 dakika süreyle 3,3'-diaminobenzidin uygulanmış ve yıkama prosesine geçilmiştir. Lamlar artan konsantrasyonda etanol serisi ve ksilen ile çalkalanmış, daha sonra ise ksilen bazlı kapama maddesi kullanılarak kapatılmıştır.

4.6.2. İmmünoreaktivitenin değerlendirilmesi

İmmünohistokimyasal inceleme için hazırlanan tüm doku kesitleri; 10X objektif lensli ışık mikroskoplu, bilgisayar destekli görüntüleme sistemi olan LCmicro görüntüleme programı (Olympus GmbH, Hamburg, Almanya) ile görselleştirilmiştir. Her kesitten 250 µm x 250 µm boyutlarındaki fotomikrograflar seçilmiş; CA₁, CA₃ ve DG alanları incelenmiştir. Hesaplamalarda kullanılan mikroskobik kalibrasyon çizelgesi vasıtasıyla birlikte, büyütme oranına göre hesaplanan gerçek uzunluk birimleri kullanılmıştır.

Fotomikrografların immünoreaktivelere, ImageJ 1.53t (U.S. NIH, Bethesda, MD, ABD) görüntü işleme ve analiz programı aracılığıyla değerlendirilmiştir.

4.7. İstatistiksel Analiz

İstatiksel analiz için kullanılan veriler her grup için 7 adet hayvandan elde edilmiştir. İstatistiksel hesaplamalar ve grafik çizimleri için GraphPad Prism ver. 8.4.3 (GraphPad Software, La Jolla, California, USA) paket programı kullanılmıştır.

Gruplar arasında çoklu karşılaştırma yapmayı gerektiren veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi uygulanarak incelenmiştir. Sonuçlar, ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir. $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir.



5. BULGULAR ve TARTIŞMA

5.1. Morfolojik Çalışmalara İlişkin Bulgular

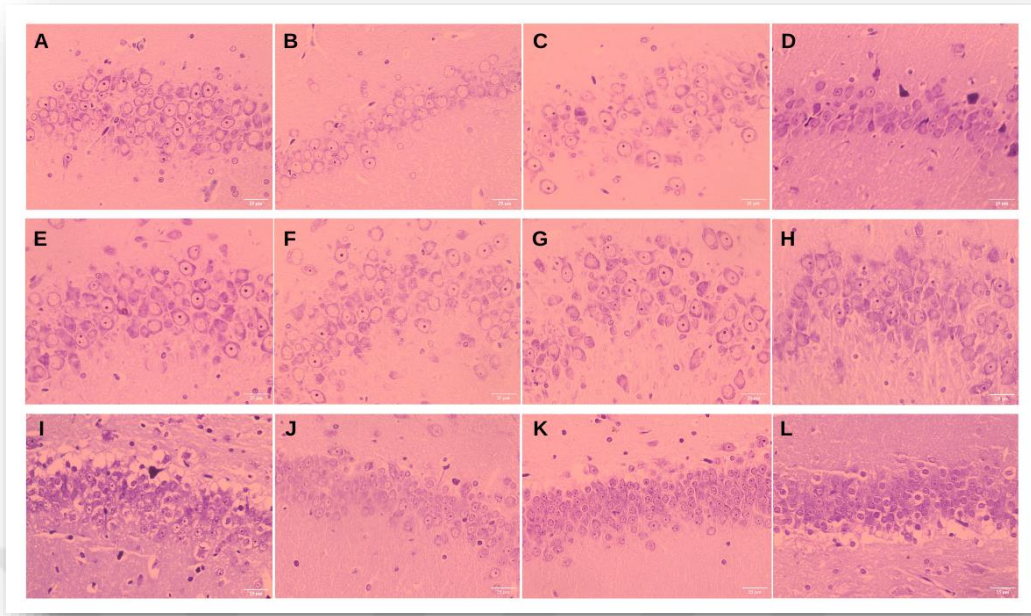
5.1.1. Hipokampal formasyona ait bölgelerde Nissl boyamasına ilişkin morfolojik bulgular

Krezil viyole: küçük üçgen veya oval şekilllerde olabilen Nissl cisimciklerini, intrasitoplazmik kümeler veya kromatofilik RNA granülleri olarak görselleştirmek için kullanılan histokimyasal bir boyadır (Memudu ve Adewumi, 2021; Lu vd., 2022).

SSS üzerinde yapılan araştırmalarda kullanılan Nissl boyaları (nötr kırmızısı, metilen mavisi, toluidin mavisi, krezil viyole), rutin boyama protokolüdür. Nissl granüllerini tanımlama dışında; hücre dağılımı ve hücre morfolojisi hakkında bilgi veren Nissl boyaları, miyelin boyalarıyla birlikte kullanımı sonucunda nöronal bölgelerin glial bölgelerden ayırt edilmesinin kolaylaştırıldığı protokoller oluşturmaktadır (Avcı vd., 2004; Drouin vd., 2022).

Bu sebeple bu çalışmada; Nissl boyama sonrası hipokampusün CA₁, CA₃ ve DG lokasyonları incelenerek SCP ile amnezi modeli oluşturulmuş sıçanların hipokampal formasyonlarındaki morfolojik değişikliklerinin araştırılması hedeflenmiştir.

14 gün boyunca düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol), SCP uygulanan amnezik (SCP+Kontrol), 14 gün süreyle düzenli olarak 50 mg/kg veya 100 mg/kg TNG uygulanan ve bunu takiben SCP uygulanan amnezik (SCP+TNG50 ve SCP+TNG100) sıçanların dokularından alınmış koronal beyin kesitlerinin, krezil viyole ile yapılan histokimyasal boyama prosesi sonrasında hipokampal CA₁, CA₃ ve DG bölgelerinden elde edilmiş fotomikroagrafları Şekil 5.1.'de sunulmaktadır.



Şekil 5.1. Nissl boyama işlemi gerçekleştirilmiş sıçanların hipokampal formasyonlarının temsili görüntüleri, optik büyütme: 40X (Kontrol CA₁, CA₃, DG; A, E, I), (SCP+Kontrol CA₁, CA₃, DG; B, F, J), (SCP+TNG50 CA₁, CA₃, DG; C, G, K) (SCP+TNG100 CA₁, CA₃, DG; D, H, L) (Ölçek: 25 µm)

Deney gruplarının koronal ekseninde alınmış kesitlerinin hipokampal formasyondaki CA₁ alt-alanları ışık mikroskobunda incelendiğinde; SCP kaynaklı nörodejenere olmuş grubun (Şekil 5.1B), kontrol grubuna (Şekil 5.1A) kıyasla nöron sayılarındaki azalma göze çarpmaktadır. TNG50 ve TNG100 uygulamasının (Şekil 5.1C, D) ise SCP'nin nörodegeneratif etkisine karşı doza bağlı bir oranda koruyucu etkinlik gösterdiği; bu gruplara ait örneklerdeki nöronların daha yoğun sıralandığı ve daha bazofilik profilde oldukları gözlemlenmiştir.

Deney gruplarının koronal ekseninde alınmış kesitlerinin hipokampal formasyondaki CA₃ alt-alanları ışık mikroskobunda incelendiğinde; SCP ile amnezi modeli oluşturulmuş sıçanların hipokampal kesitlerinde (Şekil 5.1F), nöron sitoplazmalarında yer alan Nissl cisimciklerinin kontrol grubuna (Şekil 5.1E) göre daha silik yapıda oldukları gözlenmiştir. TNG50 ve TNG100 grubunda ise (Şekil 5.1G, H) ise doz artışıyla da uyumlu olacak şekilde Nissl cisimciklerinin daha belirgin bir yapıda oldukları gözlemlenmiştir. Ayrıca kontrol grubundaki (Şekil 5.1E) piramidal hücre tabakasının tekdüzeliğinin, amnezik model grubunda (Şekil 5.1F) daha dağınık bir hücre dizilimine

evrildiği görülmekte, TNG50 ve TNG100 gruplarındaysa (Şekil 5.1G, H), tekdüzeliği bozulan tabaka üzerinde TNG'nin terapötik etkinliği dikkat çekmektedir.

Son olarak deney gruplarının koronal ekseninde alınmış kesitlerinin hipokampal formasyondaki DG alt-alanları ışık mikroskopunda incelendiğindeyse; protein sentezinin önemli bir parçası olan Nissl cisimciklerinin amnezik model grubunda (Şekil 5.1J), kontrol grubuna (Şekil 5.1I) kıyasla nöronal hasara bağlı olarak azaldığı görülmektedir. TNG50 tedavi grubunda (Şekil 5.1K), SCP ile amnezi oluşturulmuş gruba; TNG100 tedavi grubundaysa (Şekil 5.1L) hem amnezi oluşturulmuş model grubuna (Şekil 5.1F) hem de kontrol grubuna göre (Şekil 5.1I) Nissl cisimciklerinin daha bazofilik yapıda olduğu, sayılarının arttığı ve nöronal yığınlar halinde bulunduğu dikkat çekmektedir.

Nissl boyama protokolü, nöronal yapılardaki değişikliklerin gözlenmesi amacıyla oldukça sık kullanılmaktadır. Lu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; SCP aracılıklı kognitif bozukluk oluşturulan fare ve sıçan modellerinde nöronal morfolojinin bozulduğu, Nissl cisimciklerinin sayısının azaldığı, sitoplazma ve hücre somalarının dansitelerinde azalmanın olduğu göze çarpmaktadır (Lu vd., 2022). Başka bir çalışmada ise 10 gün boyunca oral yolla TNG 50, 100 ve 200 mg/kg uygulaması sonrası pilokarpin ile epilepsi modeli oluşturulmuş sıçanlarda; epileptik sıçanların Nissl boyamaya tabi tutulan hipokampal kesitlerinin CA₁ ve CA₃ bölgelerindeki canlı hücre sayılarının doza bağlı olarak arttığı rapor edilmiştir (Guo vd., 2017). Alzheimer hastalığının modellendiği bir çalışmada ise; tedavi grubundaki deney hayvanlarına *Citrus* kabuklarından izole edilen bir flavonoid türü olan nobiletin uygulanmış; Nissl boyama protokolü sonucunda, TNG'ye benzer yapıdaki nobiletinin CA₁ bölgesindeki azalmış olan nöron sayısını arttırdığı ve nöroprotektif etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (Ghasemi-Tarie vd., 2022).

Yapılan bu araştırmalar göz önünde bulundurularak, flavonoid yapısında olan TNG'nin; bu tez çalışmasında sunulan SCP kaynaklı amnezinin yol açtığı Nissl cisimciklerindeki azalma, nöronal morfolojik yapıdaki bozulma ve dolayısıyla oluşan kognitif hasarı önleyici terapötik etkileri literatür ile paralel niteliktedir.

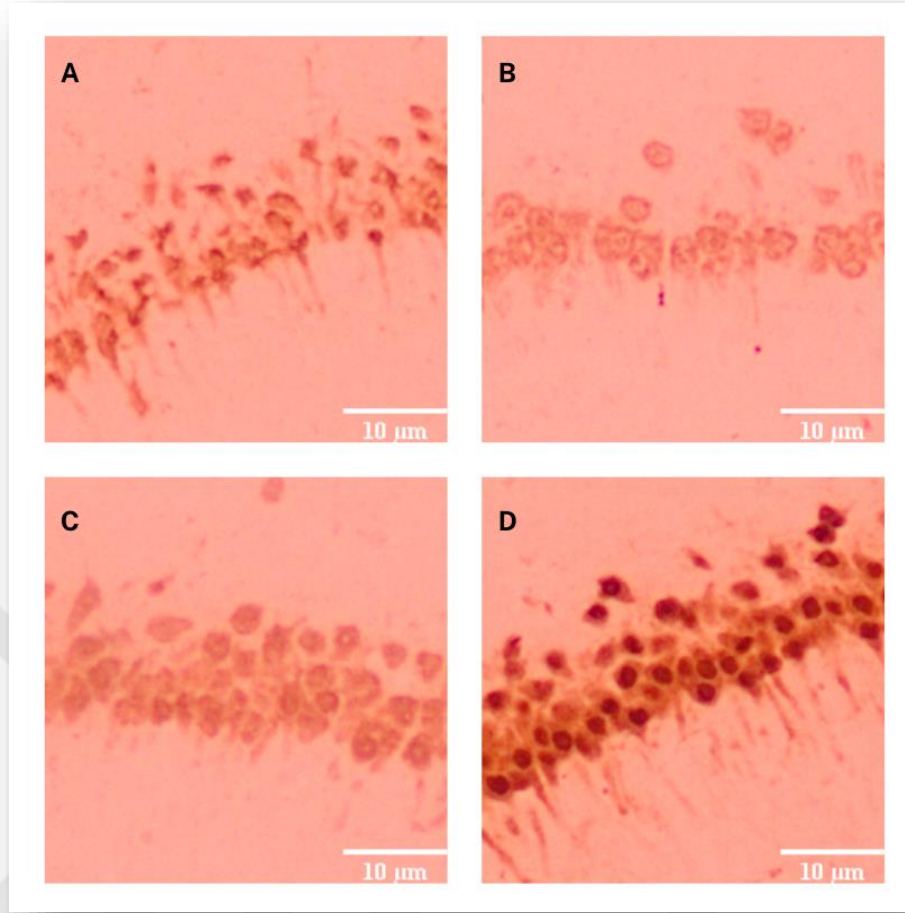
5.2. İmmünohistokimyasal İncelemelere İlişkin Bulgular

5.2.1. Hipokampal formasyona ait bölgelerde NeuN immünoreaktivitelerine ilişkin bulgular

Hipokampüsteki nöronal hücre somaları ve sinaptik bağlantılardaki farklılıkların, kognitif fonksiyonlar ile yakından ilişkili olduğu; öğrenme ve bellek bozukluklarından sorumlu olabileceği bilinmektedir. Bir yapısal plastisite mekanizması olarak değerlendirilebilecek bu nöronal yapı ve bağlantıların kaybı, nörodejenerasyonun en belirgin işaretlerindendir (Luo vd., 2015).

Bu sebeple bu çalışmada; anti-NeuN antikoru kullanılarak hipokampüsün CA₁, CA₃ ve DG lokasyonlarında nörona spesifik işaret proteini olan NeuN immünoreaktivitesi değerlendirilmiş ve TNG uygulamasının SCP ile amnezi modeli oluşturulmuş sıçanların hipokampal formasyonlarında oluşturduğu değişikliklerin araştırılması hedeflenmiştir.

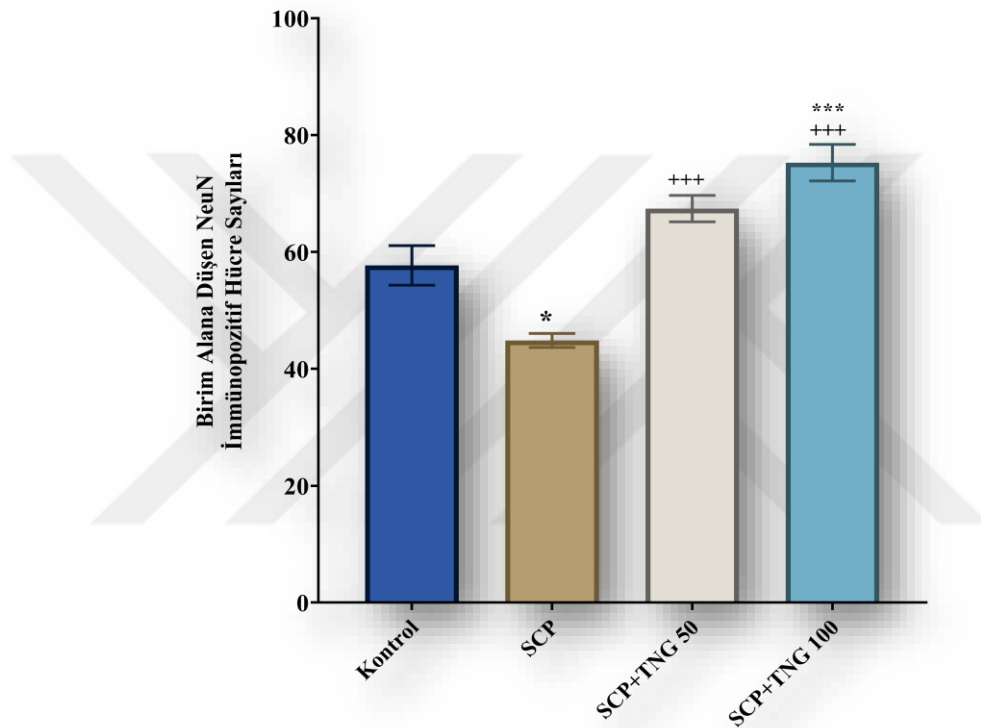
14 gün boyunca düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol), SCP uygulanan amnezik (SCP+Kontrol), 14 gün süreyle düzenli olarak 50 mg/kg veya 100 mg/kg TNG uygulanan ve bunu takiben SCP uygulanan amnezik (SCP+TNG50 ve SCP+TNG100) sıçanların dokularından alınmış koronal beyin kesitlerinin, anti-NeuN antikoru ile yapılan immünohistokimyasal boyama prosesi sonrasında hipokampal CA₁ bölgesinden elde edilmiş fotomikrografları Şekil 5.2.'de sunulmaktadır.



Şekil 5.2. 14 gün süreyle düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol, A), SCP ile amnezi oluşturulmuş (SCP+Kontrol, B), 14 gün süreyle düzenli olarak 50 mg/kg veya 100 mg/kg TNG uygulanan ve bunu takiben SCP uygulanan amnezik (SCP+TNG50, C ve SCP+TNG100, D) sıçanların hipokampal CA₁ alanlarında NeuN immünoreaktivitelerinin temsili görüntüleri (Ölçek: 10 µm)

Şekil 5.2.'de sunulan fotomikrografta; CA₁ bölgesindeki piramidal hücre katmanındaki nöronların sitoplazmasında bulunan nükleer proteinlerin boyanma yoğunluğu, NeuN immünopozitif hücrelerin ekspresyonunu göstermektedir (Von Bohlen Und Halbach, 2007). Kontrol grubuna (Şekil 5.2A-5.3) kıyasla; NeuN immünopozitif hücre sayısının, SCP uygulamasına bağlı olarak anlamlı seviyede azaldığı (Şekil 5.2B-5.3) görülmüştür. TNG tedavisinin (Şekil 5.2C, D-5.3) ise SCP ile amnezi modeli oluşturulmuş sıçanlardaki (Şekil 5.2B) azalmış olan NeuN immünopozitif hücre sayısını anlamlı seviyede arttırdığı saptanmıştır.

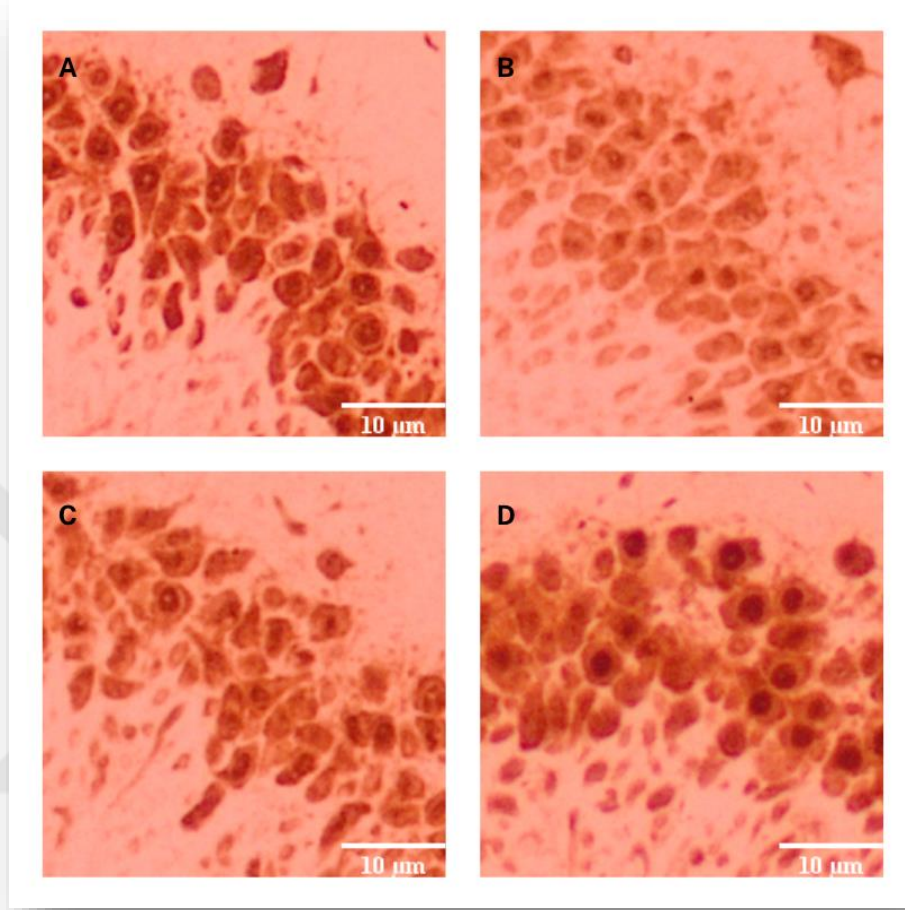
14 gün boyunca düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol), SCP uygulanan amnezik (SCP+Kontrol), 14 gün süreyle düzenli olarak 50 mg/kg veya 100 mg/kg TNG uygulanan ve bunu takiben SCP uygulanan amnezik (SCP+TNG50 ve SCP+TNG100) sıçanların dokularından alınmış koronal beyin kesitlerinin hipokampal CA₁ bölgesinden elde edilmiş fotomikrograflarda birim alana düşen NeuN immünopozitif hücre sayıları, Şekil 5.3.'te verilmiştir [$F(3,24)=24,69; p<0,001$].



Şekil 5.3. 14 gün boyunca düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol), SCP uygulanan amnezik (SCP+Kontrol), 14 gün süreyle düzenli olarak 50 mg/kg veya 100 mg/kg TNG uygulanan ve bunu takiben SCP uygulanan amnezik (SCP+TNG50 ve SCP+TNG100) sıçanların hipokampal CA₁ alanlarında birim alana düşen NeuN immünopozitif hücre sayıları. Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık * $p<0,05$; *** $p<0,001$; SCP+Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık *** $p<0,001$; Tek yönlü varyans analizi, takiben Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi, $n=7$.

14 gün boyunca düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol), SCP uygulanan amnezik (SCP+Kontrol), 14 gün süreyle düzenli olarak 50 mg/kg veya 100 mg/kg TNG uygulanan ve bunu takiben SCP uygulanan amnezik (SCP+TNG50 ve SCP+TNG100) sıçanların dokularından alınmış koronal beyin kesitlerinin, anti-NeuN

antikoru ile yapılan immünohistokimyasal boyama prosesi sonrasında hipokampal CA₃ bölgesinden elde edilmiş fotomikrografları Şekil 5.4.'te sunulmaktadır.

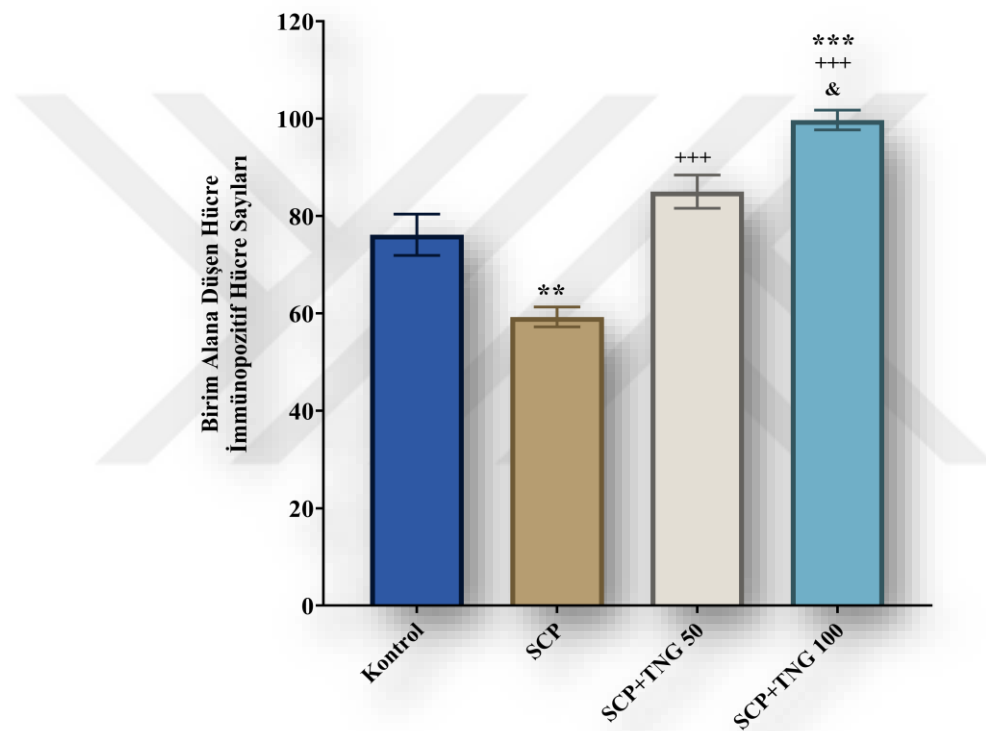


Şekil 5.4. 14 gün süreyle düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol, A), SCP ile amnezi oluşturulmuş (SCP+Kontrol, B), 14 gün süreyle düzenli olarak 50 mg/kg veya 100 mg/kg TNG uygulanan ve bunu takiben SCP uygulanan amnezik (SCP+TNG50, C ve SCP+TNG100, D) sıçanların hipokampal CA₃ alanlarında NeuN immünoaktivitelerinin temsili görüntüleri (Ölçek: 10 µm)

Şekil 5.4.'te sunulan fotomikrografta; CA₃ bölgesindeki piramidal hücre katmanındaki nöronların sitoplazmasında bulunan nükleer proteinlerin boyanma yoğunluğu, NeuN immünopozitif hücrelerin ekspresyonunu göstermektedir (Von Bohlen Und Halbach, 2007). Kontrol grubuna (Şekil 5.4A-5.5) kıyasla; NeuN immünopozitif hücre sayısının, SCP uygulamasına bağlı olarak anlamlı seviyede azaldığı (Şekil 5.4B-5.5), görülmüştür. TNG tedavisinin (Şekil 5.4C, D-5.5) ise doza bağlı olarak, SCP ile

amnezi modeli oluşturulmuş sıçanlardaki (Şekil 5.4B-5.5) azalmış olan NeuN immünopozitif hücre sayısını anlamlı seviyede arttırdığı saptanmıştır.

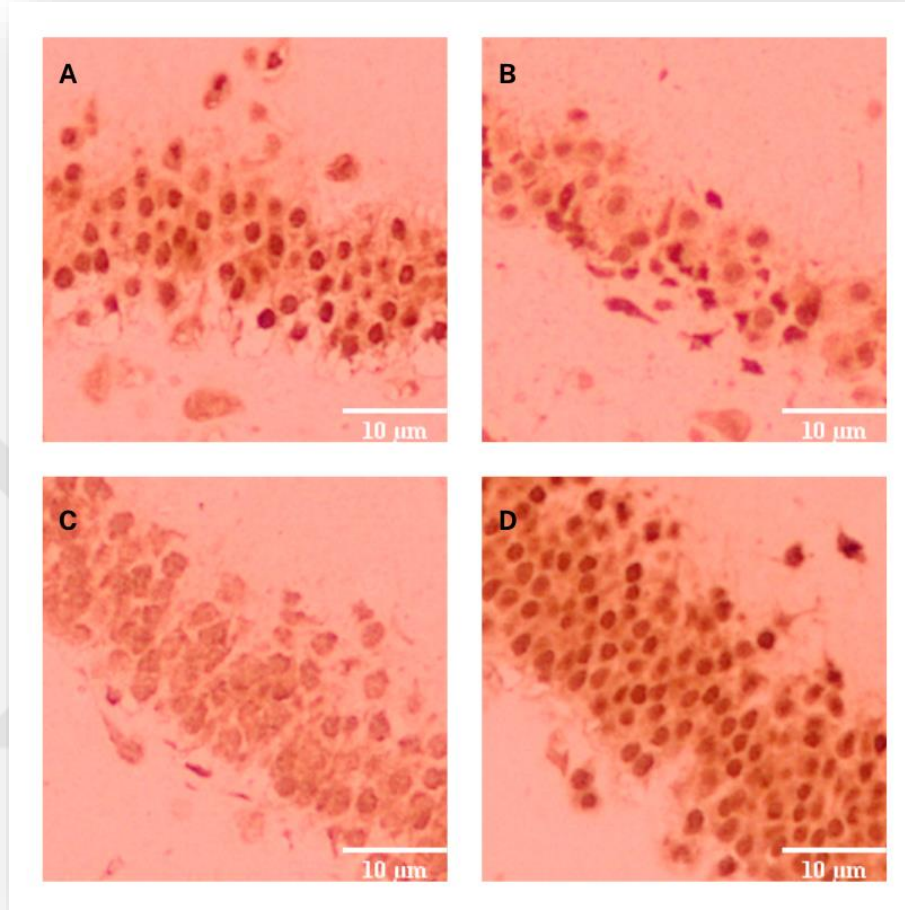
14 gün boyunca düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol), SCP uygulanan amnezik (SCP+Kontrol), 14 gün süreyle düzenli olarak 50 mg/kg veya 100 mg/kg TNG uygulanan ve bunu takiben SCP uygulanan amnezik (SCP+TNG50 ve SCP+TNG100) sıçanların dokularından alınmış koronal beyin kesitlerinin hipokampal CA₃ bölgesinden elde edilmiş fotomikrograflarda birim alana düşen NeuN immünopozitif hücre sayıları, Şekil 5.5.'te verilmiştir [F (3,24)=30,21; $p<0,001$].



Şekil 5.5. 14 gün boyunca düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol), SCP uygulanan amnezik (SCP+Kontrol), 14 gün süreyle düzenli olarak 50 mg/kg veya 100 mg/kg TNG uygulanan ve bunu takiben SCP uygulanan amnezik (SCP+TNG50 ve SCP+TNG100) sıçanların hipokampal CA₃ alanlarında birim alana düşen NeuN immünopozitif hücre sayıları. Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; SCP+Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık +++ $p<0,001$; SCP+TNG50 grubuna göre anlamlı farklılık & $p<0,05$; Tek yönlü varyans analizi, takiben Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi, $n=7$.

14 gün boyunca düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol), SCP uygulanan amnezik (SCP+Kontrol), 14 gün süreyle düzenli olarak 50 mg/kg veya 100 mg/kg TNG uygulanan ve bunu takiben SCP uygulanan amnezik (SCP+TNG50 ve

SCP+TNG100) sıçanların dokularından alınmış koronal beyin kesitlerinin, anti-NeuN antikoru ile yapılan immünohistokimyasal boyama prosesi sonrasında hipokampal DG bölgesinden elde edilmiş fotomikrografları Şekil 5.6.'da sunulmaktadır.

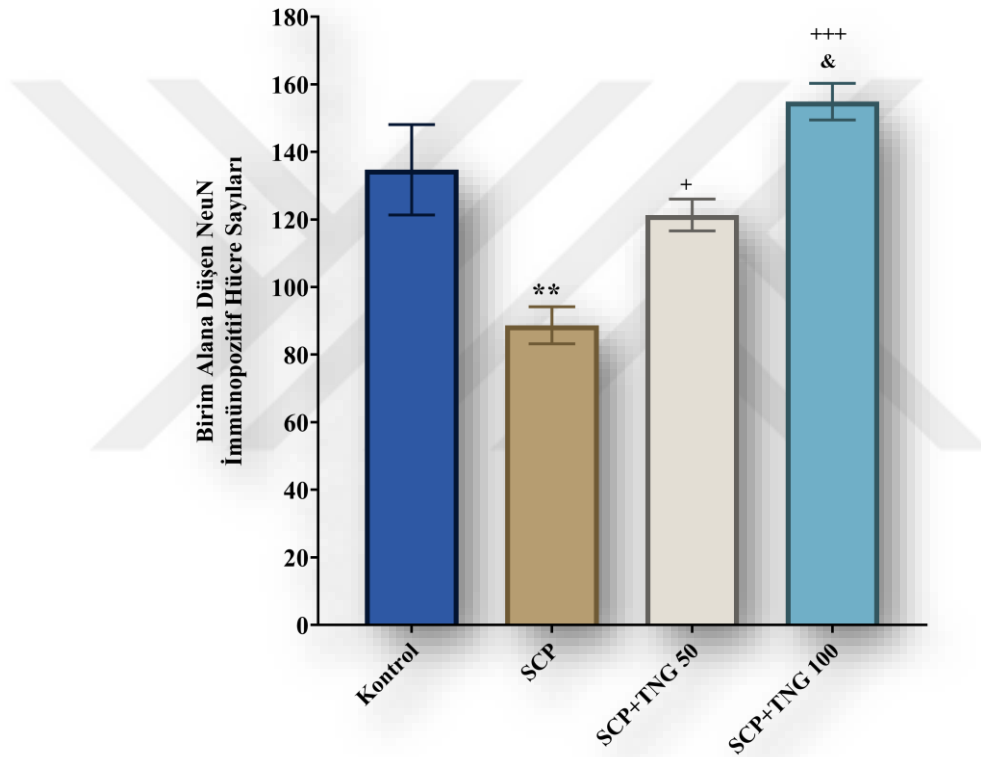


Şekil 5.6. 14 gün süreyle düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol, A), SCP ile amnezi oluşturulmuş (SCP+Kontrol, B), 14 gün süreyle düzenli olarak 50 mg/kg veya 100 mg/kg TNG uygulanan ve bunu takiben SCP uygulanan amnezik (SCP+TNG50, C ve SCP+TNG100, D) sıçanların hipokampal DG alanlarında NeuN immünoaktivitelerinin temsili görüntüleri (Ölçek: 10 µm)

Şekil 5.6.'da sunulan fotomikrografta; DG bölgesindeki granüler hücre katmanındaki nöronların sitoplazmasında bulunan nükleer proteinlerin boyanma yoğunluğu, NeuN immünopozitif hücrelerin ekspresyonunu göstermektedir (Von Bohlen Und Halbach, 2007). Kontrol grubuna (Şekil 5.6A-5.7) kıyasla; NeuN immünopozitif hücre sayısının, SCP uygulamasına bağlı olarak anlamlı seviyede azaldığı (Şekil 5.6B-5.7) belirlenmiştir. TNG tedavisinin (Şekil 5.6C, D-5.7) ise doza bağlı olarak, SCP ile

amnezi modeli oluşturulmuş sıçanlardaki (Şekil 5.6B-5.7) azalmış olan NeuN immüno pozitif hücre sayısını anlamlı seviyede arttırdığı, görülmüştür.

14 gün boyunca düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol), SCP uygulanan amnezik (SCP+Kontrol), 14 gün süreyle düzenli olarak 50 mg/kg veya 100 mg/kg TNG uygulanan ve bunu takiben SCP uygulanan amnezik (SCP+TNG50 ve SCP+TNG100) sıçanların dokularından alınmış koronal beyin kesitlerinin hipokampal DG bölgesinden elde edilmiş fotomikrograflarda birim alana düşen NeuN immüno pozitif hücre sayıları, Şekil 5.7.'de verilmiştir [F (3,24)=11,85; $p<0,001$].



Şekil 5.7. 14 gün boyunca düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol), SCP uygulanan amnezik (SCP+Kontrol), 14 gün süreyle düzenli olarak 50 mg/kg veya 100 mg/kg TNG uygulanan ve bunu takiben SCP uygulanan amnezik (SCP+TNG50 ve SCP+TNG100) sıçanların hipokampal DG alanlarında birim alana düşen NeuN immüno pozitif hücre sayıları. Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık ** $p<0,01$; SCP+Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık + $p<0,05$; +++ $p<0,001$; SCP+TNG50 grubuna göre anlamlı farklılık & $p<0,05$; Tek yönlü varyans analizi, takiben Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi, $n=7$.

Nörona özgü antikor üretmek için başlatılan immünolojik araştırmalar sonucu tanımlanan NeuN, post-mitotik nöronlarda tespit edilen karakterize bir belirteçtir. Aynı zamanda migrasyon öncesi nöroblastlarda nadiren ekspresyona uğrayan NeuN;

formalinle sabitlenmiş ve parafine gömülmüş dokularda hassas ve spesifiktir. Omurgalı sinir sisteminin neredeyse tüm bölümlerinde, olgun nöronların nükleuslarında dağıldığı rapor edilmiş ve Rbfox3'ün bir epitopu olarak tanımlanmıştır. Nöronal araştırmalarda; NeuN'un ekspresyon seviyesi, nöronal ölüm veya nöron sayısındaki azalmayı doğrudan değerlendirmek için kullanılmıştır (Duan vd., 2016).

Silva ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; sıçanlara 4 gün boyunca nörotoksik bir ajan olan alüminyum sitrat uygulanarak kognitif hasar oluşturulduğunda, sıçanlarda anti-NeuN ile yapılan immünohistokimyasal boyamalar sonucunda meydana gelen öğrenme ve bellek bozukluğuna nöronal kayıp ve hipokampal hasarın eşlik ettiği bildirilmiştir (Silva vd., 2013). Sıçanların beyinde hipoksik-iskemik hasar oluşturulan bir araştırmada ise sinir hücrelerinin fonksiyonel durumu ve canlılığının değerlendirilmesinde kullanılan NeuN ile yapılan immünohistokimyasal analizler sonucunda; iskemi süresi ile hipokampal CA₁ bölgesindeki nöronal hücre ölüm indeksi ilişkili bulunmuştur (Alekseeva vd., 2015). NeuN yoğunluğunun araştırılması aracılığıyla kognitif süreçlere post-mitotik nöronların katkılarını bildiren pek çok çalışma yer almaktadır (Kita vd., 2014; Li vd., 2015; Kim vd., 2023). Bu çalışmalar, hipokampüsteki sinir hücresi ölümlerinin hasarın şiddeti doğrultusunda artabileceği ve bu nöronal kayıpların öğrenme ve bellek üzerinde olumsuz etkilere sebep olabileceğine işaret etmektedir.

Bu araştırmada SCP ile amnezi modeli oluşturulmuş sıçanların incelenen tüm hipokampal alt-alanlarda (CA₁, CA₃ ve DG) NeuN immünoreaktivitesinin düştüğü ve NeuN immünopozitif hücre sayısının azaldığı saptanmıştır (Şekil 5.2.-5.7.). SCP'nin nöronlarda meydana getirdiği dejenerasyonlar, literatürde diğer çeşitli araştırmalar sonucunda da rapor edilmiştir (Inada vd., 2013; Li vd., 2016; Ucel vd., 2020). Deng ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; *i.p.* 5 mg/kg SCP ile amnezi modeli oluşturulmuş farelerde, nörogenez belirteci doublecortin ve olgun nöronal hücre belirteci NeuN'un ekspresyonlarında anlamlı bir düşüş gözlemlendiği, ayrıca aynı deney grubu üzerinde yapılan bazı *in vivo* deneylerde (yeni yer tanıma testi, yeni nesne tanıma testi ve Y-labirent testi), bu amnezik farelerin öğrenme ve bellek fonksiyonlarındaki kayıpların, bu sonuçları destekler nitelikte olduğu rapor edilmiştir (Deng vd., 2022). Yapılan bu ve benzer çalışmalarda; SCP'nin hücre proliferasyonunu, nöronal maturasyonu ve nöroblast farklılaşmasındaki prosesleri olumsuz olarak etkilediğini işaret etmektedir (Chen vd., 2018).

Tedavi grupları açısından çıkan sonuçlar incelendiğinde ise; tedavi edilmeyen amnezik sıçanlarla karşılaştırıldığında, TNG'nin hipokampal formasyona ait CA₁, CA₃ ve DG alt-alanlarındaki NeuN yoğunluğunda doza bağlı olarak anlamlı düzeyde artışa yol açtığı gözlenmiştir.

Bu bağlamda TNG uygulaması sonucu artan NeuN immüno pozitif hücre sayısının, TNG'nin SCP kaynaklı amnezinin olumsuz etkilerine (olgun nöronal hücre ölümleri veya nöronal proliferasyonun sekteye uğraması gibi) karşı koruyucu bir etkinlik gösterdiğine işaret ettiği söylenebilir.

5.2.2. Hipokampal formasyona ait bölgelerde GFAP immüno reaktivitelerine ilişkin bulgular

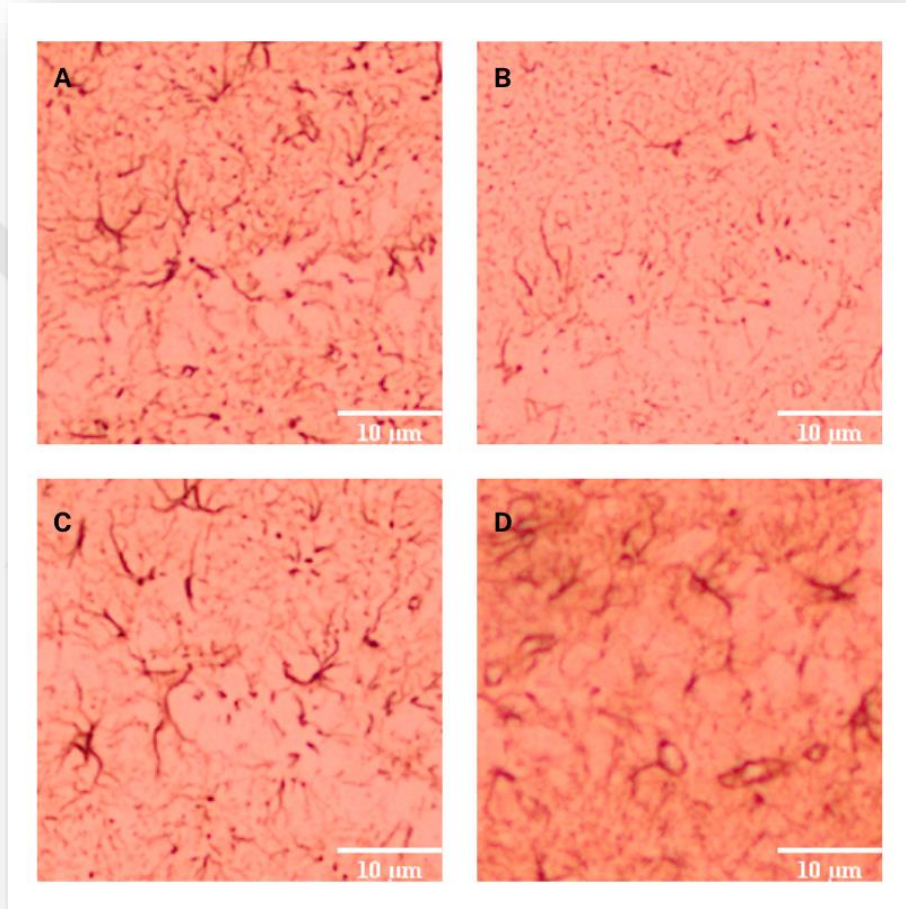
Astrositler, SSS'de en sık bulunan glial hücrelerdir. Nöronların destekleyicisi rolündeki geleneksel tanımlarının yanında; dentritik spine'ların büyümesi, sinapsların gelişimi ve plastisitesinde aktif katılımlarının bulunduğu kabul edilmiştir (Blanco-Suárez vd., 2017; Zhou vd., 2019).

Astrositleri görselleştirmek için anti-GFAP antikorları kullanılmaktadır. GFAP, astrositlerin varlığı, morfolojisi ve alt tipleri hakkında fikir vermektedir. Ek olarak GFAP'ın; proliferasyon, sinaptik plastisite, yaralanma sonrası koruma, miyelinizasyon, mitoz bölünme, sinyal iletimi ve glutamat sentezi gibi aksiyonlarla beyindeki öğrenme ve bellek prosesleri üzerinde rol oynadığı bilinmektedir (Honda vd., 2010; Middeldorp ve Hol, 2011).

Fibröz astrositler tarafından üretilen GFAP, intrasellüler ana ara filament proteinidir; fakat, aynı zamanda gelişimleri sırasında astrositlerde hücre iskeletinin önemli bir bileşenini oluşturmaktadır. GFAP'ın astrositlerdeki yapısal rolü uzun bir süredir geniş çapta kabul görmekle beraber, yıllar içinde rejenerasyon, sinaptik plastisite ve reaktif gliosis aşamalarında önem taşıyan astrosit fonksiyonlarında da yer aldıkları gösterilmiştir. (Eng vd., 1971; Middeldorp ve Hol, 2011).

Yapılan bu tez çalışmasında; TNG'nin nörogenez ve nöronal morfoloji üzerindeki muhtemel etkisinin incelenmesinin ardından, TNG'nin SCP ile amnezi modeli oluşturulmuş sıçanlardaki etkisine astrositlerin muhtemel katılımının da incelenmesi amaçlanmıştır (Konar vd., 2015). Bu nedenle; glial plastisite belirteci olan GFAP aracılıklı immüno reaktif değişiklikler araştırılmıştır.

14 gün boyunca düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol), SCP uygulanan amnezik (SCP+Kontrol), 14 gün süreyle düzenli olarak 50 mg/kg veya 100 mg/kg TNG uygulanan ve bunu takiben SCP uygulanan amnezik (SCP+TNG50 ve SCP+TNG100) sıçanların dokularından alınmış koronal beyin kesitleri, anti-GFAP antikoruna ile yapılan immünohistokimyasal boyama prosesi sonrasında hipokampal CA₁ bölgesinden elde edilmiş fotomikrograflar Şekil 5.8.'de sunulmaktadır.

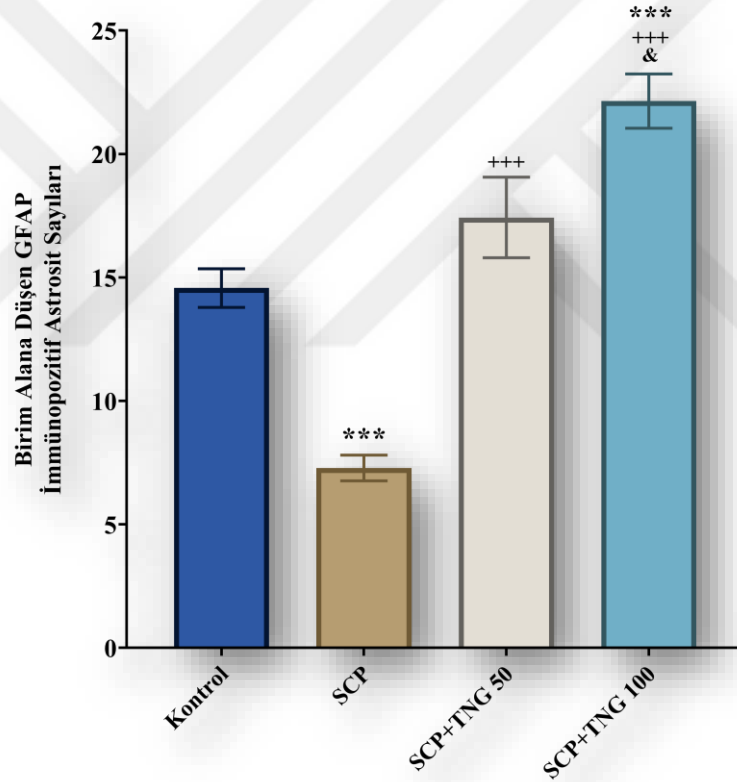


Şekil 5.8. 14 gün süreyle düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol, A), SCP ile amnezi oluşturulmuş (SCP+Kontrol, B), 14 gün süreyle düzenli olarak 50 mg/kg veya 100 mg/kg TNG uygulanan ve bunu takiben SCP uygulanan amnezik (SCP+TNG50, C ve SCP+TNG100, D) sıçanların hipokampal CA₁ alanlarında GFAP immünoaktivitelerinin temsili görüntüleri (Ölçek: 10 µm)

Şekil 5.8.'de sunulan fotomikrografta; CA₁ bölgesindeki piramidal hücre katmanında bulunan kahverengi ve yıldızsı morfolojik yapıya sahip olan alanlar, GFAP immünopozitif astrosit hücrelerinin varlığını göstermektedir. Kontrol grubuna (Şekil

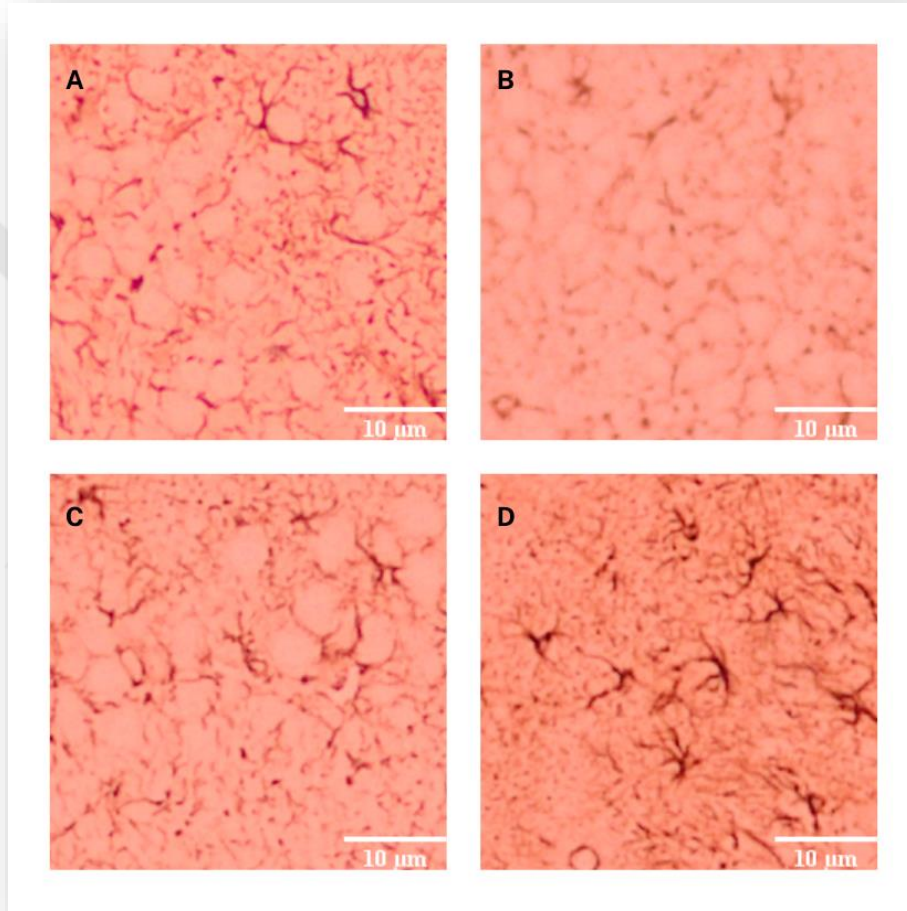
5.8A-5.9) kıyasla; astrosit sayısının, SCP uygulamasına bağlı olarak anlamlı seviyede azaldığı (Şekil 5.8B-5.9) görülmüştür. TNG tedavisinin (Şekil 5.8C, D-5.9) ise doza bağlı olarak, SCP ile amnezi modeli oluşturulmuş (Şekil 5.8B-5.9) sıçanlardaki azalmış olan GFAP immünopozitif astrosit hücre sayısını anlamlı seviyede arttırdığı görülmüştür.

14 gün boyunca düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol), SCP uygulanan amnezik (SCP+Kontrol), 14 gün süreyle düzenli olarak 50 mg/kg veya 100 mg/kg TNG uygulanan ve bunu takiben SCP uygulanan amnezik (SCP+TNG50 ve SCP+TNG100) sıçanların dokularından alınmış koronal beyin kesitlerinin hipokampal CA₁ bölgesinden elde edilmiş fotomikrograflarda birim alana düşen GFAP immünopozitif hücre sayıları, Şekil 5.9.'da verilmiştir [F (3,24)=32,56; $p<0,001$].



Şekil 5.9. 14 gün boyunca düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol), SCP uygulanan amnezik (SCP+Kontrol), 14 gün süreyle düzenli olarak 50 mg/kg veya 100 mg/kg TNG uygulanan ve bunu takiben SCP uygulanan amnezik (SCP+TNG50 ve SCP+TNG100) sıçanların hipokampal CA₁ alanlarında birim alana düşen GFAP immünopozitif hücre sayıları. Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık *** $p<0,001$; SCP+Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık *** $p<0,001$; SCP+TNG50 grubuna göre anlamlı farklılık & $p<0,05$; Tek yönlü varyans analizi, takiben Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi, $n=7$.

14 gün boyunca düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol), SCP uygulanan amnezik (SCP+Kontrol), 14 gün süreyle düzenli olarak 50 mg/kg veya 100 mg/kg TNG uygulanan ve bunu takiben SCP uygulanan amnezik (SCP+TNG50 ve SCP+TNG100) sıçanların dokularından alınmış koronal beyin kesitleri, anti-GFAP antikoru ile yapılan immünohistokimyasal boyama prosesi sonrasında hipokampal CA₃ bölgesinden elde edilmiş fotomikrograflar Şekil 5.10.'da sunulmaktadır.

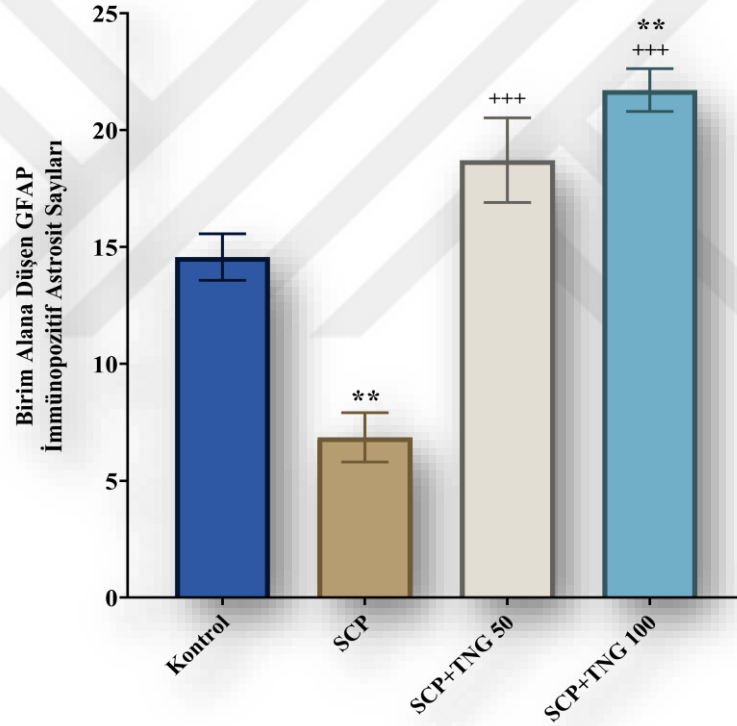


Şekil 5.10. 14 gün süreyle düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol, A), SCP ile amnezi oluşturulmuş (SCP+Kontrol, B), 14 gün süreyle düzenli olarak 50 mg/kg veya 100 mg/kg TNG uygulanan ve bunu takiben SCP uygulanan amnezik (SCP+TNG50, C ve SCP+TNG100, D) sıçanların hipokampal CA₃ alanlarında GFAP immünoaktivitelerinin temsili görüntüleri (Ölçek: 10 µm)

Şekil 5.10.'da sunulan fotomikrografta; CA₃ bölgesindeki piramidal hücre katmanında bulunan kahverengi ve yıldızsı morfolojik yapıya sahip olan alanlar, GFAP immünopozitif astrosit hücrelerinin varlığını göstermektedir. Kontrol grubuna (Şekil

5.10A-5.11), kıyasla; astrosit sayısının, SCP uygulamasına bağlı olarak anlamlı seviyede azaldığı (Şekil 5.10B-5.11) görülmüştür. TNG tedavisinin (Şekil 5.10C, D-5.11) ise SCP uygulanan amnezik (Şekil 5.10B-5.11) sıçanlardaki azalmış olan GFAP immünopozitif astrosit hücre sayısını arttırdığı görülmektedir.

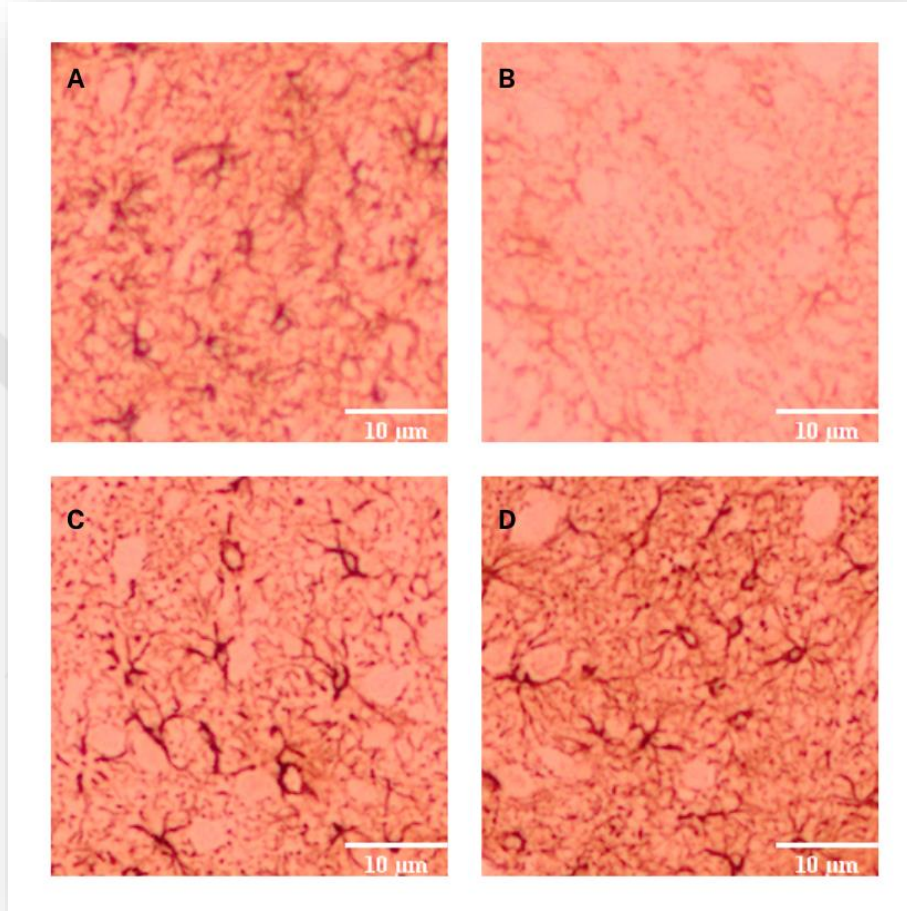
14 gün boyunca düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol), SCP uygulanan amnezik (SCP+Kontrol), 14 gün süreyle düzenli olarak 50 mg/kg veya 100 mg/kg TNG uygulanan ve bunu takiben SCP uygulanan amnezik (SCP+TNG50 ve SCP+TNG100) sıçanların dokularından alınmış koronal beyin kesitlerinin hipokampal CA₃ bölgesinden elde edilmiş fotomikrograflarda birim alana düşen GFAP immünopozitif hücre sayıları, Şekil 5.11.'de verilmiştir [F (3,24)=26,67; $p<0,001$].



Şekil 5.11. 14 gün boyunca düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol), SCP uygulanan amnezik (SCP+Kontrol), 14 gün süreyle düzenli olarak 50 mg/kg veya 100 mg/kg TNG uygulanan ve bunu takiben SCP uygulanan amnezik (SCP+TNG50 ve SCP+TNG100) sıçanların hipokampal CA₃ alanlarında birim alana düşen GFAP immünopozitif hücre sayıları. Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık ** $p<0,01$; SCP+Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık *** $p<0,001$; Tek yönlü varyans analizi, takiben Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi, $n=7$.

14 gün boyunca düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol), SCP uygulanan amnezik (SCP+Kontrol), 14 gün süreyle düzenli olarak 50 mg/kg veya 100

mg/kg TNG uygulanan ve bunu takiben SCP uygulanan amnezik (SCP+TNG50 ve SCP+TNG100) sıçanların dokularından alınmış koronal beyin kesitleri, anti-GFAP antikoruna ile yapılan immünohistokimyasal boyama prosesi sonrasında hipokampal DG bölgesinden elde edilmiş fotomikrograflar Şekil 5.12.'de sunulmaktadır.

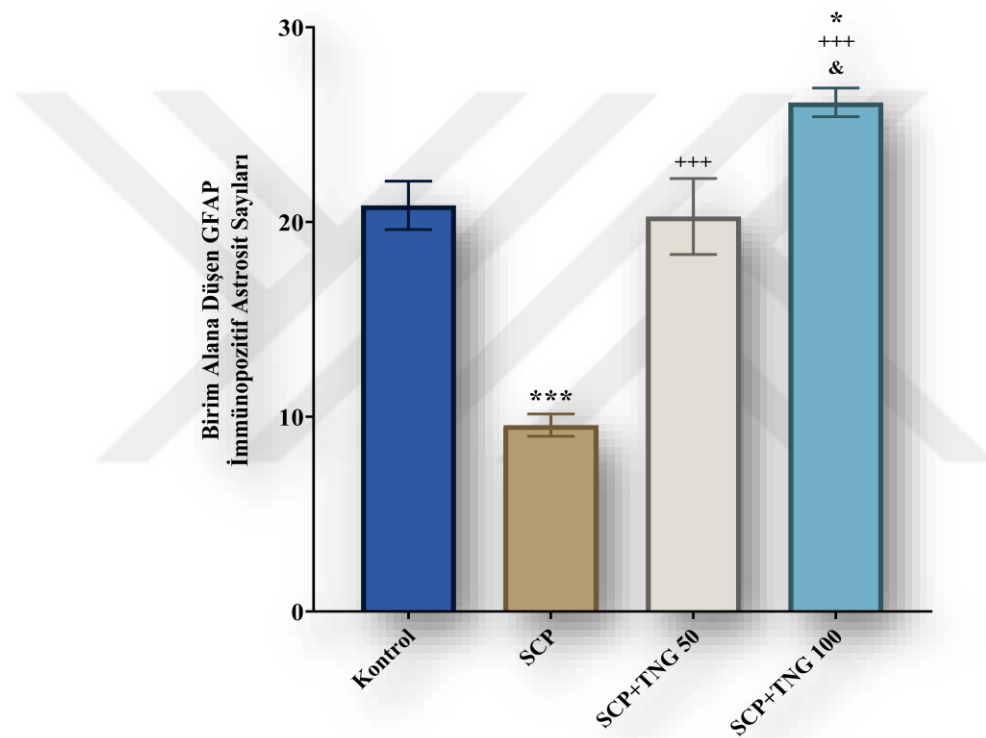


Şekil 5.12. 14 gün süreyle düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol, A), SCP ile amnezi oluşturulmuş (SCP+Kontrol, B), 14 gün süreyle düzenli olarak 50 mg/kg veya 100 mg/kg TNG uygulanan ve bunu takiben SCP uygulanan amnezik (SCP+TNG50, C ve SCP+TNG100, D) sıçanların hipokampal DG alanlarında GFAP immünoaktivitelerinin temsili görüntüleri (Ölçek: 10 µm)

Şekil 5.12.'de sunulan fotomikrografta; DG bölgesindeki granüler hücre katmanında bulunan kahverengi ve yıldızsı morfolojik yapıya sahip olan alanlar, GFAP immünopozitif astrosit hücrelerinin varlığını göstermektedir. Kontrol grubuna (Şekil 5.12A-5.13) kıyasla; astrosit sayısının, SCP uygulamasına bağlı olarak anlamlı seviyede azaldığı (Şekil 5.12B-5.13) görülmüştür. TNG tedavisinin (Şekil 5.12C, D-5.13) ise doza

bağlı olarak, SCP uygulanmış amnezik (Şekil 5.12B-5.13) sıçanlardaki azalmış olan GFAP immüno pozitif astrosit hücre sayısını anlamlı olarak arttırdığı görülmüştür.

14 gün boyunca düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol), SCP uygulanan amnezik (SCP+Kontrol), 14 gün süreyle düzenli olarak 50 mg/kg veya 100 mg/kg TNG uygulanan ve bunu takiben SCP uygulanan amnezik (SCP+TNG50 ve SCP+TNG100) sıçanların dokularından alınmış koronal beyin kesitlerinin hipokampal DG bölgesinden elde edilmiş fotomikrograflarda birim alana düşen GFAP immüno pozitif hücre sayıları, Şekil 5.13.'te verilmiştir [$F(3,24)=31,09$; $p<0,001$].



Şekil 5.13. 14 gün boyunca düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol), SCP uygulanan amnezik (SCP+Kontrol), 14 gün süreyle düzenli olarak 50 mg/kg veya 100 mg/kg TNG uygulanan ve bunu takiben SCP uygulanan amnezik (SCP+TNG50 ve SCP+TNG100) sıçanların hipokampal DG alanlarında birim alana düşen GFAP immüno pozitif hücre sayıları. Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık * $p<0,05$; *** $p<0,001$; SCP+Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık +++ $p<0,001$; SCP+TNG50 grubuna göre anlamlı farklılık & $p<0,05$; Tek yönlü varyans analizi, takiben Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi, $n=7$.

Bu araştırmada SCP ile amnezik modeli oluşturulmuş sıçanların incelenen tüm hipokampal formasyonlarında (CA₁, CA₃ ve DG) GFAP immüno reaktivitesinin düştüğü ve astrosit sayılarında azalma meydana geldiği saptanmıştır (Şekil 5.8.-5.13.). SCP'nin

glial plastisite belirteci olan GFAP'ı etkilediği ve değişen GFAP ekspresyonunun neticesinde; protein miktarındaki azalışın, sinaptik dallanmayı azalttığı ve sinaptik fonksiyonlarda patolojik durumlara sebebiyet verdiği görülmektedir (Steffek vd., 2008; Konar vd., 2011). Konar ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; *i.p.* SCP uygulaması sonucu farelerde, BDNF ve GFAP immünoreaktivitesinde azalma rapor edilmiş; aynı çalışma ekibinin yaptığı bir başka araştırmada ise yine SCP indüksiyonu ile oluşturulan amnezi modeli sonucunda, GFAP üzerinde benzer bir azalma trendi görülmüştür. Bu sonuçların SCP'nin GFAP üzerindeki olumsuz etkisine işaret ettiği bildirilmiştir (Konar vd., 2011; Konar vd., 2015).

Tedavi grupları açısından sonuçlar incelendiğinde ise; tedavi edilmeyen amnezik sıçanlarla karşılaştırıldığında, TNG'nin hipokampal formasyona ait CA₁, CA₃ ve DG alt alanlarındaki GFAP yoğunluğunda her iki dozda da anlamlı düzeyde artışa yol açtığı gözlenmiştir. Bu bağlamda, TNG uygulaması sonucu artan GFAP immünoreaktif hücre sayısının, SCP kaynaklı amnezinin olumsuz etkilerine (zayıflamış glial plastisite gibi) karşı bu flavonoidin koruyucu bir etkinliği olduğuna işaret ettiği söylenebilir.

Literatürde TNG'nin nörodejenerasyon ve nöroinflamasyon modelleri üzerinde çeşitli mekanizmalarla olumlu etkiler gösterdiğini bildiren çalışmalar yer almaktadır. Örneğin, kronik MPTP/probenesid enjeksiyonu ile gerçekleştirilen Parkinson modelinde oral TNG uygulamasının, dopaminerjik nöronlarda ve astrositlerde çeşitli genlerin mRNA seviyelerini arttırdığı ve böylelikle nöronal koruma sağladığı bildirilmiştir. Nigrostriatal bütünlüğün idamesinde TNG'nin nöroprotektif etkinliğinde kısmen de olsa aktivite olmuş astrositlerin rolü olduğuna dikkat çekilmiştir (Hashida vd., 2012). Dopaminerjik bir nörotoksin olan 6-hidroksidopamin (6-OHDA)'in beyne unilateral infüzyonu aracılığıyla gerçekleştirilen Parkinson hastalığı modelinde ise, 4 gün boyunca *per oral* olarak 20 mg/kg dozunda TNG uygulamasının; 6-OHDA kaynaklı tirozin hidroksilaz pozitif (TH+) hücre kaybını ve striatal dopamin deplesyonunu iyileştirdiği bildirilmiştir (Datla vd., 2001).

TNG'nin oksijen-glukoz deprivasyonu uygulanmış insan serebral mikrovasküler endotel hücreleri üzerindeki koruyucu etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada; TNG endotel hücre canlılığını arttırmış, ayrıca süperoksit dismutaz aktivitesinde artış, reaktif oksijen türleri ve malondialdehit seviyelerinde ise azalma meydana getirmiştir. TNG'nin c-Jun N-terminal kinaz sinyal yolağı aktivasyonunu inhibe ederek oksijen-glukoz

deprivasyonu kaynaklı hasarı iyileştirebileceği ve iskemi/reperfüzyon hasarı ve ilişkili patolojilerde fayda sağlayabileceği bildirilmiştir (Zhou vd., 2019).

TNG'nin ayrıca diğer beş farklı *Citrus* türevi flavonoid ile birlikte PC12D hücrelerinde ve hipokampal nöronlarda cAMP yanıt elemanı (CRE)-bağlı transkripsiyonu uyardığı ve nörit büyümesini desteklediği rapor edilmiştir (Nagase vd., 2005; Kawahata vd., 2013). CRE transkripsiyonunun regülasyonunun çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda bozulduğu bilinmektedir (Chalovich vd., 2006). cAMP/PKA/ERK/CREB sinyal yolu, öğrenme ve bellek fonksiyonları için çok önem taşımakta olup; bu yolağın aktivasyonunun da TNG'nin nöroprotektif etkisine katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (Ljungberg vd., 2012; Kawahata vd., 2013; Braidy vd., 2017).

Primer rat mikrogliası ve BV-2 mikrogliyal hücre kültürü modelleri üzerinde, lipopolisakarit (LPS) ile stimülasyon sonrası ortaya çıkan nörotoksisitede TNG'nin artmış mikrogliyal aktivasyon üzerindeki etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada ise; TNG'nin, NO, prostaglandin E₂ (PGE₂), TNF- α , IL-1 β ve IL-6 üretimini doza bağlı şekilde azalttığı ortaya koyulmuştur. Mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) protein seviyeleri ve NF- κ B protein sinyal yolağı incelendiğinde ise, bu flavonoidin ERK, N-terminal Kinaz (JNK) ve p38'in LPS kaynaklı fosforilasyonunu belirgin şekilde inhibe ettiği rapor edilmiştir (Shu vd., 2014). TNG'nin LPS ile uyarılan mikrogliada antiinflamatuvar etkisinin incelendiği bir diğer çalışmada ise; TNG'nin inflamatuvar hedef proteinler olan matriks metaloproteinaz (MMP)-3 ve MMP-8'in aktivitesini, mRNA seviyelerini ve protein seviyelerini inhibe ettiği bildirilmiştir (Lee vd., 2016,). Bu sonuçlar, TNG'nin mikrogliadaki güçlü antiinflamatuvar ve antioksidan etkisini ortaya koymaktadır.

Tüm bu bilgiler göz önüne alındığında; bu çalışmada TNG'nin SCP'nin yol açtığı hasar ve/veya disfonksiyonlara karşı nöronal ve glial iyileşme sağlaması literatürle son derece uyumlu görünmektedir. Söz konusu mekanizmalar, nöronlar ve nöronları destekleyen astrosit gibi yapıların morfolojilerinde ve yoğunluklarındaki değişikliklerin sebebi olabilecek olup, bunların daha detaylı çalışmalarla incelenmesi; TNG'nin kognitif fonksiyonlardaki potansiyel etkisinin klinik çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Nöroproteksiyon, sinirlerin dejenerasyonunu önleyen, nöral yapı ve fonksiyonlarının devamlılığını sağlayan ve böylece SSS'yi koruyan işleyiş ve mekanizmalardır (Rehman vd., 2019).

Nörodejeneratif hastalıklara sahip insanlardaki global artışla birlikte, bu alandaki araştırmalar da hız kazanmıştır. Etki gücü yüksek, yan etki profili düşük tedavi stratejileri geliştirilmeye çalışılırken doğal kaynaklı ilaçlara da ilgi artmıştır. Flavonoidler, nöroprotektif etkilerinden dolayı bu anlamda umut verici terapötik bitkisel maddeler olarak karşımıza çıkmaktadır. Çeşitli çalışmalar, flavonoidlerin kullanımının Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde faydalı olabileceğini göstermiştir (Zhao vd., 2019). Çalışmalar bu bileşiklerin, nörodejeneratif hastalıklar ve yaşlanmanın ayrılmaz bir parçası olan bellek kayıpları ve bilişsel kayıplar üzerinde olumlu etkileri olduğunu göstermiştir (Vauzour vd., 2008).

Bu tez çalışmasında, SCP ile amnezi modeli oluşturulmuş sıçanlarda polimetoksiflavon türevi olan TNG uygulamasının, hipokampal morfoloji üzerindeki etkileri incelenmiş ve hipokampal formasyonun ilişkili bölgelerinde yol açtığı immunoreaktivite değişikliklerinin nörogenез, nöroplastisite ve glial plastisite gibi süreçlerle ilişkileri araştırılmıştır.

İlk olarak, SCP ile amnezi modeli oluşturulmuş sıçanların hipokampal formasyonlarındaki morfolojik değişikliklerinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, Nissl protokolü uygulanarak hipokampusün CA₁, CA₃ ve DG alt-alanları incelenmiştir. SCP uygulaması; nöronların sayısında azalmaya, nöronların morfolojik yapılarında farklılıklara ve hücre tabakalarında bozulmalara yol açmış; TNG uygulaması ise her iki dozda da bu olumsuz değişiklikleri belirli düzeyde iyileştirmiştir.

Çalışmanın devamında, post-mitotik nörona spesifik işaret proteini olan NeuN immünoreaktivitesi değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, SCP uygulaması ile hipokampal CA₁, CA₃ ve DG bölgelerinde azalmış olan NeuN immünopozitif hücre sayısının TNG uygulaması ile arttığını göstermiştir.

TNG'nin nörogenез ve nöronal morfoloji üzerindeki muhtemel etkisinin incelenmesinin ardından, bu flavonoidin SCP ile amnezi modeli oluşturulmuş sıçanlardaki etkisine astrositlerin muhtemel katılımı da incelenmiştir. Çalışmamızın diğer

sonuçlarıyla uyumlu şekilde SCP uygulaması hipokampal CA₁, CA₃ ve DG bölgelerinde GFAP yoğunluğunda azalmaya yol açarken; TNG uygulaması ile azalmış olan immüno pozitif hücre sayısının arttığı görülmüştür.

Bu çalışmada TNG'nin SCP'nin yol açtığı hasar ve/veya kognitif disfonksiyonlara karşı nöronal ve glial protektif etki gösterebileceği ortaya koyulmuştur. Diğer yandan, bu sonuçların TNG tedavisinin hipokampal morfoloji üzerine etkilerine ilişkin daha detaylı çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

TNG'nin, SCP kaynaklı amnezinin neden olduğu kognitif bozukluklara karşı antioksidan, terapötik ve nöroprotektif etkilerinin; nöronal canlılık, büyüme ve farklılaşmanın temel modülatörleri olan nörotrofik faktörler ile bağlantılı olması muhtemeldir. Başta BDNF olmak üzere; NGF, NT-3 ve NT-4 gibi diğer nörotrofinlerin nöronal plastisiteye destek oldukları ve kognitif fonksiyonlara olan katkıları bildirilmiştir (von Bohlen Und Halbach, 2007; Bothwell, 2014; Lim vd., 2014; Mitre vd., 2017; Katiyar vd., 2022). Bu bağlamda TNG'nin; nörotrofik faktörlerin ekspresyonları, miktarları ve fonksiyonları üzerine muhtemel etkileri de aydınlatılması gereken diğer başlıklar arasında yer almaktadır.

Kognitif fonksiyonların, nöronal hücre gövdeleri ve sinaptik bağlantılardaki değişiklikler ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu sebeple, bu tez çalışmasında TNG'nin hipokampal formasyondaki nöroenez süreçlerindeki rolü anti-NeuN ile incelenmiştir. Ek olarak, presinaptik bölgedeki nörotransmisyonunda rol oynayan proteinlerin ekspresyonlarında ve miktarlarında meydana gelen değişimlerin anti-sinaptofizin ile; postsinaptik reseptörler ve sitoskeletal elementlerle ilişkili immüno reaktivite değişikliklerinin de anti-postsinaptik yoğunluk-95 (PSD-95) ile analiz edilmesi; TNG'nin öğrenme ve bellekteki presinaptik ve postsinaptik süreçler ile ilişkisini ve dolayısıyla sinaptogenez/sinaptik plastisitedeki rolünü kavramamıza olanak sağlayacaktır (Choi vd., 2011; Hajjar vd., 2013; Luo vd., 2015).

Doublecortin (DCX) ekspresyonu; nöronal göç, akson uzaması ve sinaptogenez ile bağlantılı olup; yeni oluşan hücreler için bir belirteç olarak tanımlanmakta; azalmış DCX ekspresyonu ise nöronal kayıpları ifade etmektedir (D'Alessio vd., 2010). Bu bağlamda; postmitotik evredeki nöronları anti-NeuN ile, yeni oluşan nöronları ise anti-DCX ile analiz etmek, amneziye sebebiyet veren hasarın sonuçlarını nöronların tüm yaşam

evrelerinde inceleme ve yorumlama fırsatını sağlayacak ve TNG'nin patolojik süreçlerdeki terapötik etkisinin aydınlatılmasına yardımcı olacaktır.

Nissl histokimyasal boyama yönteminin, Nissl granüllerini tanımlama dışında; hücre dağılımı ve hücre morfolojisi hakkında bilgi verdikleri bilinmektedir (Avcı vd., 2004; Drouin vd., 2022). Bunlara ek olarak; ilişkili beyin bölgelerindeki hacim değişikliklerini inceleme ve immünofloresan boyama yöntemleriyle desteklenen bir araştırma, morfolojik analizin daha bütüncül ve geniş bir bakış açısıyla gerçekleştirilmesine olanak tanıyacak olup, bilişsel süreçlerle yakından bağlantılı alanlardaki olası değişikliklerin ayrıntılı şekilde incelenmesini sağlayacaktır (Sills vd., 2020; Radzicki vd., 2023).

Günümüzde demansın ve kognitif bozuklukların eşlik ettiği hastalıkların prevalanslarındaki hızlı artışa rağmen klinikte kullanılan ilaç sayısının oldukça az olduğu göz önünde bulundurulursa, bilişsel fonksiyonları iyileştirici özelliğe sahip farmakolojik ajanların ve bu maddelerin etkilerinin altında yatan mekanizmaların keşfi büyük önem taşımaktadır. Klinik araştırmalar ile bu bulguların desteklenmesi gerekmektedir birlikte; bu çalışma sırasında, TNG'nin öğrenme-bellek ile ilişkili alanlarda morfolojik ve moleküler açıdan olumlu değişikliklerinin ortaya koyulması, Alzheimer hastalığı başta olmak üzere bilişsel işlevlerin gerilediği çeşitli hastalıklara ve tedavilerine yönelik bir bakış açısı sağlaması açısından önem taşımaktadır.

KAYNAKÇA

- Adams, W., Kusljic, S., van den Buuse, M. (2008). Serotonin depletion in the dorsal and ventral hippocampus: effects on locomotor hyperactivity, prepulse inhibition and learning and memory. *Neuropharmacology*, 55 (6), 1048-1055.
- Afshar, S., Shahidi, S., Baooshi, H., Hoseini, M., Esmaeili, M., Hashemi-Firouzi, N., Komaki, A. (2023). The role of hippocampal 5-HT(1D) and 5-HT(1F) receptors on learning and memory in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 396 (7), 1451-1460.
- Alekseeva, O. S., Gusel'nikova, V. V., Beznin, G. V., Korzhevskii, D. E. (2015). Prospects of the nuclear protein NeuN application as an index of functional state of the vertebrate nerve cells. *Zh. Evol. Biokhim. Fiziol.*, 51 (5), 313-323.
- Altman, J. (1963). Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat. Rec.*, 145, 573-591.
- Amaral, D. G., Ishizuka, N., Claiborne, B. (1990). Neurons, numbers and the hippocampal network. *Prog. Brain Res.*, 83, 1-11.
- Andreazza, A. C., Kauer-Sant'anna, M., Frey, B. N., Bond, D. J., Kapczinski, F., Young, L. T., Yatham, L. N. (2008). Oxidative stress markers in bipolar disorder: a meta-analysis. *J. Affect Disord.*, 111 (2-3), 135-144.
- Ashrafizadeh, M., Ahmadi, Z., Mohammadinejad, R., Ghasemipour Afshar, E. (2020). Tangeretin: a mechanistic review of its pharmacological and therapeutic effects. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.*, 31 (4), 1-12.
- Assini, J. M., Mulvihill, E. E., Huff, M. W. (2013). Citrus flavonoids and lipid metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.*, 24 (1), 34-40.
- Atri, A., Sherman, S., Norman, K. A., Kirchhoff, B. A., Nicolas, M. M., Greicius, M. D., Cramer, S. C., Breiter, H. C., Hasselmo, M. E., Stern, C. E. (2004). Blockade of central cholinergic receptors impairs new learning and increases proactive interference in a word paired-associate memory task. *Behav. Neurosci.*, 18(1), 223-236.
- Avcı, B., Kahveci, Z., Sırmalı, Ş. A. (2004). Mikrodalga ışıınımyı yardımıyla myelinli liflerin değeriendirilmesi. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 30 (3), 163-171.
- Baidoo, N., Wolter, M., Leri, F. (2020). Opioid withdrawal and memory consolidation. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 114, 16-24.

- Bailey, J. M., Oliveri, A. N., Levin, E. D. (2015). Pharmacological analyses of learning and memory in zebrafish (*Danio rerio*). *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 139, 103-111.
- Bao, J., Liang, Z., Gong, X., Zhao, Y., Wu, M., Liu, W., Tu, C., Wang, X., Shu, X. (2022). Tangeretin inhibits BACE1 activity and attenuates cognitive impairments in AD model mice. *J. Agric. Food Chem.*, 70 (5), 1536-1546.
- Barak, S., Weiner, I. (2011). Putative cognitive enhancers in preclinical models related to schizophrenia: the search for an elusive target. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 99 (2), 164-189.
- Barrett K.E., Barman S.M., Brooks H.L., Yuan J. (2019). *Ganong's Review of Medical Physiology* (26th Edition). New York: Mac Graw Hill Medical. 214-676.
- Bazzari, A., Parri, H. (2019). Neuromodulators and long-term synaptic plasticity in learning and memory: a steered-glutamatergic perspective. *Brain Sciences.*, 9 (11), 300.
- Berke, J. D. (2018). What does dopamine mean? *Nature Neuroscience*, 21 (6), 787-793.
- Blanco-Suárez, E., Caldwell, A. L., Allen, N. J. (2017). Role of astrocyte-synapse interactions in CNS disorders. *J. Physiol.*, 595 (6), 1903-1916.
- Bliss, T. V. P., Gardner-Medwin, A. R. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.*, 232 (2), 357-374.
- Bothwell, M. (2014). NGF, BDNF, NT3, and NT4. *Handb Exp Pharmacol.*, 220, 3-15.
- Braidy, N., Behzad, S., Habtemariam, S., Ahmed, T., Daglia, M., Nabavi, S. M., Sobarzo-Sanchez, E., Nabavi, S. F. (2017). Neuroprotective effects of citrus fruit-derived flavonoids, nobiletin and tangeretin in Alzheimer's and Parkinson's disease. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.*, 16 (4), 387-397.
- Bruel-Jungerman, E., Rampon, C., Laroche, S. (2007). Adult hippocampal neurogenesis, synaptic plasticity and memory: facts and hypotheses. *Rev. Neurosci.*, 18 (2), 93-114.
- Brunton, L. L., Knollmann, B. r. C., Hilal-Dandan, R. (2018). Goodman & Gilman's : The Pharmacological Basis of Therapeutics (2nd edition). New York, N.Y., McGraw-Hill Education LLC.

- Buhot, M. C., Wolff, M., Benhassine, N., Costet, P., Hen, R., Segu, L. (2003). Spatial learning in the 5-HT_{1B} receptor knockout mouse: selective facilitation/impairment depending on the cognitive demand. *Learn. Mem.*, 10 (6), 466-477.
- Castillo Díaz, F., Caffino, L., Fumagalli, F. (2021). Bidirectional role of dopamine in learning and memory-active forgetting. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 131, 953-963.
- Chalovich, E. M., Zhu, J. H., Caltagarone, J., Bowser, R., Chu, C. T. (2006). Functional repression of cAMP response element in 6-hydroxydopamine-treated neuronal cells. *J. Biol. Chem.*, 281 (26), 17870-17881.
- Chen, B. H., Ahn, J. H., Park, J. H., Choi, S. Y., Lee, Y. L., Kang, I. J., Hwang, I. K., Lee, T.-K., Shin, B.-N., Lee, J.-C., Hong, S., Jeon, Y. H., Shin, M. C., Cho, J. H., Won, M.-H., Lee, Y. J. (2018). Effects of scopolamine and melatonin cotreatment on cognition, neuronal damage, and neurogenesis in the mouse dentate gyrus. *Neurochem. Res.*, 43 (3), 600-608.
- Choi, J. G., Yang, W. M., Kang, T. H., Oh, M. S. (2011). Effects of optimized-SopungSunkiwon on memory impairment and enhancement. *Neurosci. Lett.*, 491 (2), 93-98.
- Cubelli, R., Della Sala, S. (2021). Amnesia. *Cortex*, 136, 158.
- D'Alessio, L., Konopka, H., López, E. M., Seoane, E., Consalvo, D., Oddo, S., Kochen, S., López-Costa, J. J. (2010). Doublecortin (DCX) immunoreactivity in hippocampus of chronic refractory temporal lobe epilepsy patients with hippocampal sclerosis. *Seizure*, 19 (9), 567-572.
- Dai, H., Zhou, Y., Lu, Y., Zhang, X., Zhuang, Z., Gao, Y., Liu, G., Chen, C., Ma, J., Li, W., Hang, C. (2022). Decreased expression of CIRP induced by therapeutic hypothermia correlates with reduced early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *J. Clin. Med.*, 11 (12), 3411.
- Datla, K. P., Christidou, M., Widmer, W. W., Rooprai, H. K., Dexter, D. T. (2001). Tissue distribution and neuroprotective effects of citrus flavonoid tangeretin in a rat model of Parkinson's disease. *Neuro. Report.*, 12 (17), 3871-3875.
- Demir Özkay, Ü., Can Ö, D., Sağlık, B. N., Turan, N. (2017). A benzothiazole/piperazine derivative with acetylcholinesterase inhibitory activity: Improvement in streptozotocin-induced cognitive deficits in rats. *Pharmacol. Rep.*, 69 (6), 1349-1356.

- Deng, Y., Li, W., Niu, L., Luo, X., Li, J., Zhang, Y., Liu, H., He, J., Wan, W. (2022). Amelioration of scopolamine-induced learning and memory impairment by the TRPV4 inhibitor HC067047 in ICR mice. *Neurosci. Lett.*, 767, 136209.
- Drouin, E., Kwiatkowski, A., Hautecoeur, P. (2022). Franz Nissl's multiple contributions. *Lancet Neurol.*, 21 (12), 1084.
- Duan, W., Zhang, Y.-P., Hou, Z., Huang, C., Zhu, H., Zhang, C.-Q., Yin, Q. (2016). Novel insights into NeuN: from neuronal marker to splicing regulator. *Mol. Neurobiol.*, 53 (3), 1637-1647.
- Duerr, J. S., Quinn, W. G. (1982). Three *Drosophila* mutations that block associative learning also affect habituation and sensitization. *Natl. Acad. Sci. Lett.*, 79 (11), 3646-3650.
- Eng, L. F., Vanderhaeghen, J. J., Bignami, A., Gerstl, B. (1971). An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res.*, 28 (2), 351-354.
- Eric Kandel, James H. Schwartz, Thomas M. Jessell, Steven Siegelbaum, A. J. Hudspeth (2014). Learning and memory. Eric Kandel and James H. Schwartz (Ed.) *Principles of Neural Science* içinde (s.1-23) (5th Edition). New York: McGraw-Hill Education.
- Eric P. Widmaier, Hershel Raff, Kevin T. Strang (2019). *Vander's Human Physiology* (15th Edition). New York: Mac Graw Hill Medical. 248-256.
- Eroglu, C., Barres, B. A. (2010). Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature*, 468 (7321), 223-231.
- Essa, H., Peyton, L., Hasan, W., León, B. E., Choi, D.-S. (2022). Implication of adult hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease and potential therapeutic approaches. *Cells*, 11 (2), 286.
- Estall, L. B., Grant, S. J., Cicala, G. A. (1993). Inhibition of nitric oxide (NO) production selectively impairs learning and memory in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 46 (4), 959-962.
- Fatima, A., Rahul, Siddique, Y. H. (2019). Role of tangeritin against cognitive impairments in transgenic *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.*, 705, 112-117.
- Fatima, A., Siddique, Y. H. (2019). Role of flavonoids in neurodegenerative disorders with special emphasis on tangeritin. *CNS Neurol. Disord Drug Targets.*, 18 (8), 581-597.

- Fazekas, C. L., Szabó, A., Török, B., Bánrévi, K., Correia, P., Chaves, T., Daumas, S., Zelena, D. (2022). A New player in the hippocampus: a review on VGLUT3+ neurons and their role in the regulation of hippocampal activity and behaviour. *Int. J. Mol. Sci.*, 23 (2), 790.
- Fields, R. D., Araque, A., Johansen-Berg, H., Lim, S.-S., Lynch, G., Nave, K.-A., Nedergaard, M., Perez, R., Sejnowski, T., Wake, H. (2014). Glial biology in learning and cognition. *The Neuroscientist*, 20 (5), 426-431.
- Funaro, A., Wu, X., Song, M., Zheng, J., Guo, S., Rakariyatham, K., Rodriguez-Estrada, M. T., Xiao, H. (2016). Enhanced anti-inflammatory activities by the combination of luteolin and tangeretin. *J. Food Sci.*, 81 (5), H1320-1327.
- Gamzu, E. R. (1988). Animal model studies of benzodiazepine-induced amnesia. *Psychopharmacol. Ser.*, 6, 218-229.
- Gasparini, L., Govoni, S., Battaini, F. (1998). A review on the neurobiological basis of memory. *Arch. Gerontol. Geriatr.*, 26, 225-234.
- Genoud, C., Quairiaux, C., Steiner, P., Hirling, H., Welker, E., Knott, G. W. (2006). Plasticity of astrocytic coverage and glutamate transporter expression in adult mouse cortex. *PLoS Biol.*, 4 (11), 343.
- Ghasemi-Tarie, R., Kiasalari, Z., Fakour, M., Khorasani, M., Keshtkar, S., Baluchnejadmojarad, T., Roghani, M. (2022). Nobiletin prevents amyloid β 1-40-induced cognitive impairment via inhibition of neuroinflammation and oxidative/nitrosative stress. *Metab. Brain Dis.*, 37 (5), 1337-1349.
- Giordano, M., Prado-Alcalá, R. A. (1986). Retrograde amnesia induced by post-trial injection of atropine into the caudate-putamen. Protective effect of the negative reinforcer. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 24 (4), 905-909.
- Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A., Shors, T. J. (1999). Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat. Neurosci.*, 2 (3), 260-265.
- Gould, E., McEwen, B. S., Tanapat, P., Galea, L. A., Fuchs, E. (1997). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J. Neurosci.*, 17 (7), 2492-2498.
- Gray, S. L., Anderson, M. L., Dublin, S., Hanlon, J. T., Hubbard, R., Walker, R., Yu, O., Crane, P. K., Larson, E. B. (2015). Cumulative use of strong anticholinergics and incident dementia: a prospective cohort study. *JAMA Intern. Med.*, 175 (3), 401-407.

- Griego, E., Galván, E. J. (2021). Metabotropic glutamate receptors at the aged mossy fiber - CA3 synapse of the hippocampus. *Neuroscience*, 456, 95-105.
- Guan, J., Zhang, R., Dale-Gandar, L., Hodgkinson, S., Vickers, M. H. (2010). NNZ-2591, a novel diketopiperazine, prevented scopolamine-induced acute memory impairment in the adult rat. *Behav. Brain Res.*, 210 (2), 221-228.
- Guo, X. Q., Cao, Y. L., Hao, F., Yan, Z. R., Wang, M. L., Liu, X. W. (2017). Tangeretin alters neuronal apoptosis and ameliorates the severity of seizures in experimental epilepsy-induced rats by modulating apoptotic protein expressions, regulating matrix metalloproteinases, and activating the PI3K/Akt cell survival pathway. *Adv. Med. Sci.*, 62 (2), 246-253.
- Haam, J., Yakel, J. L. (2017). Cholinergic modulation of the hippocampal region and memory function. *J. Neurochem.*, 142, 111-121.
- Hajjar, T., Goh, Y. M., Rajion, M. A., Vidyadaran, S., Li, T. A., Ebrahimi, M. (2013). Alterations in neuronal morphology and synaptophysin expression in the rat brain as a result of changes in dietary n-6: n-3 fatty acid ratios. *Lipids Health Dis.*, 12, 113.
- Hall, J. E., Guyton A.C. (2011). *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology* (12th Edition). Philadelphia: Saunders/Elsevier. 705-709.
- Hashida, K., Kitao, Y., Sudo, H., Awa, Y., Maeda, S., Mori, K., Takahashi, R., Iinuma, M., Hori, O. (2012). ATF6 α promotes astroglial activation and neuronal survival in a chronic mouse model of Parkinson's disease. *PLoS one.*, 7 (10), e47950.
- Heaney, C. F., Kinney, J. W. (2016). Role of GABA(B) receptors in learning and memory and neurological disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 63, 1-28.
- Honda, M., Tsuruta, R., Kaneko, T., Kasaoka, S., Yagi, T., Todani, M., Fujita, M., Izumi, T., Maekawa, T. (2010). Serum glial fibrillary acidic protein is a highly specific biomarker for traumatic brain injury in humans compared with S-100B and neuron-specific enolase. *J. Trauma Acute Care Surg.*, 69 (1), 104-109.
- Hung, W. L., Chang, W. S., Lu, W. C., Wei, G. J., Wang, Y., Ho, C. T., Hwang, L. S. (2018). Pharmacokinetics, bioavailability, tissue distribution and excretion of tangeretin in rat. *J. Food Drug Anal.*, 26 (2), 849-857.

- Inada, C., Thi Le, X., Tsuneyama, K., Fujiwara, H., Miyata, T., Matsumoto, K. (2013). Endogenous acetylcholine rescues NMDA-induced long-lasting hippocampal cell damage via stimulation of muscarinic M1 receptors: Elucidation using organic hippocampal slice cultures. *Eur. J. Pharmacol.*, 699 (1), 150-159.
- Katiyar, P., Singh Rathore, A., Banerjee, S., Nathani, S., Zahra, W., Singh, S. P., Sircar, D., Roy, P. (2022). Wheatgrass extract imparts neuroprotective actions against scopolamine-induced amnesia in mice. *Food Funct.*, 13 (16), 8474-8488.
- Katzung, B. G. (2017). *Basic & Clinical Pharmacology* (14th Edition) McGraw Hill. 367-380.
- Kawahata, I., Yoshida, M., Sun, W., Nakajima, A., Lai, Y., Osaka, N., Matsuzaki, K., Yokosuka, A., Mimaki, Y., Naganuma, A., Tomioka, Y., Yamakuni, T. (2013). Potent activity of nobiletin-rich citrus reticulata peel extract to facilitate cAMP/PKA/ERK/CREB signaling associated with learning and memory in cultured hippocampal neurons: identification of the substances responsible for the pharmacological action. *J. Neural Transm.*, 120 (10), 1397-1409.
- Kety, S. (1972). Brain Catecholamines, Affective States and Memory. J. L. McGaugh (Ed.) *The Chemistry of Mood, Motivation, and Memory: The Proceedings of an Interdisciplinary Conference on The Chemistry of Mood, Motivation, and Memory held at the University of California, San Francisco, in October 1971* içinde (s.65-80) Boston, MA: Springer US.
- Kim, D.-J., Lee, M. J., Cho, H. B., Jo, G. H., Hwang, H.-I., Shin, H.-K., Chung, Y. Y., Jun, Y. H. (2023). Differential expression of Pax6 following bilateral common carotid artery occlusion. *In Vivo*, 37 (2), 655-660.
- Kimura, Y., Ohue, M., Kitaura, T., Kihira, K. (1999). Amnesic effects of the anticholinergic drugs, trihexyphenidyl and biperiden: differences in binding properties to the brain muscarinic receptor. *Brain Res.*, 834 (1-2), 6-12.
- Kita, Y., Ago, Y., Higashino, K., Asada, K., Takano, E., Takuma, K., Matsuda, T. (2014). Galantamine promotes adult hippocampal neurogenesis via M₁ muscarinic and $\alpha 7$ nicotinic receptors in mice. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 17 (12), 1957-1968.
- Knierim, J. J. (2015). The hippocampus. *Current Biology*, 25 (23), R1116-R1121.
- Kobayashi, K., Yasoshima, Y. (2001). The central noradrenaline system and memory consolidation. *Neuroscientist*, 7 (5), 371-376.

- Konar, A., Gautam, A., Thakur, M. K. (2015). *Bacopa monniera* (CDRI-08) Upregulates the expression of neuronal and glial plasticity markers in the brain of scopolamine induced amnesic mice. *J. Evid. Based Complementary Altern. Med.*, 2015, 1-9.
- Konar, A., Shah, N., Singh, R., Saxena, N., Kaul, S. C., Wadhwa, R., Thakur, M. K. (2011). Protective role of Ashwagandha leaf extract and its component withanone on scopolamine-induced changes in the brain and brain-derived cells. *PLoS One*, 6 (11), 1.
- Kotan, Z., Sarandöl, A., Eker, S. S., Akkaya, C. (2009). Depresyon, nöroplastisite ve nörotrofik faktörler. *Curr. Approach Psychiatry*, 1 (1), 36-44.
- Kreisel, T., Frank, M. G., Licht, T., Reshef, R., Ben-Menachem-Zidon, O., Baratta, M. V., Maier, S. F., Yirmiya, R. (2014). Dynamic microglial alterations underlie stress-induced depressive-like behavior and suppressed neurogenesis. *Mol. Psychiatry*, 19 (6), 699-709.
- Kukolja, J., Thiel, C. M., Fink, G. R. (2009). Cholinergic stimulation enhances neural activity associated with encoding but reduces neural activity associated with retrieval in humans. *J. Neurosci.*, 29 (25), 8119-8128.
- Kumar, A. (2011). Long-Term Potentiation at CA3-CA1 Hippocampal synapses with special emphasis on aging, disease, and stress. *Front Aging Neurosci.*, 3, 7.
- Kurosinski, P., Götz, J. (2002). Glial cells under physiologic and pathologic conditions. *Arch. Neurol.*, 59 (10), 1524.
- Lauri, S. E., Palmer, M., Segerstrale, M., Vesikansa, A., Taira, T., Collingridge, G. L. (2007). Presynaptic mechanisms involved in the expression of STP and LTP at CA1 synapses in the hippocampus. *Neuropharmacology*, 52 (1), 1-11.
- Lazarov, O., Hollands, C. (2016). Hippocampal neurogenesis: Learning to remember. *Prog. Neurobiol.*, 138-140, 1-18.
- Lee, B., Shim, I., Lee, H., Hahm, D.-H. (2018). The polymethoxylated flavone, Tangeretin improves cognitive memory in rats experiencing a single episode of prolonged post-traumatic stress. *Anim. Cells Syst. (Seoul)*, 22 (1), 54-62.
- Lee, Y. Y., Lee, E.-J., Park, J.-S., Jang, S.-E., Kim, D.-H., Kim, H.-S. (2016). Anti-inflammatory and antioxidant mechanism of tangeretin in activated microglia. *J. NeuroImmune Pharmacol.*, 11 (2), 294-305.

- Levin, E. D., Buccafusco, J. J. (2006). *Frontiers in Neuroscience*. E. D. Levin and J. J. Buccafusco (Ed.) *Animal Models of Cognitive Impairment* içinde (s.1-2) London: Taylor & Francis.
- Li, J., Gao, L., Sun, K., Xiao, D., Li, W., Xiang, L., Qi, J. (2016). Benzoate fraction from *Gentiana rigescens* Franch alleviates scopolamine-induced impaired memory in mice model in vivo. *J. Ethnopharmacol.*, 193, 107-116.
- Li, J., Wen, P. Y., Li, W. W., Zhou, J. (2015). Upregulation effects of tanshinone IIA on the expressions of NeuN, Nissl body, and I κ B and downregulation effects on the expressions of GFAP and NF- κ B in the brain tissues of rat models of Alzheimer's disease. *NeuroReport*, 26 (13), 758-766.
- Lim, S., Moon, M., Oh, H., Kim, H. G., Kim, S. Y., Oh, M. S. (2014). Ginger improves cognitive function via NGF-induced ERK/CREB activation in the hippocampus of the mouse. *J. Nutr. Biochem.*, 25 (10), 1058-1065.
- Ljungberg, M. C., Ali, Y. O., Zhu, J., Wu, C. S., Oka, K., Zhai, R. G., Lu, H. C. (2012). CREB-activity and NMNAT2 transcription are down-regulated prior to neurodegeneration, while NMNAT2 over-expression is neuroprotective, in a mouse model of human tauopathy. *Hum. Mol. Genet.*, 21 (2), 251-267.
- Lu, Z., Xu, X., Li, D., Sun, N., Lin, S. (2022). Sea cucumber peptides attenuated the scopolamine-induced memory impairment in mice and rats and the underlying mechanism. *J. Agric. Food Chem.*, 70 (1), 157-170.
- Luo, P., Lu, Y., Li, C., Zhou, M., Chen, C., Lu, Q., Xu, X., He, Z., Guo, L. (2015). Long-lasting spatial learning and memory impairments caused by chronic cerebral hypoperfusion associate with a dynamic change of HCN1/HCN2 expression in hippocampal CA1 region. *Neurobiol. Learn Mem.*, 123, 72-83.
- Malenka, R. C., Bear, M. F. (2004). LTP and LTD. *Neuron*, 44 (1), 5-21.
- Malleret, G., Alarcon, J. M., Martel, G., Takizawa, S., Vronskaya, S., Yin, D., Chen, I. Z., Kandel, E. R., Shumyatsky, G. P. (2010). Bidirectional regulation of hippocampal long-term synaptic plasticity and its influence on opposing forms of memory. *J. Neurosci. Res.*, 30 (10), 3813-3825.
- Massey, P. V., Bashir, Z. I. (2007). Long-term depression: multiple forms and implications for brain function. *Trends Neurosci.*, 30 (4), 176-184.
- Mateos-Aparicio, P., Rodríguez-Moreno, A. (2019). The impact of studying brain plasticity. *Front. Cell. Neurosci.*, 13, 66.

- Memudu, A. E., Adewumi, A. E. (2021). Alpha lipoic acid ameliorates scopolamine induced memory deficit and neurodegeneration in the cerebello-hippocampal cortex. *Metab. Brain Dis.*, 36 (7), 1729-1745.
- Middeldorp, J., Hol, E. M. (2011). GFAP in health and disease. *Prog. Neurobiol.*, 93 (3), 421-443.
- Mitre, M., Mariga, A., Chao, M. V. (2017). Neurotrophin signalling: novel insights into mechanisms and pathophysiology. *Clin. Sci. (Lond)*, 131 (1), 13-23.
- Mohrherr, J., Haber, M., Breitenecker, K., Aigner, P., Moritsch, S., Voronin, V., Eferl, R., Moriggl, R., Stoiber, D., Györfy, B., Brcic, L., László, V., Döme, B., Moldvay, J., Dezső, K., Bilban, M., Popper, H., Moll, H. P., Casanova, E. (2019). JAK–STAT inhibition impairs K-RAS-driven lung adenocarcinoma progression. *Int. J. Cancer Res.*, 145 (12), 3376-3388.
- Moosavi, M., SoukhakLari, R., Moezi, L., Pirsalami, F. (2018). Scopolamine-induced passive avoidance memory retrieval deficit is accompanied with hippocampal MMP2, MMP-9 and MAPKs alteration. *Eur. J. Pharmacol.*, 819, 248-253.
- Nagase, H., Omae, N., Omori, A., Nakagawasai, O., Tadano, T., Yokosuka, A., Sashida, Y., Mimaki, Y., Yamakuni, T., Ohizumi, Y. (2005). Nobiletin and its related flavonoids with CRE-dependent transcription-stimulating and neuritegenic activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 337 (4), 1330-1336.
- Nicholls, R. E., Alarcon, J. M., Malleret, G., Carroll, R. C., Grody, M., Vronskaya, S., Kandel, E. R. (2008). Transgenic mice lacking NMDAR-dependent LTD exhibit deficits in behavioral flexibility. *Neuron*, 58 (1), 104-117.
- Ogura, H., Kosasa, T., Kuriya, Y., Yamanishi, Y. (2000). Donepezil, a centrally acting acetylcholinesterase inhibitor, alleviates learning deficits in hypocholinergic models in rats. *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.*, 22 (2), 89-95.
- Paxinos, G., Watson, C. (2007). *Paxinos & Watson The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. (6th Edition). China Elsevier. 54-62.
- Pepeu, G., Spignoli, G. (1989). Nootropic drugs and brain cholinergic mechanisms. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.*, 13 Suppl, S77-88.
- Poldrack, R. A., Packard, M. G. (2003). Competition among multiple memory systems: converging evidence from animal and human brain studies. *Neuropsychologia*, 41 (3), 245-251.
- Prokopová, I. (2010). Noradrenaline and behavior. *Cesk. Fysiol.*, 59 (2), 51-58.

- Purves, D. (2004). *Neuroscience*. Sunderland, MA, US: Sinauer Associates. 1-773.
- Radzicki, D., Chong, S., Dudek, S. M. (2023). Morphological and molecular markers of mouse area CA2 along the proximodistal and dorsoventral hippocampal axes. *Hippocampus*, 33 (3), 133-149.
- Rehman, M. U., Wali, A. F., Ahmad, A., Shakeel, S., Rasool, S., Ali, R., Rashid, S. M., Madkhali, H., Ganaie, M. A., Khan, R. (2019). Neuroprotective strategies for neurological disorders by natural products: an update. *Curr. Neuropharmacol.*, 17 (3), 247-267.
- Riedel, G., Platt, B., Micheau, J. (2003). Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav. Brain Res.*, 140 (1-2), 1-47.
- Robertson, L. T. (2002). Memory and the brain. *J. Dent. Educ.*, 66 (1), 30-42.
- Rodríguez-Moreno, A., Sihra, T. S. (2011). Metabotropic actions of kainate receptors in the control of glutamate release in the hippocampus. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 717, 39-48.
- Savaş, H. A., Herken, H., Yürekli, M., Uz, E., Tutkun, H., Zoroğlu, S. S., Ozen, M. E., Cengiz, B., Akyol, O. (2002). Possible role of nitric oxide and adrenomedullin in bipolar affective disorder. *Neuropsychobiology*, 45 (2), 57-61.
- Shu, Z., Yang, B., Zhao, H., Xu, B., Jiao, W., Wang, Q., Wang, Z., Kuang, H. (2014). Tangeretin exerts anti-neuroinflammatory effects via NF- κ B modulation in lipopolysaccharide-stimulated microglial cells. *Int. Immunopharmacol.*, 19 (2), 275-282.
- Sills, R. C., Johnson, G. A., Anderson, R. J., Johnson, C. L., Staup, M., Brown, D. L., Churchill, S. R., Kurtz, D. M., Cushman, J. D., Waidyanatha, S., Robinson, V. G., Cesta, M. F., Andrews, D. M. K., Behl, M., Shockley, K. R., Little, P. B. (2020). Qualitative and quantitative neuropathology approaches using magnetic resonance microscopy (diffusion tensor imaging) and stereology in a hexachlorophene model of myelinopathy in sprague-dawley rats. *Toxicol. Pathol.*, 48 (8), 965-980.
- Silva, A. F., Aguiar, M. S., Carvalho, O. S., Santana Lde, N., Franco, E. C., Lima, R. R., Siqueira, N. V., Feio, R. A., Faro, L. R., Gomes-Leal, W. (2013). Hippocampal neuronal loss, decreased GFAP immunoreactivity and cognitive impairment following experimental intoxication of rats with aluminum citrate. *Brain Res.*, 1491, 23-33.

- Stahl, S. M. (2012). *Stahl'in temel psikofarmakolojisi* (3. Baskı) (Çev: İ. Tayfun Uzbay). İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi. 24.
- Steffek, A. E., McCullumsmith, R. E., Haroutunian, V., Meador-Woodruff, J. H. (2008). Cortical expression of glial fibrillary acidic protein and glutamine synthetase is decreased in schizophrenia. *Schizophr. Res.*, 103 (1-3), 71-82.
- Svoboda, J., Popelikova, A., Stuchlik, A. (2017). Drugs interfering with muscarinic acetylcholine receptors and their effects on place navigation. *Front. Psychiatry*, 8, 215.
- Şahin, E. M., Özer, C., Ölüç, F., Tunç, Z. (2005). Huzurevinde kalan yaşlılarda demans ve depresyon. *Türk Geriatri Dergisi*. 8 (1), 22-24.
- Tan, J. K., Nazar, F. H., Makpol, S., Teoh, S. L. (2022). Zebrafish: a pharmacological model for learning and memory research. *Molecules*, 27 (21), 7374.
- Teipel, S., Heinsen, H., Amaro, E., Jr., Grinberg, L. T., Krause, B., Grothe, M. (2014). Cholinergic basal forebrain atrophy predicts amyloid burden in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.*, 35 (3), 482-491.
- Terry Jr, A. V., Gattu, M., Buccafusco, J. J., Sowell, J. W., Kosh, J. W. (1999). Ranitidine analog, JWS-USC-75IX, enhances memory-related task performance in rats. *Drug Dev. Res.*, 47(2), 97-106.
- Tully, K., Bolshakov, V. Y. (2010). Emotional enhancement of memory: how norepinephrine enables synaptic plasticity. *Mol. Brain.*, 3, 15.
- Ucel, U. I., Can, O. D., Demir Ozkay, U., Ulupinar, E. (2020). Antiamnesic effects of tofisopam against scopolamine-induced cognitive impairments in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 190, 172858.
- Van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F. H. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nat. Rev. Neurosci.*, 1 (3), 191-198.
- Vauzour, D., Vafeiadou, K., Rodriguez-Mateos, A., Rendeiro, C., Spencer, J. P. E. (2008). The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. *Genes Nutr.*, 3 (3-4), 115-126.
- Vetreno, R. P., Hall, J. M., Savage, L. M. (2011). Alcohol-related amnesia and dementia: Animal models have revealed the contributions of different etiological factors on neuropathology, neurochemical dysfunction and cognitive impairment. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 96 (4), 596-608.

- von Bohlen Und Halbach, O. (2007). Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res.*, 329 (3), 409-420.
- von Linstow Roloff, E., Harbaran, D., Micheau, J., Platt, B., Riedel, G. (2007). Dissociation of cholinergic function in spatial and procedural learning in rats. *Neuroscience*, 146 (3), 875-889.
- Weiss, J., Gattuso, G., Barreca, D., Haefeli, W. E. (2020). Nobiletin, sinensetin, and tangeretin are the main perpetrators in clementines provoking food-drug interactions in vitro. *Food Chemistry*, 319, 126578.
- Wible, C. (2013). Hippocampal physiology, structure and function and the neuroscience of schizophrenia: a unified account of declarative memory deficits, working memory deficits and schizophrenic symptoms. *Behav. Sci.*, 3 (2), 298-315.
- Wimo, A., Wimbland, B. (2003). Demans ve sağlık ekonomisi. *Demans Dergisi*, 3, 121-126.
- Wu, J., Zhao, Y.-M., Deng, Z.-K. (2018). Tangeretin ameliorates renal failure via regulating oxidative stress, NF- κ B–TNF- α /iNOS signalling and improves memory and cognitive deficits in 5/6 nephrectomized rats. *Inflammopharmacology*, 26 (1), 119-132.
- Xu, S., Kong, Y. G., Jiao, W. E., Yang, R., Qiao, Y. L., Xu, Y., Tao, Z. Z., Chen, S. M. (2019). Tangeretin promotes regulatory T cell differentiation by inhibiting Notch1/Jagged1 signaling in allergic rhinitis. *Int. Immunopharmacol.*, 72, 402-412.
- Yang, J. S., Wu, X. H., Yu, H. G., Teng, L. S. (2017). Tangeretin inhibits neurodegeneration and attenuates inflammatory responses and behavioural deficits in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced Parkinson's disease dementia in rats. *Inflammopharmacology*, 25 (4), 471-484.
- Yang, T., Feng, C., Wang, D., Qu, Y., Yang, Y., Wang, Y., Sun, Z. (2020). Neuroprotective and anti-inflammatory effect of tangeretin against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Inflammation*, 43 (6), 2332-2343.
- Yang, Z., Zou, Y., Wang, L. (2023). Neurotransmitters in prevention and treatment of alzheimer's disease. *Int. J. Mol. Sci.*, 24 (4), 3841.

- Yasui, T., Fujisawa, S., Tsukamoto, M., Matsuki, N., Ikegaya, Y. (2005). Dynamic synapses as archives of synaptic history: state-dependent redistribution of synaptic efficacy in the rat hippocampal CA1. *Physiol. J.*, 566 (1), 143-160.
- Yavlal, F., Güngör, H. A. (2016). Demansta klinik bulgular. *Nükleer Tıp Seminerleri*. 3, 134-138.
- Yoon, H. S., Ko, H. C., Kim, S. S., Park, K. J., An, H. J., Choi, Y. H., Kim, S. J., Lee, N. H., Hyun, C. G. (2015). Tangeretin triggers melanogenesis through the activation of melanogenic signaling proteins and sustained extracellular signal- regulated kinase in B16/F10 murine melanoma cells. *Nat. Prod. Commun.*, 10 (3), 389-392.
- Yoshizaki, N., Hashizume, R., Masaki, H. (2017). A polymethoxyflavone mixture extracted from orange peels, mainly containing nobiletin, 3,3',4',5,6,7,8-heptamethoxyflavone and tangeretin, suppresses melanogenesis through the acidification of cell organelles, including melanosomes. *J. Dermatol. Sci.*, 88 (1), 78-84.
- Youdim, K. A., Joseph, J. A. (2001). A possible emerging role of phytochemicals in improving age-related neurological dysfunctions: a multiplicity of effects. *Free Radic. Biol. Med.*, 30 (6), 583-594.
- Zhao, J., Zhu, M., Kumar, M., Ngo, F. Y., Li, Y., Lao, L., Rong, J. (2019). A pharmacological appraisal of neuroprotective and neurorestorative flavonoids against neurodegenerative diseases. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.*, 18 (2), 103-114.
- Zhou, B., Zuo, Y. X., Jiang, R. T. (2019). Astrocyte morphology: diversity, plasticity, and role in neurological diseases. *CNS Neurosci. Ther.*, 25 (6), 665-673.

http-1: <https://qbi.uq.edu.au/brain-basics/memory/where-are-memories-stored>
(Erişim Tarihi: 02.05.2023)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Furkan KENAR
Yabancı Dil : İngilizce
E-Posta :
ORCID :

Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

- 2021-2023, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji ABD Tezli Yüksek Lisans Programı
- 2016-2021, Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi.
- 2016-2020, Anadolu Üniversitesi, Açıköğretim Fakültesi, Sağlık Yönetimi.

Ulusal ve Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Bildirileri:

- 2023, Poster Bildiri, L. Çiftçi, F. Kenar, C. Yazıcı, D. Osmaniye, Ü. D. Özkay, Antidepressant-like effects of new thiadiazole derivatives. International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development (DRD'23), 4-6 May, 2023, İzmir, Turkey.
- 2023, Poster Bildiri, Ş. Yön, G. Türkoğlu, F. Kenar, Ü. D. Özkay, Anti-inflammatory effect of syringic acid: in vivo and in silico results. International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development (DRD'23), 4-6 May 2023, İzmir, Turkey.
- 2022, Sözlü Bildiri, F. Kenar, N. Turan Yücel, Covid-19'un kronik hastalıklarla ilişkisi ve tedavisine yönelik güncel yaklaşımlar, International Congress of Health Research, 8-9 December 2022, Ankara, Turkey.

Bilimsel Etkinlikleri:

- 2022, Orpheus Bilgilendirme Çalıştayı, Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü-Organizasyon Komitesi

Sertifikaları:

- 2021, Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Ege Üniversitesi, İzmir
- 2019, Dijital Okur-Yazarlık Eğitim Sertifikası
- 2018, ISO 13485:2016 Tıbbi Cihazlar İçin Kalite Yönetim Sistemi Temel Eğitimi
- 2018, GLP- İyi Laboratuvar Uygulamaları Eğitimi
- 2018, GMP- İyi Üretim Uygulamaları Eğitimi
- 2018, ISO 45001:2018 İş Sağlığı ve Güvenliği Yönetim Sistemi Temel Eğitimi
- 2018, ISO 9001:2015 Kalite Yönetim Sistemi Temel Eğitimi

Mesleki Birlik/Dernek/Kuruluş Üyelikleri:

- 2021, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Mezunlar Birliği Derneği