

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KRONİK SOSYAL İZOLASYON STRESİNE MARUZ KALAN
ADÖLESAN ERKEK FARELERDE SÜLFORAFANIN, BİLİŞSEL
FONKSİYONLAR, DAVRANIŞ VE HİPOKAMPUS - PREFRONTAL
KORTEKS BDNF, TNF-A, IL-6, MDA, GLUTATYON SEVİYELERİNE
ETKİLERİ**

Yeşim Cemre ATAROĞLU
ORCID: 0009-0004-6254-617X

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

Fizyoloji Yüksek Lisans Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR

EYLÜL 2024

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc- 2021970082

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KRONİK SOSYAL İZOLASYON STRESİNE MARUZ KALAN
ADÖLESAN ERKEK FARELERDE SÜLFORAFANIN, BİLİŞSEL
FONKSİYONLAR, DAVRANIŞ VE HİPOKAMPUS - PREFRONTAL
KORTEKS BDNF, TNF-A, IL-6, MDA, GLUTATYON SEVİYELERİNE
ETKİLERİ**

Yeşim Cemre ATAROĞLU
ORCID: 0009-0004-6254-617X

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

Fizyoloji Yüksek Lisans Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ayfer DAYI

ORCID: 0000-0002-4102-1399

Bu araştırma DEU Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından

3147 proje numarası ile desteklenmiştir.

İZMİR

EYLÜL 2024

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
ETİK BEYANI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun şekilde hazırlayıp sunduğum “Kronik sosyal izolasyon stresine maruz kalan adolesan erkek farelerde Sülförafanın, bilişsel fonksiyonlar, davranış ve Hipokampus - Prefrontal Korteks BDNF, TNF- α , IL-6, MDA, Glutasyon seviyelerine etkileri” başlıklı Yüksek Lisans tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Tarih: 14/08/2024

YEŞİM CEMRE ATAROĞLU

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması boyunca bana rehberlik eden, yol gösteren ve değerli bilgilerini benimle paylaşan ve içtenlikle yardım eden sevgili danışman hocam Prof. Dr. Ayfer DAYI'ya, Akademik bilgileri, düşünceleri, özverili yönlendirmeleriyle beni araştırmaya ve çalışmaya teşvik eden sevgili hocalarım Prof. Dr. Müge KİRAY, Prof. Dr. Amaç KİRAY, Prof. Dr. İlkay AKSU ve Doç. Dr. Ferda Hoşgörler, Prof. Dr. Ataç SÖNMEZ, Prof. Dr. Osman AÇIKGÖZ ve Prof. Dr. Berkant Muammer KAYATEKİN'e, Bütün deneylerimde akademik bilgileri ve düşünceleriyle her zaman yanımda olan ve beni destekleyen Burcu AÇIKGÖZ, Güner ÇALIŞ, Merve Meriç KAHRAMAN AKKÜLAH ve Bahar DALKIRAN'a, Bu çalışmanın gerçekleşmesinde hem maddi hem manevi desteğini esirgemeyen sevgili arkadaşım Biyoloji-Kimya Mühendisi Işitan BİLGİÇ'e Tez süresince beni destekleyen ve tecrübeleriyle yönlendiren Caner AKKAYA ve Defne ÇINAR BİLGİN'e, Hayvan deneylerimde yardımını esirgemeyen sevgili meslektaşım Buket ÇAYLAK'a, Yüksek lisans sürecimde yanımda olan, beni cesaretlendiren ve her anımda yanımda olan sevgili dostum Şerife KAPÇAK'a, Varlığını her zaman yanımda hissettiğim, zorlu anlarda yanımda olan, beni ayağa kaldıran, cesaretlendiren ve motive eden yol arkadaşım Oğuzhan UZUNLAR'a, Bugüne kadar hep desteklerini hissettiğim ve sahip olduğum için çok şanslı olduğum canım aileme,

En içten sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TABLolar DİZİNİ.....	i
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1.Problemin Tanımı ve Önemi.....	1
1.2.Araştırmanın Amacı.....	4
1.3.Araştırmanın Hipotezleri.....	4
2.GENEL BİLGİLER.....	6
2.1.Stres.....	6
2.1.1.Tanımı ve Tarihçesi	6
2.1.2.Stres-HPA ilişkisi	6
2.1.3.Stres ve Nöroinflamasyon ilişkisi	10
2.1.4.Prefrontal Korteks	12
2.1.5.Stres ve Prefrontal Korteks ilişkisi	12
2.1.6.Hipokampus	13
2.1.7.Stres, Hipokampus ve Öğrenme-Bellek ilişkisi	14
2.1.8.Deney Hayvanlarının Kullanıldığı Stres Modelleri	15
2.1.9.Sosyal İzolasyon Stresi	16
2.2.Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF).....	19
2.2.1.Sosyal İzolasyon Stresinin BDNF'e Etkisi.....	20
2.3.TNF- α ve IL-6.....	20
2.3.1.Sosyal İzolasyon Stresinin TNF-a ve IL-6'ya Etkisi.....	22
2.4.MDA ve GSH	23
2.4.1.Sosyal İzolasyon Stresinin MDA ve GSH'a Etkisi	24
2.5.Adölesan Dönem ve Sosyal İzolasyon Stresinin Adölesan Döneme Etkisi.....	25
2.6.Sülforafan.....	25
2.6.1.Sülforafanın Stres Üzerindeki Etkisi.....	26
2.6.2.Sülforafanın Bilişsel Fonksiyonlar ve Davranışa Etkisi	28
2.6.3.Sülforafanın BDNF'e Etkisi	28
2.6.4.Sülforafanın TNF-a ve IL-6'ya Etkisi	29
2.6.5.Sülforafanın MDA ve GSH'a Etkisi.....	30

3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
3.1.Araştırmanın Tipi.....	32
3.2.Araştırmanın Yeri ve Zamanı	32
3.3.Araştırmanın Evreni ve Örneklemi	32
3.4.Çalışma Materyali.....	33
3.5.Araştırmanın Değişkenleri	33
3.6.Veriler Toplama Araçları	33
3.7.Araştırma Planı	35
3.7.1.Deney Hayvanlarının Sağlanması.....	35
3.7.2.Çalışma Gruplarının ve Sosyal İzolasyon Modelinin Oluşturulması.....	36
3.7.3.Sülforafan Çözeltilisinin Hazırlanması ve Uygulanması	39
3.7.4.Davranış Testleri	39
3.7.5.Sakrifikasyon ve Dokuların Ayrımı.....	44
3.7.6.Biyokimyasal Değerlendirme	44
3.7.7.Histolojik İnceleme	49
3.8.Verilerin Değerlendirilmesi	51
4.BULGULAR.....	52
4.1.Vücut Ağırlıkları.....	52
4.2.Açık Alan Testi Bulguları	53
4.3.Kuyruktan Asma Testi Bulguları	55
4.4.Porsolt Zorunlu Yüzme Testi Bulguları.....	56
4.5.Morris Su Labirenti Bulguları.....	59
4.6.Prefrontal Korteks ve Hipokampus BDNF Seviyeleri	62
4.7.Prefrontal Korteks ve Hipokampus TNF- α Seviyeleri.....	64
4.8.Prefrontal Korteks ve Hipokampus IL-6 Seviyeleri.....	66
4.9.Prefrontal Korteks ve Hipokampus MDA Seviyeleri	67
4.10.Prefrontal Korteks ve Hipokampus GSH Seviyeleri.....	69
4.11.Hücre Sayımı Bulguları	70
5.TARTIŞMA	73
5.1.Vücut Ağırlığı Üzerindeki Etkiler.....	73
5.2.Davranış Deneyleri Üzerindeki Etkiler.....	73
5.2.1.Açık Alan Testi üzerindeki Etkiler	73
5.2.2.Kuyruk Asma Testi Üzerindeki Etkiler.....	74
5.2.3.Porsolt Zorunlu Yüzme Testi Üzerindeki Etkiler	75
5.2.4.Morris Su Labirenti Üzerindeki Etkiler	76
5.3.BDNF Seviyesi Üzerindeki Etkiler.....	77

5.4.TNF- α Seviyesi Üzerindeki Etkiler	78
5.5.IL-6 Seviyesi Üzerindeki Etkiler	79
5.6.MDA Seviyesi Üzerindeki Etkiler	80
5.7.GSH Seviyesi Üzerindeki Etkiler	80
5.8.Nöron Sayısı Üzerindeki Etkiler	81
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	83
7. KAYNAKLAR	84
8. EKLER	108



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Araştırma Planı Tablosu.....	32
Tablo 2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeleri tablosu.....	33
Tablo 3. Haftalık ağırlık değişimi (g).....	52



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Deney Aşamalarının Şematik Gösterimi.....	39
Şekil 2. Kuyruktan Asma Testi Düzenegi	41
Şekil 3. Porsolt zorunlu yüzme testi düzenegi.....	42
Şekil 4. Morris su labirenti düzenegi.....	44
Şekil 5. Açık Alan testinde orta alanda geçirilen süre (s).....	54
Şekil 6. Açık alan testinde toplam kat edilen mesafe (cm).....	55
Şekil 7. Açık alan testinde ortalama hız (cm/s).	55
Şekil 8. Kuyruktan asma testinde immobilité süreleri (s).....	56
Şekil 9. Porsolt zorunlu yüzme testinde tırmanma (climbing) davranışı süresi (s).	57
Şekil 10. Porsolt zorunlu yüzme testinde yüzme (swimming) davranışı süresi (s).	58
Şekil 11. Porsolt zorunlu yüzme testinde immobilité süresi (s).....	58
Şekil 12. Morris su labirenti testinde ilk 4 günde platformu bulma süresi (s).....	60
Şekil 13. Morris su labirenti testinde 5. günde hedef kadranda geçirilen süre (s).	61
Şekil 14. Morris su labirenti testinde 5. günde platformun zıt kadranda geçirilen süre(s). 62	
Şekil 15. PFC’te BDNF protein seviyesi (ng/ml).....	63
Şekil 16. Hipokampus’taki BDNF protein seviyesi (ng/ml).....	63
Şekil 17. PFC’de TNF- α protein seviyesi (ng/L).....	65
Şekil 18. Hipokampus’ta TNF- α protein seviyesi (ng/L).	65
Şekil 19. PFC’de IL-6 protein seviyesi (pg/ml).....	66
Şekil 20. Hipokampus IL-6 protein seviyesi (pg/ml).....	67
Şekil 21. PFC MDA seviyesi (nmol/ml).....	68
Şekil 22. Hipokampus MDA seviyesi (nmol/ml).	69
Şekil 23. PFC GSH seviyesi (ng/ml).	70
Şekil 24. Hipokampus GSH seviyesi (ng/ml).....	70
Şekil 25. PFC bölgesindeki nöron sayısı.	71
Şekil 26. PFC nöron görüntüleri.....	71
Şekil 27. Hipokampus bölgesindeki nöron sayısı.....	72
Şekil 28. Hipokampus nöron görüntüleri.....	72

SİMGELER KISALTMALAR

5-HT Serotonin

ACTH Adrenokortikotropik Hormon

AVP Arjinin-Vazopressin

BDNF Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör

BOS Beyin-Omurilik Sıvısı

CRH Kortikotropin Salınım Hormonu

CSDS Kronik Sosyal Yenilgi Stresi

DG Dentat Girus

ESFN Erken Sülföröfan Grubu

FST Zorunlu Yüzme Testi

GSFN Geç Sülföröfan Grubu

GSH Glutasyon

HPA Hipotalamik-Hipofiz-Adrenal

IL-1 β İnterlökin 1 Beta

IL-6 İnterlökin 6

ITC İzotiyosiyanat

K Kontrol Grubu

KBB Kan-Beyin Bariyeri

LPS Lipopolisakkarit

MDA Malondialdehit

MWM Morris Su Labirenti Testi

Nrf2 Nükleer Eritroid-2 faktörü

OPT Açık Alan Testi

PFC Prefrontal Korteks

ROS Reaktif Oksijen Türleri

SFN Sülföröfan

SI Sosyal İzolasyon Grubu

SI+ESFN Sosyal İzolasyon + Erken Sülföröfan Grubu

SI+GSFN Sosyal İzolasyon + Geç Sülföröfan Grubu

TNF- α Tümör Nekroz Faktörü Alfa

TST Kuyruktan Asma Testi

KRONİK SOSYAL İZOLASYON STRESİNE MARUZ KALAN ADÖLESAN ERKEK FARELERDE SÜLFORAFANIN, BİLİŞSEL FONKSİYONLAR, DAVRANIŞ VE HİPOKAMPUS - PREFRONTAL KORTEKS BDNF, TNF-A, IL-6, MDA, GLUTATYON SEVİYELERİNE ETKİLERİ

Yüksek Lisans Tezi

Yeşim Cemre ATAROĞLU

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Fizyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada, kronik sosyal..izolasyon stresine maruz kalan adölesan erkek farelerde Sülföröfanın, bilişsel fonksiyonlar, davranış ve hipokampus-prefrontal korteks BDNF, TNF- α , IL-6, MDA, Glutasyon seviyelerine etkileri incelendi.

Çalışmada, 28 günlük, 42 Balb/c erkek fare ideal koşullarda barındırıldı. Deney grupları: kontrol (K), sosyal izole (SI), erken sülföröfan (ESFN), geç Sülföröfan (GSFN), sosyal izole-erken Sülföröfan (SI+ESFN), sosyal izole-geç Sülföröfan (SI+GSFN). Sosyal izole gruplar 4 hafta boyunca ayrı kafeslerde, diğerleri grup halinde barındırılmıştır. ESFN ve SI+ESFN grupları, sosyal izolasyonun ilk 7 günü 10 mg/kg Sülföröfan (SFN) intraperitoneal (i.p.) olarak verildi. GSFN ve SI+GSFN grupları, sosyal izolasyonun son 7 günü 10 mg/kg SFN i.p. verildi. Açık alan (OF), Kuyruktan asma (TST), Zorunlu Yüzme (FST) ve Morris Su Labirenti (MWM) davranış testleri 4 haftanın sonunda yapılmıştır. Deneylerin sonunda fareler sakrifiye edildi, Prefrontal korteks (PFC)-hipokampusta ELISA yöntemiyle BDNF, TNF- α , IL-6, MDA, glutasyon düzeyleri ölçüldü. İstatistiksel olarak gruplar arasındaki farklar SPSS IBM programı ile One-way ANOVA ve Tekrarlı ANOVA, post-hoc LSD testi ile değerlendirildi.

OF’de GSFN grubu orta alanda daha fazla zaman geçirdi. TST’de SI grubunun immobilité süresi arttı; SI+ESFN, GSFN ve SI+GSFN gruplarının immobilité süreleri azaldı. FST’de ESFN, GSFN, SI+ESFN ve SI+GSFN gruplarının tırmanma süreleri arttı; SI+ESFN ve SI+GSFN gruplarının immobilité süresi azaldı. MWM’de K, GSFN, SI+ESFN grupları, gizli platformun yerini daha iyi öğrendi; probe trialde SI grubunun hedef kadranda bulunma süresi ve kognitif fonksiyonları daha düşüktü. Hipokampus BDNF seviyesi SI+ESFN ve SI+GSFN gruplarında; hipokampus TNF- α seviyesi ESFN ve SI+ESFN gruplarında; PFC’de IL-6 seviyesi SI grubunda; hipokampus IL-6 seviyesi SI, ESFN, GSFN gruplarında; PFC’de ve hipokampusta MDA seviyesi SI grubunda yüksekti. PFC’de nöron sayısı SI+ESFN, GSFN, SI+GSFN gruplarında, hipokampusta nöron sayısı SI+ESFN, SI+GSFN gruplarında yüksekti.

Sosyal izolasyon ile artan depresyon benzeri davranışlar, bilişsel fonksiyonların azalması, stresin vücutta yarattığı hücresel yıkım, daha büyük hastalıkların başlangıcı

olabilir. Kronik stresin yarattığı hasarların en aza indirilmesi ve gerileyen kognitif fonksiyonların düzeltilmesi için SFN'nin bir besin takviyesi olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler; Sülforafan, depresyon, davranış, bilişsel fonksiyon, nörotrofik faktör

Tezin sayfa adedi: 125

Danışman: Prof. Dr. Ayfer DAYI



**EFFECTS OF SULFORAPHANE ON COGNITIVE FUNCTIONS,
BEHAVIOR, AND BDNF, TNF- α , IL-6, MDA, GLUTATHIONE LEVELS IN
THE HIPPOCAMPUS AND PREFRONTAL CORTEX IN ADOLESCENT
MALE MICE EXPOSED TO CHRONIC SOCIAL ISOLATION STRESS**

Master Thesis

YEŞİM CEMRE ATAROĞLU

DOKUZ EYLUL UNIVERSITY HEALTH SCIENCE INSTITUTE

Department of Physiology

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of Sulforaphane on cognitive functions, behavior, and hippocampus-Prefrontal Cortex BDNF, TNF- α , IL-6, MDA, and Glutathione levels in adolescent male mice exposed to chronic social isolation.

Experimental groups: control (C), social isolation (SI), early sulforaphane (ESFN), late sulforaphane (LSFN), social isolation-early sulforaphane (SI+ESFN), social isolation-late sulforaphane (SI+LSFN). Social isolation groups were housed in separate cages for 4 weeks without receiving sensory cues; the others were housed in groups. ESFN and SI+ESFN groups received 10 mg/kg sulforaphane (SFN) intraperitoneally for the first 7 days of social isolation. LSFN and SI+LSFN groups received 10 mg/kg SFN intraperitoneally for the last 7 days of social isolation. Open field (OF), Tail suspension (TST), forced swimming (FST) and Morris Water Maze (MWM) behavioral tests were performed at the end of 4 weeks. At the end of the experiments, mice were sacrificed and BDNF, TNF- α , IL-6, MDA, and glutathione levels were measured in the prefrontal cortex (PFC)-hippocampus by ELISA. Statistical differences between the groups were evaluated with One-way ANOVA and Repeated ANOVA, post-hoc LSD test with SPSS IBM program.

In OF, LSFN group spent more time in the middle area. In TST, immobility time of SI group increased; immobility time of SI+ESFN, LSFN and SI+LSFN groups decreased. In FST, climbing time of ESFN, LSFN, SI+ESFN and SI+LSFN groups increased; immobility time of SI+ESFN and SI+LSFN groups decreased. In MWM, C, LSFN, SI+ESFN groups learned the location of the hidden platform better; in probe trial, target quadrant duration and cognitive functions of SI group were lower. Hippocampus BDNF level was high in SI+ESFN and SI+LSFN groups; hippocampus TNF- α level was high in ESFN and SI+ESFN groups; IL-6 level in PFC was high in SI group; hippocampus IL-6 level was high in SI, ESFN, LSFN groups; MDA level in PFC and hippocampus was high in SI group. The number of neurons in the PFC was found to be high in the SI+ESFN, LSFN, SI+LSFN groups, and the number of neurons in the hippocampus was found to be high in the SI+ESFN, SI+LSFN groups.

When the findings are evaluated, depressive-like behaviors that increase with social isolation, decreases in learning-memory and cognitive functions, and cellular

destruction caused by stress in the body may be the beginning of greater disorders. We think that SFN use should be added to nutrition in order to minimize the damage caused by chronic stress and to correct declining cognitive functions.

Keywords; Sulforaphane, depression, behavior, cognitive function, neurotrophic factor

Page number: 125

Advisor: Prof. Dr. Ayfer DAYI



1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Sosyal etkileşim, insanlarda ve hayvanlarda hem fiziksel sağlık hem de mental sağlık için kilit rol oynamaktadır. 2020’de başlayan koronavirüs salgını Dünya Sağlık Örgütü tarafından pandemi olarak ilan edilmiştir. Pandemi ile birlikte hayatımıza giren Sosyal İzolasyon kavramı, her yaştan insanı etkileyen bir stres faktörü olmuştur (1). Fakat günümüzde sosyal izolasyonun neden olduğu stres, fiziksel ve mental sağlığı etkileyen önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Kronik Sosyal İzolasyon, artan morbidite ve mortalite ile birlikte azalan yaşam kalitesi için risk faktörüdür (2). Stresin neden olduğu beyin işlevlerindeki bozukluklar, bilgiyi öğrenme, işleme yeteneğinde azalma, hatırlama ve bilişsel gerileme ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir (3). Özellikle erken yaşta yalnız kalmanın beyinde nörogelişimsel bozukluklara yol açtığı bilinmektedir (2).

Ergenliğin, beynin strese karşı savunmasız kaldığı dönem olduğu öne sürülmektedir. Ergenlik; stres tepkileri, kaygı, depresyon ve bilişsel gelişim ile ilgili sosyal etkileşim bağlantılarının kurulduğu kritik dönemdir (4). Hayvan çalışmalarında kronik sosyal izolasyon stresinin, özellikle yaşamın erken döneminde, hipotalamik-hipofiz-adrenal aksını aktive ettiğini ve monoaminerjik, glutamaterjik ve GABAerjik nörotransmitter sistemlerini etkileyerek serotonin döngüsünde uzun süreli azalmalara ve dopamin reseptör duyarlılığında değişikliklere neden olduğunu göstermektedir. Bu etkiler ergenlik dönemindeki stresörlerin, yaşamın diğer evrelerinden daha fazla algılanmasına neden olmaktadır (5,6).

Hipokampus, duygu, kaygı, korku ve stresin düzenlenmesinde, öğrenme ve bellek işlevlerinde önemli rol oynayan, limbik sistemde bulunan bir bölgedir. Gyrus Dentatus ve Cornu Ammonis adı verilen 2 allokorteks laminadan oluşmaktadır. Uzun süreli bellek ve yeni sinaps oluşumunda ve güçlendirilmesinden görevlidir (7). Ergenlik döneminde nöral gelişim devam eder. Yetişkinliğe kıyasla ergenlikte, hipokampusun gelişmesi ve hipokampal nörojenez daha hızlı görülür. Bu nedenle, strese bağlı hipokampal fonksiyon değişiklikleri çeşitli nörolojik ve psikiyatrik hastalıklar ile

ilişkilidir (8). Örneğin travmatik beyin hasarı, depresyon, anksiyete, epilepsi, Alzheimer ve Parkinson hastalıklarında hipokampus etkilenir ve işlevi bozulabilir.

Prefrontal korteks (PFC), biliş, duygu ve davranış bozuklukları ile ilişkilidir (9). Farelerde ergenlik döneminde PFC ve hipokampus gelişimi çok hızlıdır. Hızlı gelişen bu yapılarda reseptör duyarlılığı fazla olduğu için herhangi bir streste duygu, kaygı, öğrenme ve bellek gibi işlevler etkilenebilmektedir (5). Yetişkinlerle kıyaslandığında ergenlikte, dendritik yoğunluğun ve hücre proliferasyon hızının yüksek olduğu görülmektedir (10).

Sülforafan (4-metilsülfinilbütül izotiyosiyanat, SFN), brokoli, karnabahar, lahanası ve brüksel lahanası gibi *Brassica (Turpgiller)* ailesinde bulunan izotiyosiyanat (ITC) grubuna ait alifatik bir organosülfür bileşiktir (11). ITC'lar antioksidan, antibakteriyel, antifungal ve sitoprotektif özellikleri ile bilinirler. Hücrede vakuolde tutulan glukozinolatların mirozinaz enzimi ile parçalanmasıyla oluşurlar. Brokoliden elde edilen SFN, mikrobiyot tarafından parçalanıp dönüştürülebilir (12). Sindirilen SFN ve metabolitlerinin, kan-beyin bariyerinden (KBB) geçebildiği bildirilmiştir. Farelerde yapılan bir çalışmada SFN gavajından sonra, ventral orta beyin (mezensefalon) ve striatumda SFN biriktiği gözlenmiştir (13).

Sülforafan, çoklu antioksidan yanıtlarını düzenleyebilen ve nöronları oksidatif hasarlara karşı koruyabilen Nükleer Eritroid-2 faktörü (Nrf2)'nin güçlü bir aktivatörüdür (14, 15). Yapılan bir çalışmada SFN'nin, Nrf2'nin hedef genleri olan HO-1, NQO1 ve UGT1A1'i ve Nrf2'nin hücrel translokasyonunu önemli ölçüde arttırdığı gösterilmiştir (16). Kronik oksidatif stres ve inflamasyon, psikiyatrik hastalıklar dâhil olmak üzere birçok kronik hastalığından patogenezinde rol oynar. SFN, Nrf2 aktivasyonunu artırarak hücreyi stres kaynaklı hasardan korumaktadır (17).

Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF-Brain Derived Neurotrophic Factor), stres kaynaklı hipokampustaki hasarı hafifletebilen bir trofik faktör olarak bildirilmiştir. BDNF'in serotonerjik, dopaminerjik anksiyolitik etkilere sahip bir modülatör ajan olduğu bilinmektedir. Bunun yanı sıra nöron büyümesi ve plastisitesi üzerinde trofik etkileri de bulunmaktadır (18). BDNF ayrıca stres ve kaygı durumlarında davranışları düzenlediği bildirilmiştir. Depresyonda serum BDNF

seviyesi azalırken, sosyal izole hayvanlarda hipokampus BDNF seviyesinin azaldığı görülmüştür (19). Hayvanlarda yapılan psikiyatrik bozuklukların modellenmesinde genellikle kronik stres modelleri geliştirilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda genellikle hipotalamik-hipofiz-adrenal aksı etkilenmekte ve strese duyarlı bölge olan hipokampusta BDNF ve mRNA'nın aşağı regülasyonuna neden olmaktadır (20). Bir çalışmada sosyal izole sıçanlarda, medial PFC'te kontrol grubuna kıyasla BDNF seviyelerinin azaldığı bildirilmiştir (21).

Tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α), inflamasyon, hücre proliferasyonu, farklılaşma ve apoptoz sırasında immün yanıtı etkileyen bir proinflamatuvar sitokindir (22). Akut veya kronik sosyal izolasyon stresinin TNF- α seviyelerini etkilediği, depresyon ve anksiyete benzeri davranışların görülebileceği bildirilmiştir. Akut sosyal izole hayvanlarda yapılan bir çalışmada, hipokampusta TNF- α seviyeleri artış göstermiştir; fakat herhangi anlamlı bir davranış değişikliği görülmemiştir (23). Kronik sosyal izole hayvanlarda yapılan bir çalışmada ise izole grubun kontrol grubuna kıyasla TNF- α seviyelerinin anlamlı olarak arttığı, depresyon ve anksiyete benzeri davranışların önemli ölçüde etkilediği bildirilmiştir (24).

İnterlökin-6 (IL-6), pleiotropik bir proinflamatuvar sitokindir. Serbestleşmesi kronik inflamasyon ve otoimmün hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir (25). Yapılan çalışmalarda IL-6 seviyesinin artması, hücre proliferasyonunun azalması bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada sosyal izole farelerde, PFC'de IL-6 seviyesinin önemli ölçüde arttığı ve remiyelinizasyonun bozulduğu görülmüştür (26).

Çeşitli stres etkenleri, oksidatif strese neden olarak organizmanın redoks dengesini bozabilir. Kronik stres, artan reaktif oksijen türleri ile birlikte hücrede oksidatif hasara neden olabilir (27). Oksidatif stresin biyolojik belirteçleri arasında oksidatif hasar belirteçleri, antioksidan enzimler ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi yer alır. Oksidatif hasar genellikle protein karbonil grupları gibi lipid peroksidasyon ürünlerinin konsantrasyonunun ölçülmesiyle değerlendirilir. Malondialdehit (MDA) enzimatik ve enzimatik olmayan lipid peroksidasyonu sonucunda oluşan ikincil bir metabolittir. (29). Glutatyon (GSH) gibi antioksidan enzimler genellikle antioksidan savunma sistemi verimliliğini ölçmek için değerlendirilir (30). Ayrıca GSH, ROS ile reaksiyonlarda ilk kez hücre içi redoks

durumunu düzenleyen ve hücreyi oksidatif strese karşı koruyan başlıca enzimatik olmayan antioksidandır (31). Yapılan çalışmada, kronik stresin, sıçanlarda beyin dokusunda lipid ve protein hasarının yanı sıra antioksidan enzimatik aktivitelerin ve GSH seviyelerinin azalmasına neden olduğunu göstermiştir (32). Kronik sosyal izole sıçanlarda yapılan çalışmada, stresin PFC’de MDA seviyelerini arttırdığı; hipokampusta anlamlı bir farklılık olmadığı bildirilmiştir. Bunun yanı sıra PFC ve hipokampusta GSH seviyeleri anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir (33).

İç ve dış faktörler beynin gelişimine olumsuz etki etmektedir. Son bilimsel gelişmeler, kronik sosyal izolasyonun oksidatif ve inflamasyon sistemlerindeki sorunlara yol açtığını göstermektedir. Yetişkin farelerde yapılan bir çalışmada, kronik stresin serum TNF- α ve IL-6 düzeylerinin anlamlı ölçüde arttırdığı; SFN verildiğinde ise TNF- α ve IL-6’nın anlamlı olarak azalıp kontrol grup değerlerine yaklaştığı bildirilmiştir (34). Kronik stresin beyinde PFC ve hipokampusü etkilediği bilinmektedir. Yapılan başka bir çalışmada, Lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen depresyon benzeri farelerde, farelerin PFC ve hipokampusünde, postsinaptik yoğunluk proteini-95 (PSD-95) ve AMPA reseptörü GluA1’in yanı sıra BDNF ve dendritik spine yoğunluğunu da içeren beyin sinaptik belirteçlerinin seviyelerinin belirgin şekilde azaldığını bulmuşlardır (35).

1.2. Araştırmanın Amacı

Bu bilgiler ışığında çalışmanın amacı; kronik sosyal izolasyon stresine maruz kalan adölesan erkek farelerde Sülforanın, bilişsel fonksiyonlar, davranış ve hipokampus ve PFC bölgesinde BDNF, TNF- α , IL-6, MDA ve Glutasyon seviyelerine etkilerini araştırmaktır.

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

Araştırmaya ilişkin hipotezler aşağıda belirtilmiştir;

TEZ ADI: Kronik sosyal izolasyon stresine maruz kalan adölesan erkek farelerde Sülforanın, **(Bağımsız Değişken)** bilişsel fonksiyonlar, davranış ve Hipokampus - Prefrontal Korteks BDNF, TNF- α , IL-6, MDA, Glutasyon seviyelerine etkileri **(Bağımlı Değişken)**

H0 : Kronik sosyal izolasyon stresine maruz kalan adölesan erkek farelerde Sülforafanın, bilişsel fonksiyonlar, davranış ve Hipokampus - Prefrontal Korteks BDNF, TNF- α , IL-6, MDA, Glutasyon seviyelerine olumlu veya olumsuz etkisi yoktur.

H1 : Kronik sosyal izolasyon stresine maruz kalan adölesan erkek farelerde Sülforafanın, bilişsel fonksiyonlar, davranış ve Hipokampus - Prefrontal Korteks BDNF, TNF- α , IL-6, MDA, Glutasyon seviyelerine olumlu bir etkisi olabilir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Stres

2.1.1. Tanımı ve Tarihçesi

Stres kavramı, Latince ‘stringo’ kelimesinden dilimize geçen bir kelimedir. 14. yüzyılda İngiliz diline ‘fiziksel bir sıkıntı biçimi’ olarak geçmiştir. Zamanla anlamsal değişikliklere uğrayarak 17. yüzyılda ‘içsel sıkıntı’ anlamıyla kullanılmaya başlamıştır (36).

Stres, organizmanın immün, nöroendokrin ve metabolik yollarını olumsuz etkileyerek homeostazisin bozulmasına neden olur. Beyin stres değişimlerinin anahtar organıdır. Beyin içindeki dağıtılmış ve dinamik bir sinir devresi, belirli stres faktörlerinin dayattığı talepleri karşılamak için davranışsal ve fizyolojik stres tepki sistemlerini koordine eder, izler ve kalibre eder. Bununla birlikte küçük yaşlarda strese maruz kalmak bu koordinasyonu ve plastisiteyi de bozmaktadır (37).

Adölesanlarda, hızlı ve aktif beyin gelişimi görülmektedir. Herhangi bir dış stres faktörü beyin gelişimini olumsuz etkilemesi ile birlikte depresyon benzeri davranışa neden olduğu bildirilmektedir (5). Yapılan bir çalışmada adölesan dönemdeki dişi ve erkek farelerde stres sonrası depresyon benzeri davranışta anlamlı bir farklılık bildirilmemiştir (38). Adölesan dişi farelerin seks hormonlarından dolayı stres etmenlerine daha duyarlı olduğu düşünülmektedir. Fakat erkek farelerde stres etmenlerinin etkilediği bölgelerin daha fazla olduğu düşünülmektedir (39).

2.1.2. Stres-HPA İlişkisi

Stres, büyüklüğü ve/veya süresi açısından düzensiz olması durumunda homeostaz, büyüme, gelişme, metabolizma, dolaşım, üreme, immün yanıt, biliş ve davranış gibi birçok hayati fizyolojik fonksiyon üzerinde olumsuz etkilerin ortaya çıkmasına neden olur. Tüm canlı organizmalar, homeostazlarını tehdit eden veya tehdit edici olarak algılanan çeşitli stres uyaranlarına karşı yüksek düzeyde korunan ve düzenleyici bir sistem geliştirmiştir. Bu nöroendokrin sistemlerden biri Hipotalamik-Hipofiz-Adrenal (HPA) aksıdır (40).

Organizmanın strese yanıtı, çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal efektör moleküllerin varlığıyla sağlanır. HPA aksının oluşumunda, aktivasyonunda ve düzenlenmesinde gonadal hormonlar anahtar rol oynar (41). HPA aksının son ürünleri olan glukokortikoidler, hem dinlenme hem de strese bağlı homeostazisin korunmasında temel bir rol oynar (40).

Gonadal steroidler, salgılayıcı faktörlere, nörotransmitterlere ve hormonlara verilen tepkiyi ve duyarlılığı etkileyerek, dolaşımdaki stres hormonlarının düzeylerini değiştirmek HPA aksının kazanımını düzenlemeye yardımcı olur. Stres varlığında nöronal yanıt, sempatik sinirlerin uyarılması ve hemen ardından adrenal medullanın uyarılması ve hormon salgılaması ile başlar (42). Erken yaştan yetişkinliğe kadar gonadal steroidler, HPA aksını farklı şekilde etkileyebilir ve bu aksın duyarlılığında cinsiyet farklılıklarına neden olabilir. Stresörlere karşı akut HPA yanıtı faydalı bir yanıt olmasına rağmen, bu devrenin kronik veya travmatik stresli dönemler tarafından sürekli olarak etkinleştirilmesi, HPA aksında düzensizliğe yol açabilir ve patolojiye neden olabilir (41).

HPA aksının aktivitesi, uyarıcı sinyaller ve negatif geri besleme döngülerinden oluşur. Bu nöroendokrin aks, hipotalamusun 'Paraventriküler Nükleus (PVN)', hipofiz bezi ve adrenal bezlerde oluşur. Stres varlığı, hipotalamustaki PVN bölgesinde yer alan nöronlar tarafından kortikotropin salınım hormonu (CRH) ve arjinin-vazopressin (AVP) sentezini ve salınımını tetikler (43,44).

CRH, hipofiz portal sistemi yoluyla hipofiz bezinin ön lobuna ulaşır ve onun aynı kökenli G-proteinine bağlı reseptörüne bağlanarak adrenokortikotropik hormonun (ACTH) üretimine ve sistemik dolaşıma salınmasına yol açar (45). ACTH, zona fasikülatanın adrenokortikal hücrelerinin transmembran G-protein bağlı reseptörüne bağlandıktan sonra, proteinlerin aktivitesini ve glukokortikoidlerin biyosentetik yolunda yer alan genlerin ekspresyonunu indükler (insanlarda kortizol, kemirgenlerde kortikosteron). Ayrıca ACTH, zona retikülaris tarafından adrenal androjen sekresyonunu düzenler ve zona glomerulosa tarafından aldosteron sekresyonunun kontrolüne katılır (46).

HPA aksının son ürünleri olan glukokortikoidler, hemen hemen tüm doku ve organlarda pleiotropik etkileri olan steroid hormonlardır. Bu moleküller, HPA aksının

bazal aktivitesini düzenler ve esas olarak hipotalamus ve hipofiz bezine etki ederek stres yanıtını sona erdirir, böylece sırasıyla CRH ve ACTH salgılanması üzerinde negatif geri bildirim döngüleri oluşturur. Bu negatif geri bildirim mekanizmalarına, özellikle ACTH durumunda, genomik olmayan hızlı glukokortikoid etkilerinin de aracılık ettiği görülmektedir (47).

Organizmanın herhangi bir strese maruz kalması hipotalamus ve beyin sapını etkiler. CRH ve AVP'ye duyarlı nöronlar daha çok bu bölgede konumlanmıştır (48). Organizmanın stresöre verdiği tepki, HPA aksı ve otonom sinir sistemi tarafından kontrol edilir (49). Stresöre maruz kalma süresi/yoğunluğu organizmada kısa ve uzun süreli fizyolojik tepkilerin görülmesine neden olur. Kalp atışının hızı, kan basıncı, kortizol salınımı (kemirgenlerde kortikosteron salınır) gibi kısa süreli tepkiler görülebilir. Uzun süreli strese maruz kalmada saldırganlık, yeme-içme davranışının artması veya azalması, davranış değişikliği gibi uzun süreli fizyolojik etkiler görülmektedir (50). Bununla birlikte kronik strese maruz kalmanın HPA aktivitesinin düzensizliğine ve salgılanan glukokortikoid direncine bağlı periferik bağışıklık sisteminin hiperaktivasyonuna neden olduğu bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada, majör depresyon tanılı hastalarla kontrol grubu karşılaştırılmıştır. Çalışmada plazma ve beyin omurilik sıvısında (BOS), CRP ve proinflamatuvar sitokinlere (TNF- α , IL-6, IL-1 β) bakıldığında depresyon tanılı hastalarda anlamlı ölçüde yüksek olduğu bildirilmiştir (51).

Kronik stresin HPA aktivasyonun düzensizliği ile birlikte bağışıklık hücrelerini de etkilediği bildirilmiştir. Bağışıklık sisteminin düzensiz çalışması doğal bağışıklık sistemi hücrelerini (DAMP) de etkiler. DAMP hücreleri proinflamatuvar sitokinlerin salınımına neden olur. DAMP hücrelerinin kronik hücre dışı salınımı ve DAMP-PRR (DAMP hücrelerinin salınımını tetikleyen gen bölgesi) periferik ve merkezi inflamasyonu hızlandıran bir ileri besleme döngüsü oluşturur (52). İnflamatuvar sitokinlerin daha yüksek plazma seviyeleri, IL-1 β , IL-6 ve TNF- α , daha büyük depresyon benzeri semptomlar ile ilişkilidir. Sitokinler HPA aksını daha duyarlı hale getirir, negatif geri besleme döngüsünü bozar ve inflamatuvar reaksiyonları daha da artırır (53). Periferik inflamasyon, kan-beyin bariyerinin bozulması, immün hücre trafiği ve glial hücrelerin aktivasyonu gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla merkezi inflamasyonu (nöroinflamasyon) şiddetlendirir (54). Aktive edilmiş glial hücreler,

sitokinleri, kemokinleri ve reaktif oksijen ve nitrojen türlerini ekstra sinaptik boşluğa salarak nörotransmitter sistemlerini düzenler, uyarıcı/inhibitör oranını dengesizleştirir ve sinir devrelerinin plastisitesini ve adaptasyonunu bozar. Özellikle mikrogial aktivasyon ve toksisite, nöroinflamasyonun patofizyolojisinde merkezi bir rol oynar (55).

Kronik stres, HPA aksının hiperaktivitesine neden olmakla beraber PFC, hipokampus, Nucleus Accumbens (NAc) ve amigdala'daki serotonerjik (5-HT) reseptörleri de etkiler (56). 5-HT, mezensefalonda nöronlardaki esansiyel amino asit l-triptofandan, merkezi beyindeki 5-HT projeksiyonlarının ana kaynağını temsil eden Dorsal Raphe (DR) çekirdekleri tarafından üretilir. Ruh hali düzenlemesinde ve stres tepkisinde yer alan ve 5-HT reseptörlerini eksprese eden hemen hemen tüm kortikolimbik yapılar, DR kaynaklı aksonlar tarafından büyük ölçüde innerve edilir (57). Strese bağlı olarak bu bölgelerdeki serotonin reseptörlerinde artış görülmektedir (56). Serotoninin düzensiz aktivasyonu ruh hali, depresif ve anksiyetik davranışlar, iştah ve uyku düzeni gibi fizyolojik süreçlerle ilişkilendirilmiştir (58,59). Özellikle kronik stresin, serotonerjik nörotransmisyon ve HPA aksı ile ilişkisi hipokampal plastisiteyi ve nörojenezi olumsuz etkilediği bildirilmiştir (60). Kronik öngörülemez strese maruz kalan sıçanlarda yapılan bir çalışmada, stresli hayvanlarda spontan 5-HT nöronlarının sayısının azaldığı ve ilgili reseptörün duyarsızlaştığı bildirilmiştir. 5-HT ile tedavi sonrası ilerleyen anhedoni davranışta azalmalar bildirilmiştir (61). Adrenal beze elektrot yerleştirilen sıçanlarda, kronik strese maruz kaldıktan sonra ACTH frekansının ve seviyelerinin anlamlı ölçüde yükseldiği ve depresyon benzeri davranış sergilediği gösterilmiştir (62).

Kronik stres, olumsuz nöroimmün ve nöroendokrin etkilere neden olmaktadır. Düzensiz HPA hiperaktivitesinin glukokortikoid seviyelerini arttığı, depresyon benzeri davranışa neden olduğu ve beyinde fonksiyonel ve yapısal hasara neden olduğu görülmektedir. Yapılan bir çalışmada SFN takviyesinin depresyon benzeri davranışa anlamlı ölçüde azalttığı, serum kortikosteron, ACTH, IL-6 ve TNF- α seviyelerini azalttığı ve artışına engel olduğu gösterilmiştir (34).

2.1.3. *Stres ve Nöroinflamasyon İlişkisi*

Nöroinflamasyon, kan-beyin bariyerinde bulunan endotel hücrelerin aktivasyonunu, astrositler ve mikroglia, immün sistem hücrelerinin ve plazma proteinlerinin beyin dokusuna infiltrasyonu ve inflamasyonu ile ilişkili biyobelirteçlerin beyin dokusu ile etkileşimini içeren bir olaydır (63). Beyin kronik strese karşı nöroinflamasyon yanıtı oluşturur. İnflamasyon yanıtını artması sitokin salınımının artmasına, reaktif oksijen türlerinin hücrede artmasına bağlı olarak hücre hasarı ve ölümüne sebep olmaktadır. Bu kronik döngü, nöroendokrin değişikliklere, fizyolojik ve fonksiyonel yetersizliklere, davranış değişikliklerine ve neden olabilmektedir (54).

İnflamatuar yanıtın artması genelde oksidatif stresin artmasına bağlıdır. İnflamatuar hücreler oksidatif strese neden olan ROS belirteçlerini salgılar (64). Organizmada, oksidasyon ve redoks mekanizmaları bir dengede olduğu zaman inflamatuvar yanıt bir savunma sistemi olarak işlev görür fakat psikiyatrik ve nörodejeneratif hastalıklarda redoks dengesizliği görülmektedir. Bu nedenle inflamatuvar yanıtın dengesizliği nöroinflamasyona neden olur (65,66).

Nöroinflamasyonun ana unsuru mikroglia aktivasyonudur. Mikroglia, stres, travma, hastalık veya patoloji nedeniyle ortaya çıkan beyin homeostazisindeki dengesizliklere hızla yanıt verir. Mikroglia aktivasyonu, nöroinflamasyon ve nörodejenerasyondan sorumlu çeşitli inflamatuvar ve sitotoksik bileşenlerin salınmasına neden olur (67). Hasarlı beyin dokusunu ve patojenik ajanları temizleyerek beyinde yerleşik doğuştan gelen bağışıklık tepkisi hücreleri olarak görev yapan mikrogliyal hücreler ve hem KBB'nin perisitleri hem de nöronların sinapsları ile yakından ilişkili olan astrositler, hücre dışı glutamat seviyelerinin düzenlenmesinde ve beyin mikrosirkülasyonunun dinamik kontrolünde önemli bir role sahiptir (68).

Mikrogliyal hücreler, diğer beyin hücrelerinden farklı olarak periferik makrofajlarla ortak bir kökene sahiptir ve işlevlerini yerine getirmek için yeterli sayıyı korumak için güçlü bir rejeneratif kapasiteye sahiptir (69). Bu hücreler fonksiyonel durumlarına göre morfolojik dönüşümlere uğrarlar. Dinlenme halinde ve nöbetçi durumdayken mikrogliyal hücreler dallanma gösterir. Mikroglia, NOD benzeri reseptör pirin alanı içeren-3 (NLRP3) inflamatuvarının aktivasyonunun kemokin ve sitokinlerin

salgılanmasını uyardığı (IL-1 β , IL-6 ve TNF- α , ayrıca indüklenabilir Nitrik Oksit Sentaz (NOS), siklooksijenaz (COX) ve matris metaloproteinaz) aktive edilmiş fenotipe (yani M1 mikroglia) doğru hareket eder (70,71).

Mikroglial hücreler ayrıca daha etkili bir yanıt için enfeksiyon veya beyin hasarı bölgesine mikrogliaları toplar (72). M2 mikroglia adı verilen diğer mikroglia fenotipi, M1'in neden olduğu hasarı ve nörotoksiteyi önlemektedir. M2 fenotipi, apoptotik hücrelerin alımı veya miyelin döküntülerine maruz kalmanın yanı sıra anti-inflamatuar sitokinler (IL-4, IL-10 ve dönüştürücü büyüme faktörü-TGF) yoluyla indüklenmektedir. M2 hücreleri anti-enflamasyonu, doku onarımını ve hücre dışı yeniden yapılanmayı ve ayrıca nörojenezi desteklediği bildirilmiştir (73,74).

Aktive edilmiş mikrogliaların depresyon benzeri davranış ile ilişkili olduğunun doğrulanması ilk kez hayvan çalışmalarından elde edilmiştir. Kronik hafif strese maruz kalan farelerde hipokampus ve amigdalada, özellikle periferik bağışıklık hücreleri ve mikroglia tarafından ifade edildiği bilinen CD11b'nin (75), depresyonla ilişkili çeşitli beyin yapılarında arttığı gösterilmiştir. Kronik hafif strese (UCMS) maruz kalan farelerde hipokampus ve amigdala (76). Bu CD11b aşırı ekspresyonunun, kronik hafif stresin neden olduğu davranışsal ve nöroendokrin değişikliklerin normalleşmesine paralel olarak bir antidepresan tedavisi (fluoksetin) ile tersine çevrildiği bulunmuştur (76). Yapılan başka bir çalışmada kronik hafif strese maruz kalan sıçanlarda, mikroglial aktivasyonun ve sitokinlerin (IL-6, IL-1 β , TNF- α ve MCP-1) anlamlı ölçüde arttığı ve depresyon benzeri davranışa neden olduğu bildirilmiştir (77).

Mikroglia aktivasyonu ve sinyalleşme mekanizması ile inflamasyon yanıtının değerlendirildiği bir çalışmada, mikroglial hücreler LPS aracılığıyla aktive edilmiştir. Tedavi öncesi ve sonrası hücrelere SFN verilmiştir. SFN'nin aktive edilmiş mikroglial hücrelerin seviyesini önemli ölçüde azalttığı, mikroglial sinyalleşmede rol alan MAPK yolağının fosforilasyon seviyesini de anlamlı olarak azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca çalışmada proinflamatuar sitokinlerin (IL-6, IL-1 β , TNF- α) ve inflamatuvar aracılardan (iNOS, COX-2, NO ve PGE2) ekspresyonlarının azaldığı da bildirilmiştir (78).

2.1.4. Prefrontal Korteks

Prefrontal korteks frontal lobun korteksi ve beyinde beyaz cevherin altında bulunan davranışların bütün bileşenlerinin bağlantılarını yapan limbik sistemle ve onları bütünleştiren, önemli duyu ve motor sistemlerinin arasındaki sinyalleşmenin ve geri bildirim döngülerinin yer aldığı alandır (79). Duyusal neokortikal ve motor sistemler ve çok çeşitli subkortikal yapılar ile örtüşen bir bağlantı modeline sahip, birbirine bağlı bir neokortikal alanlar kümesidir. Beyinde davranışsal, algısal ve motor becerileri ile ilgili mekanizmaları kontrol eden bölgelerden biridir (80,81). PFC, temel duyusal analizler, öğrenme, duyu ve düşüncelere bağlı gerçekleştirilen davranışlar, psikomotor hız ve dikkat üzerine işlevlerde önemli bir role sahiptir (82).

Stresin biliş üzerindeki etkilerine dair ilk çalışmalar, II. Dünya Savaşı'ndan sonra barış zamanında pilotların savaş stresi sırasında zihinsel hatalar nedeniyle uçaklarını sıklıkla düşürdüğü gözlemlerine dayanarak başlamıştır (83). Kemirgenlerde ise stres-performans ilişkisine dair ilk çalışmalar öğrenilmiş çaresizlik modeli ile denenmiştir. Hayvanlarda kontrol edilemeyen stresin dikkat eksikliği yarattığı, davranış testlerinde anlamlı olumsuz değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (84).

2.1.5. Stres ve Prefrontal Korteks İlişkisi

Yetişkin veya gelişmekte olan beyin, nöronal değişim, dendritik şekillenme ve sinaps döngüsü dahil stresli ve diğer süreçlere yanıt olarak yapısal ve işlevsel esneklik gösterme konusunda dikkate değer bir yeteneğe sahiptir. Stres, biliş, karar vermeye, kaygıya ve ruh haline hizmet eden nöronlarda bir dengesizliğe neden olabilmektedir. Fakat bu davranışların ve davranış durumlarının ifadesini artırabilir veya azaltabilir. Bu dengesizlik, nöroendokrin, otonomik, immün ve metabolik araçlar aracılığıyla sistemik fizyolojiyi etkilemektedir. Kısa vadede bu değişiklikler uyum sağlayıcı olduğu bildirilmiştir; ancak stres ve nöronlardaki değişikliklerle birlikte davranış durumu da devam ederse, olumsuz farmakolojik ve davranışsal değişikliklere neden olabilmektedir (85).

Ergenlik dönemi nöron gelişimi ve plastisite için aktif bir dönemdir. Nöroanatomik olarak, PFC ergenlikte sinaptik ve nöronal yoğunluğun azalması, dendritlerin büyümesi ve beyaz madde hacminde artış dahil olmak üzere önemli bir

olgunlaşmaya uğrar ve böylece karmaşık bilişsel işlemlere uygun dağıtılmış sinir ağları oluşur. Aynı zamanda, çeşitli bilişsel görevlerin davranışsal performansı yaşla birlikte gelişir ve her bir görevdeki performans arasındaki karşılıklı ilişkiler, gelişim yoluyla zayıflar (86). Çok sayıda çalışma, stresin hem ergen hem de yetişkin PFC'de dendritik çekilmelere ve sinaptik kayıplara neden olduğunu göstermiştir (87,88,89,90). Ancak yetişkin denekler stresli koşullardan uzaklaştırıldığında dendritik dallanma cinsiyete özgü bir şekilde stres öncesi seviyelere iyileşebildiği bildirilmiştir (91). Aynı iyileşmeler ergenlik stresinin ardından görülmediği bildirilmiştir. Aynı çalışma, ergen stresi sonrasında azalan sinaptik yoğunluğun hipokampus veya striatumda değil, yalnızca PFC'de meydana geldiğini bulmuşlardır (90). Akut stresin sıçanlarda PFC ve hipokampus aktivasyonunda değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (92). Kronik stresin sıçanlarda PFC'deki dendritik dallanmayı anlamlı ölçüde azalttığı, buna bağlı depresyon benzeri davranışın geliştiği bildirilmiştir (34).

Stresörlerin, bilişsel işlev üzerindeki etkilerinin gerçekleşmesinde glukokortikoidlerin ve HPA aksının da önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir. Kronik strese maruz kalan sıçanlarda, strese bağlı davranış testlerinde anlamlı farklılıkların olduğu ve depresif/anksiyetik davranış sergilediği bildirilmiştir. Sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla kronik stresli grubun serum kortikosteron seviyelerinin anlamlı olarak arttığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada kronik strese maruz kalan sıçanlarda BDNF seviyelerinin arttığı fakat anlamlı bir farklılık olmadığı bildirilmiştir (93).

2.1.6. Hipokampus

İnsanlarda hipokampus, medial temporal lobun derinliklerine gömülü uzun bir yapıdır. Büyük ölçüde bir denizatına olan benzediği için 'Hippocampus' adını almıştır. Kemirgenlerde hipokampus, neokorteksin hemen altında yer alan nispeten büyük, kaju şeklinde bir yapıdır. Uzun ekseninin bir kesiti, 'trisinaptik döngü' olarak adlandırılan hipokampal anatomik görüntüdür. Entorhinal korteks, dentat girus (DG) bölgesine giden perforan yoluyla en güçlü uzantılarıyla hipokampusa ana kortikal girdiyi sağlar. DG, yosunlu lif yolu aracılığıyla CA3 bölgesine uzanır. CA3, Schaffer Teminat yoluyla CA1 bölgesine uzanır. Son olarak CA1 entorhinal kortekse geri dönerek döngüyü tamamlar (94).

Hipokampus, nöronal aktivitenin yoğun olduğu, duyuşal ve duyuşal olmayan nöron girdilerine sahip bir bölgedir. Kemirgenlerde spesifik konum hatırlama, zaman-mekansal belleğin temelini oluşturan konum hücreleri (place cells) vardır (95). Bir hayvanın ortamdaki konumuna göre konum hücrelerinin aktivasyonunun arttığı düşünülmektedir. Bu tekrarlanan aktivasyonun uzun süreli sinaptik güçlenmenin (LTP) sinaps oluşumuna katkıda bulunulduğu düşünülmektedir (96).

2.1.7. Stres, Hipokampus ve Öğrenme-Bellek İlişkisi

Pek çok memeli sosyal varlıklar olarak evrimleşmiştir. Sosyal karşılaşmalar öğrenmeyi kolaylaştırır ve bir organizmanın ömrü boyunca önceden var olan anıların değiştirilmesine yardımcı olur. Kısa süreli değişimler canlıda uzun süreli davranış değişikliklerine neden olur. Bu değişimler hayatta kalma içgüdüsünün temelini oluşturur. Canlı öğrendiğini kullanmak için bu bilgiyi depolar ve bu durum ise bellek bilincini oluşturur (97).

Klinik çalışmalar, stres kaynaklı davranış bozukluklarının moleküler ve hücresel mekanizmalardan kaynaklı olduğunu ileri sürmüştür. Yakınsak beyin görüntülemeleri, kemirgen modellerinde depresyon benzeri davranış modellemeleri ve depresyonlu hastaların postmortem çalışmaları duygudurum bozukluklarını anlamlandırmada kullanılmıştır. Bulgular, hücreiçi sinyalleme, gen ekspresyonu, nörotrofik faktörler, nörogenез, nöroinflamasyon, uyarıcı ve inhibitör nörotransmisyon, sinaptik fonksiyonlar üzerinde beynin ilgili bölgelerinde değişiklikler olduğunu bildirilmiştir (98,99,100,101,102). Çalışmalar PFC, hipokampus, amigdala, ventral tegmental alan-çekirdek akümbens (VTA-NAc) dopamin sistemi ve HPA aksına odaklanmıştır (103).

Hipokampal bağımlı hafıza, zamansal ve mekanik olarak farklı iki forma ayrılabilir: saniyeler ile onlarca dakika süren kısa süreli bir form ve saatler, günler ve hatta haftalarca süren uzun vadeli bir form. Uzun süreli hafızayı kısa süreli hafızadan ayıran önemli bir özellik, yeni protein sentezine bağımlı olmasıdır. Kombine hücresel ve davranışsal çalışmalar, öğrenme ve hafızanın, hipokampal sinapslarda sinaptik etkinlikteki sürekli artışın elektrofizyolojik bir ölçüsü olan uzun süreli güçlenme (LTP) ile modellenebileceğini göstermektedir. Sinaptik güçteki hafızaya bağı

değişiklikler aynı zamanda zamansal ve mekanik olarak farklı iki aşamaya da ayrılabilir (104). Erken faz LTP (E-LTP) olarak adlandırılan bu plastisite formu, NMDA tipi glutamat reseptörü yoluyla hızlı Ca^{+2} akışı ve ardından gelen protein fosforilasyon olayları sonucunda önceden var olan sinapsların modifikasyonlarını içerir (105). Buna karşılık, belirli aralıklarla tekrarlanan yüksek frekanslı stimülasyon (örneğin, her 10 dakikada bir dört tetani dizisi), kayıtlar muhafaza edilebildiği sürece süren uzun süreli, geç faz LTP (L-LTP) ile sonuçlanır (6 –8 saat) (106). Son yıllarda büyük ilgi gören tetani kaynaklı proteinlerden biri, nörotrofin salgı proteinleri ailesinin bir üyesi olan BDNF'tir. Başlangıçta periferik nöronlar için bir hayatta kalma faktörü olarak tanımlanan BDNF, merkezi sinir sisteminde sinaptik gelişimi ve plastisiteyi düzenleyen kritik bir salgı proteini olarak ortaya çıkmıştır (107). Kültürlenmiş hipokampal nöronlarda, BDNF'nin akut uygulaması, hem uyarıcı hem de inhibitör sinapslarda sinaptik iletimde hızlı değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (108). Yapılan bir çalışmada kronik strese maruz kalan farelerde, hipokampal BDNF ve ilgili gendeki mRNA sentezinin anlamlı olarak azaldığı; hayvanların depresyon benzeri davranış sergilediği bildirilmiştir. Rb1'in (BDNF'in sinyal yolunu tetikleyen ve antidepresan benzeri etki gösteren bir protein) enjeksiyonundan sonra, kronik stresin hipokampal dendritik yoğunluğa ve sinaptik plastisiteye olan etkilerini hafiflettiği gösterilmiştir (109).

2.1.8. Deney Hayvanlarının Kullanıldığı Stres Modelleri

Sosyal etkileşimler evrimsel açıdan önemli bir stres kaynağı olarak hizmet eder ve bu, memeli türleri arasında neredeyse her yerde bulunmaktadır. Sosyal strese ilişkin hayvan modelleri, agonistik davranışı içeren akut, aralıklı veya kronik maruziyete odaklanmadan sosyal izolasyona kadar çeşitlilik göstermektedir. Bu deneyimlerin göreceli stresi deneklerin türüne, cinsiyetine ve yaşına bağlı olabilir (110).

Hayvan modelleri, psikiyatrik bozuklukların nörobiyolojisini incelemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bir hayvan modelinin, modellenmiş bir insan hastalığına benzemesi nedeniyle geçerliliği olduğu fikrine rağmen (111), klinik öncesi biyomedikal araştırmaların çoğu, cinsiyeti deneysel bir değişken olarak dikkate almamaktadır (112,113). Kadınlar majör depresyon ve genel anksiyete gibi strese bağlı çeşitli zihinsel bozukluklara karşı daha duyarlı olmasına rağmen, zihinsel bozukluk

modelleriyle ilgili hayvan çalışmalarının (hem davranışsal hem de nörokimyasal) büyük çoğunluğu erkek hayvanlarda gerçekleştirilmektedir (114,115). Translasyonel sinirbilimde deneysel denekler olarak dişiler genellikle ihmal edilmektedir çünkü bunların çok "değişken" olduğu düşünülür ve kızgınlık döngüsü içindeki aşamaları hesaba katmak ve kontrol etmek zordur (116).

Nörobilimsel çalışmalarda hayvan modelleri, stresin etkisinin insanlarda etik ve benzeri nedenlerden dolayı incelenemediği durumlarda özellikle yardımcı olmaktadır. Sosyal stres etkilerine ilişkin çoğu laboratuvar çalışmasında kemirgenler, tipik olarak laboratuvar fareleri veya sıçanları ve bazen de hamsterlar kullanılmaktadır. Diğer türler, özellikle de primatlar, sosyal stres etkilerinin laboratuvar incelemesinde kullanılsa da, bu hayvanların sosyal ve stresle ilgili davranışları daha çok yarı doğal koşullar altında veya vahşi doğada gözlemlenmektedir.

Sosyal stres testlerin kullanılan modeller sınıflandırılmaktadır. Stresli ve fiziksel acı verici olan elektrik şoku, sıcak veya soğuğa maruz kalma; ağrı veya rahatsızlık veren uykudan yoksun kalma, kafeslere eğim verilmesi veya ortamın yükseltilmesi, yüksek derecede aydınlatılmış bir ortama bırakılması, herhangi başka bir yırtıcıya maruz kalma, koku alma duyusunun yok edilmesi, su dolu bir ortama bırakılması; ağrı veya fiziksel acı vermeyen, hayvanın stres uyarılarına karşı kendiliğinden oluşturduğu tepkiler sosyal izolasyon, uykudan yoksun kalma, maternal izolasyon, kuyruktan asma gibi modeller oluşturulmaktadır (117).

2.1.9. Sosyal İzolasyon Stresi

Karşılıklı etkileşim, sosyal olarak yaşayan hayvan ve insanlar için kilit öneme sahiptir. İnsanlarda prososyal davranış özellikle belirgindir ve sağlık ve uyum üzerinde koruyucu etkileri vardır (2). Buna göre, sosyal dışlanma ve izolasyon, duygudurum bozuklukları, psikoz ve uyuşturucu bağımlılığı dahil olmak üzere çok çeşitli zihinsel bozukluklarla ilişkilendirilen sıkıntının temel faktörleridir (6). COVID salgını sırasında yaygın karantina düzenlemeleri, sosyal izolasyonun davranışsal ve nörobiyolojik etkilerine olan ilgiyi daha da artırmıştır (118). Salgından dolayı tüm dünya genelinde uygulanan zorunlu sosyal izolasyon günümüzde en önemli stres faktörlerinden biri olarak kabul edilmektedir (119). Fakat bu sosyal izolasyonda

özellikle yeni gelişmekte olan ve stres etkenlerine karşı daha duyarlı olan çocuklar ve adölesanlar etkilenmiştir. Gelişimin erken dönemlerindeki kronik veya aşırı stres, bir organizmanın olayları anlama ve bilgi edinme, öğrenme yeteneği üzerinde uzun vadeli etkileri olan bir faktör olarak ortaya çıkmıştır (120).

Nörogelişim sırasındaki kritik zaman aralıkları, uzun süreli ve hatta geri döndürülemez etkiler açısından özel bir öneme sahip gibi görünmektedir. İnsanlar üzerinde yapılan klinik çalışmalardan elde edilen çok sayıda kanıt, erken dönem strese maruz kalmanın, duygulara aracılık etmede rol oynayan sinir devreleri düzeyinde çok sayıda derin ve uzun süreli nöroyapısal, nörofonksiyonel ve nörokimyasal değişikliklerle ilişkili olduğuna dair bulgular sunmuştur. Bu değişiklikler hep birlikte, değişen korku öğreniminin, artan stres hassasiyetinin, değişen ödül işleyişinin ve semptomların gelişiminin tezahürünün temelini oluşturduğu düşünülmektedir (121,122).

2.1.9.1. Sosyal İzolasyon, Prefrontal Korteks ve Hipokampus İlişkisi

Sosyal izolasyonun neden olduğu kronik stres, birçok psikiyatrik bozukluğun başlangıcı ve alevlenmesinde etiyolojik bir faktör olarak kabul edilmektedir. Deney hayvanlarında, kronik stres paradigmaları genellikle depresyon benzeri bozuklukların modelleri olarak kabul edilmektedir. Kronik stres etkenleri arasında, psikososyal ve duygusal bileşenlere sahip olanların, psikososyal strese ilişkin insan çalışmaları ile yakından ilişkili olabilmeleri nedeniyle özel bir önem taşıdığı düşünülmektedir. İnsanlardaki depresyon benzeri bozukluklarının karmaşık semptomatolojisi nedeniyle kemirgenlerde modelleme oldukça zordur, ancak bu bozuklukların patolojisini özetlemek için spesifik davranışlar ölçülebilmektedir (123).

Normal yaşamda organizmalar, çoğu kontrol edilebilen ve yeterli düzeyde başa çıkılabilen kısa süreli strese tekrar tekrar maruz kalmaktadır. Mevcut olan veriler, bu kadar kısa süreli stresin, nöronların şekli veya yetişkin nörogenezi üzerinde çok az etkiye sahip olduğunu, ancak hücrelerin iki zaman alanındaki fizyolojik işlevini değiştirdiğini göstermektedir. Stresten kısa bir süre sonra, limbik bölgelerdeki uyarılma ve katekolaminleri üreten beyin sapı nöronlarında hızla artar. Toplu olarak, bu aşamada stres hormonları odaklanmış dikkati, uyanıklığı ve olayla bağlantılı

bilgilerin kodlanmasındaki ilk adımları teşvik eder. Daha sonra, hormon konsantrasyonları stres öncesi seviyelerine geri döndüğünde, kortikosteroidlerin gen aracılı eylemleri, artan uyarılabilirliği tersine çevirir ve normalleştirilir; bu, stres etkenlerine karşı savunma reaksiyonlarını azaltmayı ve ilgili bilgilerin daha fazla depolanmasını sağlamayı amaçlayan uyarlanabilir bir yanıttır. Stres, kontrol edilemeyen ve önceden tahmin edilemeyen bir şekilde tekrar tekrar deneyimlendiğinde, beyinde, dendrit ve dendrit gövdesinin morfolojisinde derin, bölgeye özgü değişikliklere, yetişkin nörojenezinin baskılanmasına ve strese uygunsuz fonksiyonel tepkilere yol açan bir dizi süreç başlamaktadır (124).

Davranışsal değişikliklerin yanı sıra, kronik stresin nörobiyolojik sonuçları beynin çeşitli alanlarında, özellikle de limbik beyin yapılarında yapısal, işlevsel ve moleküler değişiklikleri de içerdiği bilinmektedir. Kronik stresin zararlı etkilerinin altında yatan temel mekanizmaların, HPA aksının geri bildirimi, hipokampus ve PFC gibi limbik beyin yapıları seviyesindeki stres tepkisinden ortaya çıktığı düşünülmektedir (125).

Yapılan çalışmalar, PFC ve hipokampus başta olmak üzere diğer limbik yapılar ve hormonal değişikliklerde olumsuz fizyolojik süreçlerin başlaması ile depresyon benzeri davranışların ortaya çıktığını göstermektedir. Kronik sosyal izolasyonun davranış ve beyin plastisitesine etkisine bakıldığında; özellikle hipokampusta NCAM (nöral hücre yapışma molekülü-plastisite biyobelirteci) ekspresyonunda anlamlı düzeyde artış olduğu, hayvanların kaygı ve depresyon benzeri davranış sergilediği bildirilmiştir (126). Başka bir çalışmada, kronik sosyal izolasyon stresinin PFC’de NCAM geninin indüksiyonunun değişmemesine rağmen, plastisite yanıtının azaldığını bildirmiştir (127).

Özellikle çocuk ve ergenlerde yani beynin gelişim döneminde maruz kalınan kronik stresin davranış değişiklikleri ile beraber kalıcı beyin hasarlarına sebep olduğu bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada, 21 günlük farelerde sosyal izolasyon stresinin PFC’deki piramidal hücrelerde aksiyon potansiyelinde bozulmaya ve sinaptik girdilerde azalmaya yol açtığı bildirilmiştir (128).

2.2. Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF)

BDNF (Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör), gelişim sırasında nöronal popülasyonların hayatta kalmasını ve farklılaşmasını düzenlemede kritik olarak rol oynayan nörotrofik faktörler ailesinin bir üyesidir (129). Çok sayıda kanıt, BDNF'nin yaşam boyunca farklı nöron devrelerinin yapısını ve fonksiyonlarını düzenlediğini de göstermektedir. BDNF, 1982 yılında ilk defa domuz beyninden saflaştırılmıştır (130).

BDNF, daha geniş bir TrkB reseptör ailesinin bir üyesi olan TrkB'yi bağlayıp aktive ederek normal beyin fonksiyonunun geliştirilmesi ve sürdürülmesinde rol oynayan birçok farklı hücresel süreci düzenlemektedir. Beyinde BDNF, glutamaterjik nöronlar, korteks ve hipokampustan izole edilen ancak striatumdan izole edilmeyen astrositler gibi glial hücreler ve mikroglia tarafından eksprese edilir (131,132). Embriyogenez sırasında BDNF-TrkB sinyali, kortikal progenitör hücrelerin farklılaşmasını teşvik eder ve daha sonra kortikal progenitör hücrelerin nöronlara farklılaşmasını (yani nörojenez) teşvik eder (132). Çeşitli kanıtlar, BDNF/TrkB sinyalleşmesinin hipokampustaki yetişkin nörojenezinde, dentat girus (DG) ve subventriküler bölgede (SVZ) farklı etkilerle rol oynadığını ileri sürmektedir (133).

BDNF, nöronal sağ kalımı ve farklılaşmayı düzenlemektedir (134). BDNF, endoplazmik retikulumda bir proBDNF öncüsü olarak sentezlenir, ardından proBDNF izoformunun üretildiği golgi aygıtına taşınır (135). proBDNF ve BDNF'nin sinaptik plastisite üzerindeki düzenleyici etkileri farklıdır ve genellikle zıttır. proBDNF'nin ergenlikte sinaptik plastisite ve nöral devrelerin oluşumunun önemli bir düzenleyicisi olabileceği varsayılmaktadır (134).

BDNF reseptörleri, özellikle beyinde hipokampus ve amigdala gibi strese duyarlı bölgelerde lokalizedir. Herhangi bir stres anında, bu bölgeler ve PFC'de meydana gelen değişiklikler kaygı, korku ve depresyon benzeri davranış değişiklikleri ile ilişkilendirilmiştir. Stres gibi güçlü bir dış uyarana maruz kalmak, BDNF ekspresyonunun azalmasına neden olmaktadır. Buna bağlı nöron ölümü ve olumsuz bilişsel değişiklikler görüldüğü bildirilmiştir (136). Yapılan bir çalışmada, sosyal izolasyona maruz kalan farelerde, PFC'de BDNF seviyeleri anlamlı olarak azaldığı bildirilmiştir (137). Başka bir çalışmada, sosyal izolasyona maruz kalan sıçanlarda hipokampusta azalmış BDNF ekspresyonu görülmüştür (138).

2.2.1. Sosyal İzolasyon Stresinin BDNF'e Etkisi

Sosyal izolasyon stresi, insanlarda ve hayvanlarda davranışsal ve bilişsel bozuklukların gelişimi için bir risk faktörüdür. Sosyal izole edilmiş hayvanlarda, aşırı saldırganlık, ajitasyon, bozulmuş motivasyon ve bilişsel eksikliklerin görüldüğü bildirilmiştir. Bu davranışsal değişikliklerin beyin yapılarındaki nöroplastisitedeki değişikliklere bağlı olduğuna inanılmaktadır (139).

Sosyal izolasyon stresinin özellikle BDNF reseptörlerinin yoğunlaştığı PFC, hipokampus, amigdala gibi davranış ve öğrenme ile ilgili beyin bölgelerinde yapısal bozulmalara neden olduğu bildirilmiştir (136). Yapılan bir çalışmada, sütten yeni kesilen 3 haftalık erkek farelerde 4 hafta kronik sosyal izolasyon uygulanmıştır. Çalışmada farelerde hipokampal BDNF seviyeleri anlamlı ölçüde azaldığı görülmüştür. Zorunlu yüzme ve kuyruktan asma testinde farelerde depresyon benzeri davranış gösterdiği; yükseltilmiş artı labirent testinde ise açık kollarda geçirilen sürenin anlamlı olarak azaldığı bildirilmiştir (140). Borges ve ark. yaptığı çalışmada, yetişkin sıçanlarda 4 haftalık sosyal izolasyon stresinin hipokampal BDNF seviyelerini anlamlı ölçüde azalttığı ve sıçan tüylerinde kortikosteron seviyelerinde anlamlı artış olduğu bildirilmiştir (141). Sosyal izolasyona maruz kalan 13 aylık dişi sıçanlarda, mPFC BDNF seviyelerinin anlamlı olarak azaldığı; ancak Morris su labirenti testinde sıçanların platformu bulma sürelerinde anlamlı bir azalma olmadığı bildirilmiştir (142).

2.3. TNF- α ve IL-6

Stres, bir organizmanın fizyolojik homeostazisi ve işlevi için kritik role sahip olan tepkileri yönlendirir. Ancak, stres tepkisinin düzensiz aktivasyonu organizmada istenmeyen bağışıklık tepkilerine yol açabilir. Stres ve bağışıklık sistemi arasındaki düzensiz etkileşimler, bağışıklık sistemi ve HPA aksının uyarılmasına neden olabilir. HPA aksının uyarılması, düzensiz kortikosteroid salınımına neden olurken; bu durum nöroinflamasyon ve proinflamatuvar sitokinlerin salınımına neden olmaktadır (143). Proinflamatuvar sitokinlerin özellikle kronik strese bağlı seviyelerinin yükseldiği ve depresyon benzeri davranışa neden olduğu bildirilmiştir (144). Kronik strese bağlı proinflamatuvar sitokin seviyelerinin artması, beyinde PFC ve hipokampusta artan

nöroinflamasyona ve buna bağılı gelişen depresyon benzeri davranışa neden olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda, özellikle Tümör Nekroz Faktörü Alfa (TNF- α) ve İnterlökin-6 (IL-6) gibi sitokinlerin PFC ve hipokampusta seviyelerinin arttığı görülmüş ve depresyon benzeri davranışlarla ilişkilendirilmiştir (144, 145, 146).

TNF- α , sistemik inflamasyon sırasında lenfositler, Natural killer hücreleri, nötrofiller, eozinofiller, makrofajlar/monositler tarafından üretilen bir inflamatuvar sitokindir ve hücreler içinde nekroza veya apoptoza yol açan çeşitli sinyal olaylarından sorumludur. TNF süper ailesine ait transmembran bir proteindir (147). 1975'te Carswell ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, farelere endotoksin verildikten sonra, makrofajlarda üretilen sitotoksik bir bileşik olduğu keşfedilmiştir. Belirli tümörlerde hızlı nekroza neden olduğu için TNF- α olarak adlandırılmıştır (148). TNF- α , hücre membranına bir trimer olarak bağlanır ve yüksek afiniteli reseptörleri ile etkilerini gösterir. Gen transkripsiyonunun aktivasyonu ve reaktif oksijen türleri veya nitrojen radikallerinin üretimi gibi hücre içinde çeşitli tepkileri tetikleyen bir dizi ikincil proteini aktive eder. Hücrede TNF- α 'nın lizozomlar tarafından parçalanması apoptoza neden olur (147). Yapılan bir çalışmada, tek bir stres atağının TNF- α ekspresyonunu arttığı bildirilmiştir (149). Başka bir çalışmada ise akut stres kaynaklı hipokampusta TNF- α seviyelerinin anlamlı olarak arttığı; farelerin depresyon benzeri davranış geliştirdiği gösterilmiştir (150).

İnterlökin-6 (IL-6), T lenfositlerden salınan ve B lenfositlerinin farklılaşmasına/antikor üretmesini uyaran 26 kD ağırlığında bir sitokin proteindir. B lenfositleri, astrositler, fibroblastlar, osteoblastlar ve PGE 5 hücrelerinden salgılanabilmektedir (151). IL-6, inflamasyon ve doku hasarlarında akut bağışıklık yanıtı olarak geçici şekilde üretilir. Ekspresyonu transkripsiyonel mekanizmalar tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilmesine rağmen, IL-6'nın düzensiz sürekli sentezi kronik inflamasyon ve otoimmünite üzerinde patolojik bir etki oynar. IL-6, inflamasyon varlığında sentezlendikten sonra kan yoluyla karaciğere geçer ve C-reaktif protein (CRP) gibi akut faz proteinlerinin hızla indüklenmesini sağlar. İnterlökin-6 proteinlerinin ekspresyonun artışı, hücrelerde sitotoksik bileşiklerin birikmesine neden olur (152).

IL-6'nın beyinle etkileşime girebileceği ve depresyon benzeri davranışa neden olabileceğine dair farklı mekanizmalara sahip iki ana sinyal yolu vardır. Klasik IL-6 sinyallemede, IL-6 yalnızca belirli hücre tiplerinde (karaciğer hücreleri ve bağışıklık hücreleri gibi) bulunan bir zar bağlı reseptöre (mIL-6R) bağlanır. Trans IL-6 sinyallemede, IL-6 dolaşımdaki çözünür bir IL-6 reseptörüne (sIL-6R) bağlanır. IL-6/sIL-6R kompleksi daha sonra (zar IL-6 reseptörleri olmayanlar da dahil olmak üzere) hücrelerle etkileşime girebilir. IL-6 ile beyin arasındaki etkileşimin çoğu trans yolu üzerinden gerçekleşir ve hayvan modelleri trans yolunun nöroinflamasyonda ve buna bağlı davranış değişikliğinde önemli bir rol oynadığını doğrulamıştır (153). Yapılan çalışmalarda ise artmış IL-6 seviyelerinin azalmış hipokampal nöroenez ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (154, 155).

2.3.1. Sosyal İzolasyon Stresinin TNF- α ve IL-6'ya Etkisi

İnsanlarda ve kemirgenlerde, vücudun sürekli strese maruz kalması fizyolojik değişikliklere neden olmaktadır. Özellikle düzensiz seviyelerde strese maruz kalmanın HPA aksını aktive ettiği bilinmektedir. Bununla birlikte, istenmeyen aktivasyonlar hücrelerde nöroinflamasyon ile birlikte inflamatuvar sitokin salınımına da neden olmaktadır (143).

Yapılan çalışmalarda kronik strese bağlı artmış TNF- α ve IL-6 seviyeleri depresyon benzeri davranış ve nöroinflamasyon neden olduğu gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada 3 haftalık süttan kesilen dişi farelerde sosyal izolasyonun hipokampus TNF- α ve IL-6 seviyelerinin anlamlı olarak arttığı ve depresyon benzeri davranışa neden olduğu bildirilmiştir (156). Sullens ve arkadaşlarının (157) yaptığı çalışmada, 18 aylık dişi farelerin sosyal izolasyondan sonra depresyon benzeri davranış geliştirdiği gözlenmiştir. Ancak dişi farelerde hipokampus TNF- α ve IL-6 seviyelerinin anlamlı olarak artmadığı bildirilmiştir. TNF- α 'nın depresyon benzeri davranışa etkisini inceleyen başka bir çalışmada, 8 haftalık erkek farelerin ventral hipokampusüne TNF- α sinyallemesini engelleyecek bir kanül yerleştirilmiştir. Çalışmada, sosyal izolasyon sonrası TNF- α blokajı olan farelerde, hipokampusta TNF- α indüksiyonunun azaldığı; depresyon ve kaygı benzeri davranışların anlamlı derecede gerilediği bildirilmiştir (158). 5 haftalık erkek sıçanlarda yapılan çalışmada, 8 hafta uygulanan kronik hafif stresin sıçanlarda serum TNF- α , IL-6, kortikosteron

seviyelerini anlamlı olarak arttırdığı ve hayvanlarda depresyon benzeri davranış ve agresyona neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca çalışmada sosyal izolasyon grubunda vücut yağı ve böbrek üstü bezi ağırlığının arttığı bildirilmiştir (159).

2.4. MDA ve GSH

Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ile organizmanın antioksidanlar ve detoksifikasyon mekanizmalarının etkileriyle ROS'u nötralize etme veya etkisiz hale getirme yeteneği arasındaki dengesizlik olarak tanımlanmaktadır (160). Aerobik hücreler metabolik süreçlerinin bir yan ürünü olarak reaktif oksijen ve nitrojen türleri (ROS/RNS) üretir ve vücudun antioksidan savunmasının alt üst olduğu koşullar altında ROS/RNS proteinler, lipitler ve nükleik asitler gibi makromoleküllerde oksidatif hasara neden olur (161). Normal koşullar altında belirli bir miktarda oksidatif/nitrozatif hasar meydana gelir, ancak organizmanın kronik strese maruz kalması anti-oksidatif ve onarım mekanizmalarının etkinliği azaldığından bu hasarın oranı artar (162).

Malondialdehit (MDA), ROS/RNS ve çoklu doymamış lipitler arasındaki reaksiyonun ürünüdür. Hücre zarları, ekstrinsik proteinlere sahip fosfolipit çift katmanlarıdır ve lipit oksidasyonunun doğrudan hedefidir (163). Hücre zarlarının lipit oksidasyonu arttıkça, lipit faz yüzey yükünün polaritesi ve protein oligomerlerinin oluşumu artar ve lipitlerin moleküler hareketliliği, -SH gruplarının sayısı ve termodenatürasyona direnç azalır. Hücre hasarı veya hastalığından sonra hücre bozunmasında yüksek düzeyde lipit oksidasyon ürünleri tespit edilebilir (164). Çoklu doymamış yağ asidinin nöronların zarlı bileşeni açısından zengin olduğu ve nöronal işlevlerin sürdürülmesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (165). Yaşlanmada yüksek MDA düzeyi bildirilmiştir (164). Lipid peroksidasyonu ve MDA üzerine yapılan tutarlı çalışmalarda, tiyobarbitürik asit reaktif asit maddesi (TBARS) olarak ölçülen depresyon benzeri davranışlarda artış görülmüştür (166).

Glutasyon (gama-glutamil-sisteinil-glisin; GSH) hücrede en çok bulunan düşük moleküler ağırlıklı tiyoldür ve GSH/glutasyon disülfür hayvan hücrelerindeki başlıca redoks çiftidir (167). Glutamat, sistein ve glisinden GSH sentezi, iki sitozolik enzim olan gama-glutamilsistein sentetaz ve GSH sentetaz tarafından sırayla katalize edilir.

Yapılan çalışmalar, GSH sentezinin öncelikle gama-glutamilsistein sentetaz aktivitesi, sistein mevcudiyeti ve GSH geri bildirim inhibisyonu tarafından düzenlendiğini göstermektedir (168). Hayvan ve insan çalışmaları, yeterli protein beslenmesinin GSH homeostazının korunması için çok önemli olduğunu göstermektedir (169). GSH, önemli bir endojen ROS/RNS temizleyicisidir ve azalması hücrel oksidatif strese karşı hassasiyeti artırabilir (164). GSH antioksidan savunma, besin metabolizması ve hücrel metabolizmanın düzenlenmesinde önemli rol oynar ve ayrıca nöropsikiyatrik ve nörodejeneratif hastalıkların başlangıcı ve ilerlemesi sırasında meydana gelen olaylarda rol oynar (170-172). GSH redoks dengesizliği bu hastalıkların birincil nedeni olabilir ve bu hastalıkların teşhisi için bir biyobelirteç olarak kullanılmıştır (171).

2.4.1. Sosyal İzolasyon Stresinin MDA ve GSH'a Etkisi

Kronik sosyal izolasyon stresi, hücrede total antioksidan kapasitesinin düşmesine ve bundan dolayı detoksifikasyon mekanizmasının bozulmasına neden olmaktadır. Lipit peroksidasyon ürünü olan MDA'nın seviyesinin yüksek olması çoklu doymamış yağ asidi içeren nöron zarlarının hasarına neden olmaktadır (165). Hücrede en çok seviyede bulunan GSH seviyesinin yükselmesi ise detoksifikasyonu ve hücrel sağkalımı sağlar (170).

Yapılan çalışmalarda özellikle oksidatif stresin artmasının depresyon benzeri davranışlara neden olduğu bildirilmiştir. Erkek Wistar sıçanlarda yapılan bir çalışmada, sıçanların kronik 21 gün sosyal izolasyonda kalmasının ardından PFC'de MDA seviyesi anlamlı olarak artmıştır. Çalışmada hipokampal GSH seviyesinin arttığı ve hipokampusün sosyal izolasyona daha duyarsız olduğu bildirilmiştir. Fakat izolasyon sonrası sıçanlarda yapılan davranış testleri ile depresyon ve anksiyete benzeri davranışlar anlamlı olarak artmıştır (173). Başka bir çalışmada, meme tümörlü farelerde sosyal izolasyon uygulanmasının kontrol grubuna göre MDA seviyesini anlamlı olarak arttırdığı bildirilmiştir (174). Baghaei ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 28 gün kronik sosyal izolasyon uygulanan sıçanlarda serum kortikosteron-hipokampal MDA seviyesinin ve TST ve FST testlerinde immobilité süresinin anlamlı olarak arttığı bildirilmiştir (175).

2.5. Adölesan Dönem ve Sosyal İzolasyon Stresinin Adölesan Döneme Etkisi

Adölesan dönem, çocukluktan yetişkinliğe geçiş dönemidir. Özellikle bu dönemde, sosyal çevrenin keşfi, beyin gelişimi ve mental sağlık gibi işlevlerin kritik olduğu bir dönemdir. Bireyde, çocukluktan yetişkinliğe geçerken cinsel olgunluğa ulaşması ile beraber benlik duygusu da ön plana çıkar. Bu dönemde bilişsel, sosyal ve duygusal becerilerini geliştirir. Bu gelişmelerin olduğu dönem ‘adölesan’ veya ‘ergenlik’ olarak isimlendirilir (176). Ergenlerde bu dönemde nörogenez daha hızlı olması, beyin gelişimi ve davranışsal gelişim için de büyük bir önem taşır. Bundan dolayı adölesanlarda, uzun süreli sosyal izolasyon, beyinde yapısal ve işlevsel değişikliklere neden olmasının yanı sıra anksiyete, depresyon benzeri davranışlar, saldırganlık ve sosyal ilişkilerde bozulma ile ilişkilendirilmiştir (177, 178, 179).

Farelerde, adölesan dönem doğum sonrası 28 ila 42. gün arası kabul edilmektedir. İnsanlarda ise 12-18 yaş adölesan dönem kabul edilir. Farelerde 60. günden itibaren üreme fonksiyonları gerçekleştiği için yetişkinlik döneminin başlangıcı olarak kabul edilir (180). Adölesan dönem kemirgenlerde, beyin gelişimi için önemli bir dönemdir. Hücre çoğalma hızı, dendrit yoğunluğu canlının diğer dönemlerine göre daha hızlı olurken, beyin hacmi bu dönemde artar (181). Aynı zamanda hipokampal nörogenez ve bilişsel fonksiyonların da hızlıca geliştiği bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada, farelerde kronik sosyal izolasyon uygulamasının hipokampal nörogenezi anlamlı ölçüde azalttığı ve IL-1 β seviyelerinin anlamlı olarak arttığı bildirilmiştir (182). Başka bir çalışmada, sosyal izole farelerde kontrol grubuna göre hipokampus nöron aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir (183). Wang ve ark. yaptığı çalışmada, ergenlik döneminde 7 hafta sosyal izolasyon stresine maruz bırakılan farelerde PFC ve hipokampusta nöron yoğunluğunu anlamlı olarak azaltırken, erişkinlik döneminde ise depresyon benzeri davranışları anlamlı ölçüde arttığı bildirilmiştir (184).

2.6. Sülforafan

Sülforafan (4-metilsülfinilbütül izotiyosiyanat, SFN), brokoli, karnabahar, lahana ve brüksel lahanası gibi Brassica (Turpgiller) ailesinde bulunan izotiyosiyanat

(ITC) grubuna ait alifatik bir organosülfür bileşiktir (11). İlk defa John Hopkins Üniversitesi'nde 1992 yılında keşfedilen SFN, brokolinin sağlık üzerindeki etkilerinden sorumlu biyoaktif bir bileşik olarak tanımlanmıştır (14). SFN'nin öncü maddesi olan glukorafanın bir fitokimyasaldır (12, 185). Glukorafanın, yapısında yerleşik şeker bulunduran (çoğunluklu D-glikoz) Glukosinolat (GLS) grubunun bir üyesidir. GLS'ların mirosinaz enzimi tarafından dönüştürülmesinin ardından, izotiyosiyanatlar merkapturik asit yoluyla metabolize edilir (14). İnsan ve hayvanlarda biyoaktivite göstermeyen GLS'ler; çiğneme, ısırma, kesme, pişirme, dondurma gibi bitki yapısının zarar gördüğü durumlarda mirosinaz enzimi tarafından izotiyosiyanat, nitril, tiyosiyanat, indol-3-karbinol'e hidrolize olarak aktiflik kazanırlar (12).

SFN, proteinlerin sistein kalıntılarıyla kolayca etkileşime girerek elektrofİL özellik gösterir. SFN, lipofilik özellikte ve moleküler boyutunun küçük olması nedeniyle hücre zarından kolaylaştırılmış difüzyon yoluyla geçer. Hücre içi ve dışı konsantrasyon eşitlenene kadar hücre zarından SFN geçişi devam eder. Hücre içinde Glutasyon S transferaz enzimi (GST) SFN'yi Glutatyona (GSH) bağlar (186, 187). SFN kararsız bir bileşik olduğu için hücre içine alınması ile ardışık bölünme reaksiyonları gerçekleşir. Bu reaksiyonlar sonucu, son ürün olarak SFN-N-asetilsistein (SFR-NAC) oluşur (188). Sıçan ve insanda yapılan çalışmalarda, saf SFN veya brokoli filizi ekstresi olarak oral yol ile verildiğinde; SFN'nin yaklaşık %70'inin 12-24 saat içinde merkapturik asit yolu ile karaciğerden elimine edildiği görülmüştür (187, 189, 190). SFN metabolitleri kararsızdırlar ve ana bileşiğe kolayca ayrışırlar. Conaway ve ark. merkapturik asit yolu ile oluşturulan SFN metabolitlerinin fizyolojik koşullar altında 14 dakika (SFN'nin sistein konjugatı) ile 173 dakika (N-asetilsistein konjugatı) arasında değişen bir yarı ayrışma süresine sahip olduğunu bildirmiştir (191).

2.6.1. Sülforafanın Stres Üzerindeki Etkisi

İnsanlarda ve kemirgenlerde, vücudun sürekli strese maruz kalması fizyolojik değişikliklere neden olmaktadır. Strese bağlı olarak HPA aksının aktivitesinin düzensiz olması, hücrede ortaya çıkan reaktif oksijen türleri ve bunlara bağlı olarak gelişen inflamasyon homeostasisi bozmaktadır. Yapılan çalışmalarda, stresin hücresel düzeyde reaktif oksijen ve nitrojen türlerini arttırarak oksidatif strese yol açtığı, düzensiz CRH salınımı ile birlikte kanda kortizol seviyelerini arttırarak inflamasyona

neden olduğu bilinmektedir. Özellikle fizyolojik konsantrasyonlarda hücrede serbest radikallerin hücrede artması hücre sinyalizasyonu ve bazı hücre yapılarının sentezini bozmaktadır (44).

Hücrede meydana gelen oksidasyon ve redüksiyon arasındaki dengesizlik lipid, protein ve nükleer DNA gibi moleküllerin redoks durumlarını etkiler. Lipid peroksidasyonu hücre membranı ve lipoproteinlerin parçalanması neden olurken sitoplazmada toksik reaktif aldehytlerin oluşmasına yol açar. Ortaya çıkan reaktif oksijen türleri proteinlerle birlikte reaksiyona girdiğinde, proteinlerin kısmen veya tamamen işlevsiz hale getirecek konformasyonel değişime neden olabilir. Bununla birlikte DNA mutasyonu, hücre döngüsünün bozulması ve apoptozis indüksiyonuna yol açabilir (192).

Sülforafan, çoklu antioksidan yanıtlarını düzenleyebilen ve nöronları oksidatif hasarlara karşı koruyabilen Nrf2'nin güçlü bir aktivatörüdür (14). Nrf2, hücreleri oksidatif hasardan korumada merkezi bir rol oynar ve oksidatif stresin etkileriyle savaşılan enzimlerin gen ekspresyonunu başlatır. Nrf2 hedef genleri, Nrf2 bağlanması ve gen indüksiyonu için gerekli olan promotör bölgelerinde antioksidan yanıt elementi (ARE) olarak bilinen ortak bir DNA dizisini paylaşır. Nrf2, tüm hücre tiplerinin sitoplazmasında sürekli olarak ifade edilir; ancak, normalde Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1 (KEAP1) aracılı ubiquitinasyon ve bozunma yoluyla düşük seviyelerde tutulur. Oksidatif stres dönemlerinde, reaktif oksijen türleri ile KEAP1'in sistein kalıntıları arasındaki etkileşim, Nrf2'nin KEAP1 aracılı ubiquitinasyondan ve bozunmadan kaçmasına ve hücrede oksidatif homeostazı yeniden sağlama amacıyla ARE içeren hedefleri indükleyebileceği çekirdeğe taşınmasına olanak tanır (193).

Yapılan birçok çalışmada, hücrede Nrf2'nin aktivasyonunu arttırdığı için oksidatif savunmada turpgiller ailesi ön plana çıkmaktadır. Sindirim sisteminde, turpgillerden bir bitki dokusu ilk olarak çiğneme işlemiyle yaralandığında, kimyasal olarak inert bir glukozinolat olan glukorafanın, bitki dokusunda veya bağırsak mikrobiyomunda bulunan salgılanan enzim mirosinaz'a maruz kalır ve hidrolize olur (194). Bu hidrolizin sonucu olarak glikoz açığa çıkar, SFN ve diğer ürünler oluşur. SFN, hidrofilik polifenoller gibi diğer daha büyük fitokimyasallara kıyasla biyoyararlanım açısından avantaj sağlayan nispeten küçük, lipofilik bir moleküldür

(MW = 177,29 g/mol) (195). Oral veya intravenöz SFN kullanan hayvan çalışmaları, biyoyararlanımının ~%80'e kadar çıktığını göstermektedir (196).

2.6.2. Sülforafanın Bilişsel Fonksiyonlar ve Davranışa Etkisi

Öğrenme, bellek, dikkat, sözel işlemler ve psikomotor hız gibi kognitif fonksiyonlar birçok alanda işlevselliği etkiler. Öğrenme ve bellek canlının hayatta kalma becerilerini etkilerken, dikkat ve sözel bellek psikososyal becerileri etkilemektedir (197). Sosyal izolasyon stresi, canlıdan beyne ve nörogeneze hasar verirken, kognitif fonksiyonlarda kötüleşmeye de neden olabilmektedir. Özellikle beynin davranış ve bellek merkezleri olan PFC ve hipokampus hasarıyla birlikte davranış değişikliklerine, uzamsal bellek eksikliğine, çağrışımsal öğrenmede gerilemeye, duygusal ve yürütücü işlevlerde eksikliği neden olabilir (198).

Akut veya kronik strese maruz kalma düşüncelerimizi, duygularımızı ve eylemlerimizi etkileyen PFC'in diğer beyin bölgeleriyle kurduğu bağlantıları etkiler. Kemirgenlerde, bu bölgelerde stres kaynaklı görülen hasarda özellikle depresyon ve anksiyete benzeri davranışlar, saldırganlık, ajitasyon ve herhangi bir şeye karşı duyarsızlık/isteksizlik görülebilmektedir. Yapılan bir çalışmada, skopolamin kaynaklı bellek hasarında SFN uygulamasının hipokampal dokularda LTP potansiyasyonunu anlamlı ölçüde arttığı bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada, SFN'nin kolinerjik ve muskarinik reseptör blokajını indüklediği, LTP ve bilişsel fonksiyonların zayıflamasını önlediği bildirilmiştir (199). Chen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, kronik sosyal yenilgi stresine (CSDS) maruz bırakılan farelerde SFN uygulamasının Nrf2 siyan yolağını aktiveleştirerek inflamatuvar yanıtı azalttığı bildirilmiştir. Çalışmada kontrol gruplarında kuyruktan asma testi ve Porsolt zorunlu yüzme testinde hayvanlarda depresyon benzeri davranışların görüldüğü, SFN uygulanan gruplarda ise depresyon benzeri davranışın anlamlı ölçüde gerilediği bildirilmiştir (200).

2.6.3. Sülforafanın BDNF'e Etkisi

BDNF, mevcut nöronların hayatta kalmasını destekleyen ve yeni nöronların ve sinapsların büyümesini ve farklılaşmasını teşvik eden bir nörotrofindir. SFN ise Nrf2 sinyal yolağının aktivasyonunu arttırmaktadır. Yapılan çalışmalarda Nrf2, ekson I promotörüne BDNF transkripsiyonunu düzenlediği bildirilmiştir (201, 202).

Kronik sosyal yenilgi stresi (CSDS) uygulanarak depresyon benzeri fenotipe sahip farelerde, 10 mg/kg SFN uygulamasının Nrf2 aktivasyonunu arttırdığı ve mPFC ve hipokampusta BDNF transkripsiyonunu anlamlı ölçüde arttırdığı bildirilmiştir. Çalışmada depresyon benzeri fenotip gösteren farelerde Morris su labirenti testinde bozulan bulgular, SFN uygulaması sonrası anlamlı ölçüde düzelmiştir (201). Kim ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise üçlü transgenik fare modeli ile oluşturulan Alzheimer hastalığında farelere 10 gün boyunca 10 mg/kg SFN uygulamasının primer kortikal nöronlarda MAP2, sinaptofizin ve PSD-95 gibi nöronal ve sinaptik moleküllerin seviyelerini anlamlı ölçüde artırdığı bildirilmiştir. Çalışmada, SFN uygulamasının HDAC aktivitesini inhibe ederek, HDAC2 protein seviyesinin düştüğü ve bu yol ile BDNF ekspresyonunun anlamlı ölçüde arttığı görülmüştür (202).

Gao ve arkadaşları periferik bağışıklığın baskılanmasının nöroinflamasyona neden olduğunu bildirmiştir. Bu inflamasyonun, uzamsal öğrenme ve hafıza bozukluğuna neden olabileceğini göstermişlerdir. Yaptıkları çalışmada, 7 gün boyunca uygulanan LPS enjeksiyonunun hayvanlarda Morris su labirenti testinde anlamlı olarak anormal davranışlar sergilerken, SFN uygulamasının bu davranışları tersine çevirdiği bildirilmiştir. Ek olarak, inflamatuvar sitokinlerin, sinaptik proteinlerin, BDNF-tropomiyozin reseptör kinaz B'nin (TrkB) ve mTOR sinyal yollarının hipokampal düzeyleri LPS kaynaklı bilişsel işlev bozukluğu ve SFN'nin terapötik etkileri süreçlerinde değiştiği gösterilmiştir. SFN'nin LPS kaynaklı bilişsel işlev bozukluğu üzerindeki yararlı etkilerini bloke edebileceğini ve sinaptik proteinlerin, BDNF-TrkB'nin ve mTOR sinyal yollarının hipokampal düzeylerinin anlamlı ölçüde arttığını gösterilmiştir (203).

2.6.4. Sülforağanın TNF- α ve IL-6'ya Etkisi

İnsan ve kemirgenlerde, herhangi bir strese maruz kalmanın HPA aksının aktivasyonunu arttırdığı bilinmektedir. Fakat bu stresin sürekli veya kontrolsüz olması HPA aksının düzensiz aktivasyonuna bağlı olarak inflamasyonu da tetiklemektedir (40, 41). TNF- α ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinler, hücrede artmış serbest radikallerin veya nöroinflamasyona yanıt olarak salgılanmaya başlar. TNF- α seviyelerinin artması hücrede apoptoza neden olurken, IL-6 seviyelerinin artması özellikle B lenfositlerin ve diğer bağışıklık hücrelerinin salınımına neden olmaktadır

(147, 151). SFN'nin, hücrede Nrf2 yolağının aktivasyonunu arttırarak Keap1-ARE protein kompleksinin artmasına ve buna bağlı ubikitinasyon ile serbest radikallerin seviyesinin azalmasına yardımcı olduğu bildirilmiştir (14, 193).

Wu ve ark. yaptığı çalışmada, kronik hafif strese (CMS) maruz kalan farelerde 14 gün SFN uygulamasının serum TNF- α ve IL-6 seviyelerinin anlamlı ölçüde azaldığı bildirilmiştir (34). Başka bir çalışmada, LPS uygulamasının farelerde depresyon benzeri davranışa neden olduğu; SFN ile tedavi sonrası ise serum TNF- α seviyesinin anlamlı ölçüde azaldığı ve beyin bölgelerinde mikrogial aktivasyonu arttırdığı bildirilmiştir (35). Yao ve ark. yaptığı çalışmada, Nrf2 KO⁻ farelerin sosyal yenilgi stresine maruz kaldıktan sonra PFC, hipokampus CA3 ve DG bölgelerinde TNF- α ve IL-6 seviyelerinin anlamlı olarak arttığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada, SFN ile ön tedavi sonrası farelerdeki depresyon benzeri davranışların anlamlı ölçüde azaldığı gösterilmiştir (204).

2.6.5. Sülforağanın MDA ve GSH'a Etkisi

MDA, ROS/RNS ve çoklu doymamış lipidler arasındaki reaksiyonun ürünüdür. Hücre zarları, ekstrinsik proteinlere sahip fosfolipit çift katmanlarıdır ve lipid oksidasyonunun doğrudan hedefidir (163). Hücre hasarı veya hastalığından sonra hücre bozunmasında yüksek düzeyde lipid oksidasyon ürünleri tespit edilebilir. GSH, önemli bir endojen ROS/RNS temizleyicisidir ve azalması hücrel oksidatif strese karşı hassasiyeti artırabilir (164).

Baghaei ve ark. yaptığı çalışmada, 28 gün kronik sosyal izolasyon uygulanan sıçanlarda serum kortikosteron-hipokampal MDA seviyesinin ve TST ve FST testlerinde immobilité süresinin anlamlı olarak arttığı bildirilmiştir (175). Yapılan başka bir çalışmada, kronik yenilgi stresi uygulanan sıçanlarda, beyin dokusunda MDA seviyesinin değişmediği, fakat GSH seviyesinin anlamlı olarak azaldığı bildirilmiştir (205). Erkek Wistar sıçanlarda yapılan bir çalışmada, sıçanların kronik 21 gün sosyal izolasyonda kalmasının ardından PFC'de MDA seviyesi anlamlı olarak artmıştır. Çalışmada hipokampal GSH seviyesinin arttığı ve hipokampusün sosyal izolasyona daha duyarsız olduğu bildirilmiştir. Fakat izolasyon sonrası sıçanlarda

yapılan davranış testleri ile depresyon ve anksiyete benzeri davranışlar anlamlı olarak artmıştır (173).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Bu araştırma, deneysel tipte bir araştırmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Bu araştırmada geçen tüm süreçlerin yeri ve zamanı Tablo-1’de belirtilmiştir:

Tablo 1. Araştırma Planı Tablosu.

Ekim-Aralık 2022	Tez önerisinin hazırlanması
	Tez önerisi sunumu ve kabulü
Aralık-Şubat 2023	Etik kurul onayı
	Proje önerisinin hazırlanması
Şubat-Nisan 2023	Projenin kabul edilmesi
	Malzeme alımları
Nisan-Ekim 2023	Deney prosedürlerinin başlaması
	Deney prosedürlerinin bitişi ve davranış testlerinin uygulanması
	Sakrifikasyon ve doku örneklerinin saklanması
Ekim 2023-Şubat 2024	Doku örneklerinin biyokimyasal ve histokimyasal incelenmesi
Şubat-Mayıs 2024	Bulguların Değerlendirilmesi
	İstatistiksel analizler
Mayıs-Eylül 2024	Tez ve yayın yazımı

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Araştırma deney hayvanları ile yapılmıştır. Bu nedenle, araştırmanın örneklemini ve evreni yoktur.

3.4. Çalışma Materyali

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Deneysel Araştırmalar Birimi'nden temin edilen fareler sakrifiye edildikten sonra beyinde PFC ve hipokampus bölgeleri Ekim 2023 tarihinde alınmıştır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bağımlı değişkenler: bilişsel fonksiyonlar, davranış, BDNF, TNF- α , IL-6, MDA, Glutasyon seviyeleri; bağımsız değişkenler: sosyal izolasyon ve Sülforafan olarak belirlenmiştir.

3.6. Veri Toplama Araçları

Tablo 2.Çalışmada kullanılan sarf malzemeleri tablosu.

Mevcut Altyapı/Ekipman Türü, Modeli (Laboratuvar, Araç, Makine Teçhizat vb.)	Mevcut Olduğu Kurum/Kuruluş	Projede Kullanım Amacı
Soğutmalı santrifüj (Hettich, Mikro 200R)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı	Deneylerdeki çöktürme işlemleri
Vorteks (IKA VF2)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı	Deneylerdeki karıştırma işlemleri
Buzdolabı	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı	Kitlerin saklanması
80° C derin dondurucu	Dokuz Eylül Üniversitesi	Örneklerin saklanması

	Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı	
Noldus Ethovision XT video tracking sistemi	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı	Davranış deneyleri kaydı ve analizi
Terazi (Kern EMB 1200- 1)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı	Hayvan ve yem tartma işlemleri
Hassas terazi (Kern)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı	Doku ve kimyasal malzeme tartma işlemleri
Ultrasonik homojenizatör (Bandelin Sonopuls)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı	Doku homojenizasyonu
Spektrofotometre (T80, PG instruments)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı	Enzimatik ölçümler
Plak Okuyucu (BioTek ELx800)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı	ELISA
İnkübatör (J P Selecta)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı	İmmünohistokimyasal inceleme
Mikrotom (Finesse me +,	Dokuz Eylül Üniversitesi	İmmünohistokimyasal

Thermo Scientific)	Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı	inceleme
Işık mikroskobu (Olympus CX41RF)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı	İmmünohistokimyasal inceleme
Kuyruktan Asma Testi	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı	Davranış deneyi

3.7. Araştırma Planı

3.7.1. Deney Hayvanlarının Sağlanması

Çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 02/04/2023 karar numaralı onayı, Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'nin TYL-2023-3147 kodlu proje desteği ile Dokuz Eylül Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı Deneysel Araştırmalar Biriminden sağlanan 42 adet, 28 günlük erkek Balb/c fareler ile gerçekleştirilmiştir. Deney hayvanları, Fizyoloji Anabilim Dalı Deneysel Araştırmalar Biriminde Balb/c fareler bulunması ve incelenen literatür ile uyumlu olduğu için bu cins seçilmiştir. Çalışma süresince fareler, 12 saat gece/gündüz döngüsünde, uygun nem (%60) ve sıcaklık (23 ± 2 °C) koşullarında barındırılmıştır. İzole olan fareler her biri ayrı kafeste birbirlerinden duyuşal ipucu almayacak şekilde, 25x42x15 cm boyutlarında kafeslerde barındırılmıştır. Diğer gruplar ise her kafeste 3-4 fare olacak şekilde, 35x55x18 cm boyutlarında kafeslerde barındırılmıştır. Farelerin erişebileceği bir biçimde içme suları ve yemleri kafeslere yerleştirildi. Suya ve yeme erişim ad libitum olarak sağlanmıştır. Hazır pelet yem kullanılmıştır. Her hafta kafesler temizlenmiş olup, çalışma boyunca her pazartesi günü farelerin vücut ağırlıkları kaydedilmiştir.

3.7.2. Çalışma Gruplarının ve Sosyal İzolasyon Modelinin Oluşturulması

Çalışmada kullanılan 28 günlük, 42 adet erkek Balb/c fare rastgele 6 gruba ayrıldı.

Sülforafan, farelere 10 mg/kg olarak %10 mısır yağı içeren distile suda çözündürülerek intraperitoneal yol ile verildi (203). Standardizasyonu sağlamak için kontrol ve sosyal izolasyon grubu SFN çözücüsü %10 mısır yağı içeren distile suyu intraperitoneal yol ile verildi. Çalışma grupları:

K: Kontrol Grubu (n=7)

SI: Sosyal İzolasyon Kontrol Grubu (n=7)

E-SFN: Erken Sülforafan Alan Grup (n=7)

SI-E-SFN: Sosyal İzolasyon + Erken Sülforafan Alan Grup (n=7)

G-SFN: Geç Sülforafan Alan Grup (n=7)

SI-G-SFN: Sosyal İzolasyon + Geç Sülforafan Alan Grup (n=7)

- I. **K: Kontrol Grubu (n=7);** Bu gruptaki fareler 4 hafta 35x55x18 cm boyutlarında fare kafeslerinde barındırıldı. Fareler, deney başlangıcından itibaren ardışık 7 gün boyunca %10 mısır yağı içeren distile suyu intraperitoneal yol ile verildi. Enjeksiyon dozları hayvanların güncel ağırlıklarına göre hesaplanmıştır. Deney süresinin kalan 21 gününde deney hayvanlarına, her hafta vücut ağırlığı ölçmek için tartıya konulması dışında herhangi bir fiziksel uygulama yapılmadı. Farelere deney bitiminden sonra davranış testleri yapıldı.
- II. **SI: Sosyal İzolasyon Kontrol Grubu (n=7);** Bu gruptaki fareler 4 hafta süre ile sosyal izolasyonda kaldılar. Deney hayvanları ardışık 28 gün boyunca, boyutları 25 x 42 x 15 cm olan fare kafeslerinde birbirlerinden duysal ipucu almayacak şekilde, kafesler ses emen köpük kafeslere konarak, her kafeste tek fare barındırılmıştır. Farelere, sosyal izolasyonun başlangıcından itibaren ardışık ilk 7 gün boyunca %10 mısır yağı içeren distile suyu intraperitoneal yol ile verildi. Enjeksiyon dozları hayvanların güncel ağırlıklarına göre hesaplanmıştır. Deney süresinin kalan 21 gününde

deney hayvanlarına, her hafta vücut ağırlığı ölçmek için tartıya konulması dışında herhangi bir fiziksel uygulama yapılmadı. Farelere deney bitiminden sonra davranış testleri yapıldı.

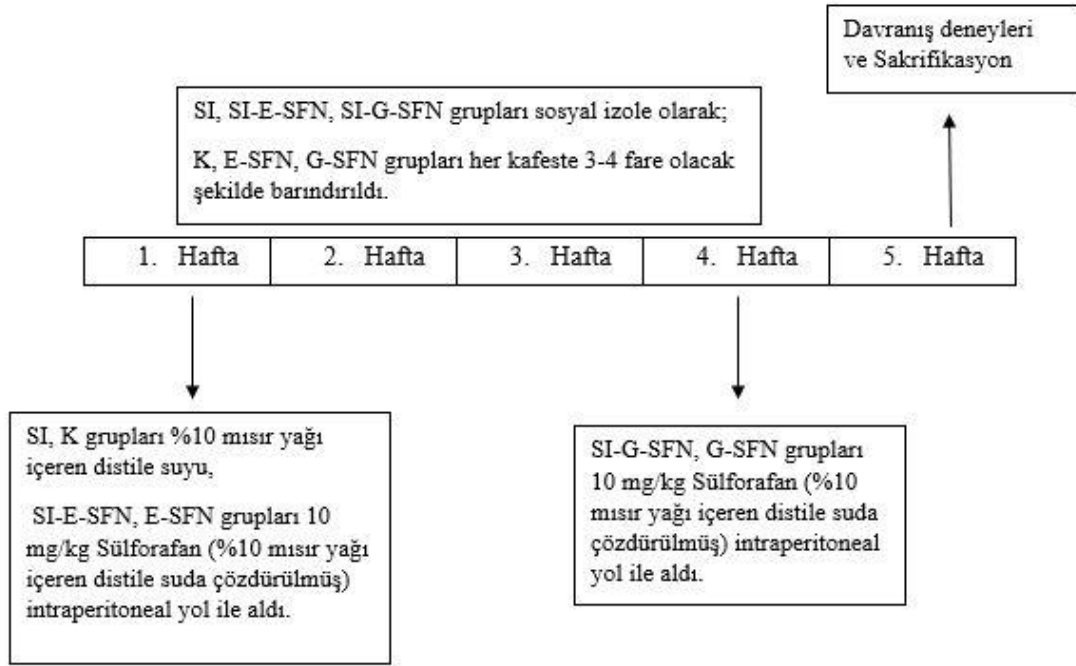
III. E-SFN: Erken Sülfurafan Alan grup (n=7); Bu gruptaki fareler 4 hafta 35x55x18 cm boyutlarında fare kafeslerinde barındırıldı. Fareler, deney başlangıcından itibaren ardışık 7 gün boyunca 10 mg/kg Sülfurafan (%10 mısır yağı içeren distile suda çözündürülmüş) intraperitoneal yol ile verildi. Enjeksiyon dozları hayvanların güncel ağırlıklarına göre hesaplanmıştır. Deney süresinin kalan 21 gününde deney hayvanlarına, her hafta vücut ağırlığı ölçmek için tartıya konulması dışında herhangi bir fiziksel uygulama yapılmadı. Farelere deney bitiminden sonra davranış testleri yapıldı.

IV. SI-E-SFN: Sosyal İzolasyon + Erken Sülfurafan Alan Grup (n=7); Bu gruptaki fareler 4 hafta süre ile sosyal izolasyonda kaldılar. Deney hayvanları ardışık 28 gün boyunca, boyutları 25 x 42 x 15 cm olan fare kafeslerinde birbirlerinden duysal ipucu almayacak şekilde, kafesler ses emen köpük kafeslere konarak, her kafeste tek fare barındırılmıştır. Farelere, sosyal izolasyonun başından itibaren ardışık 7 gün boyunca 10 mg/kg Sülfurafan (%10 mısır yağı içeren distile suda çözündürülmüş) intraperitoneal yol ile verildi. Enjeksiyon dozları hayvanların güncel ağırlıklarına göre hesaplanmıştır. Deney süresinin kalan 21 gününde deney hayvanlarına, her hafta vücut ağırlığı ölçmek için tartıya konulması dışında herhangi bir fiziksel uygulama yapılmadı. Farelere deney bitiminden sonra davranış testleri yapıldı.

V. G-SFN: Geç Sülfurafan Alan grup (n=7); Bu gruptaki fareler 4 hafta 35x55x18 cm boyutlarında fare kafeslerinde barındırıldı. Fareler, 4 haftalık deney süresinin son haftasında, ardışık 7 gün boyunca 10 mg/kg Sülfurafan (%10 mısır yağı içeren distile suda çözündürülmüş) intraperitoneal yol ile verildi. Deney süresinin başındaki 21 günde deney hayvanlarına, her hafta vücut ağırlığı ölçmek için tartıya konulması dışında herhangi bir fiziksel uygulama yapılmadı. Farelere deney bitiminden sonra davranış testleri yapıldı.

VI. SI-G-SFN: Sosyal İzolasyon + Geç Sülförafan Alan Grup (n=7); Bu gruptaki fareler 4 hafta süre ile sosyal izolasyonda kaldılar. Deney hayvanları ardışık 28 gün boyunca, boyutları 25 x 42 x 15 cm olan fare kafeslerinde birbirlerinden duysal ipucu almayacak şekilde, kafesler ses emen köpük kafeslere konarak, her kafeste tek fare barındırılmıştır. Farelere, 4 haftalık deney süresinin son haftasında, ardışık 7 gün boyunca 10 mg/kg Sülförafan (%10 mısır yağı içeren distile suda çözödürölmüş) intraperitoneal yol ile verildi. Deney süresinin başındaki 21 günde deney hayvanlarına, her hafta vücut ağırlığı ölçmek için tartıya konulması dışında herhangi bir fiziksel uygulama yapılmadı. Farelere deney bitiminden sonra davranış testleri yapıldı.

Tüm gruplara, deney bitiminden 24 saat sonra Açık Alan Testi (OFT), deney bitiminden 27 saat sonra Kuyruktan Asma Testi (TST), deney bitiminden 29 saat sonra Porsolt Zorunlu Yüzme Testi (FST) uygulandı. Bu testlerin (OFT, TST, FST) bitiminden 24 saat sonra farelere Morris Water Maze Testi (MWM) uygulandı. Deney hayvanlarının haftalık ağırlık takipleri yapıldı. Davranış testleri bittikten hemen sonra, fareler eter anestezisi altında kardiyak punksiyon ile sakrifiye edildi. Farelerden alınan beyin dokularında Prefrontal Korteks ve te Hipokampusta nörotrofik faktör olarak BDNF; proinflamatuvar sitokin olarak TNF- α ve IL-6, reaktif oksijen türü olarak MDA ve GSH parametreleri ELİSA testi ile değörlendirildi. Alınan beyin dokularında nöron sayımı yapılp, her kesitte üç farklı alanda sayımlar yapılarak ortalamaları alındı.



Şekil 1. Deney Aşamalarının Şematik Gösterimi

3.7.3. Sülforafan Çözeltisinin Hazırlanması ve Uygulanması

Sülforafan (HY-13755 MedChem Express), %10 mısır yağı içeren distile su içerisine konarak Ultrasonik Homojenizatör (Bandelin Sonopuls) ile (%70 power, 30 sn) çözündürülmüştür. Her hayvanın güncel ağırlığına göre, günlük 10 mg/kg Sülforafan çözeltisi intraperitoneal enjeksiyon ile hayvanlara verilmiştir. Sülforafan alan deney grupları ardışık 7 gün olarak deney başında veya sonunda toplam 7 defa gerçekleştirilmiştir.

3.7.4. Davranış Testleri

3.7.4.1. Açık Alan Testi

Açık Alan Testi (Open Field Test-OFT), kemirgenlerde hareket, kaygı, tırmanma gibi davranışların incelenmesine dayalı kare şeklinde bir davranış testidir ve ilk olarak 1934'te Hall tarafından kullanılmıştır (206). Bu test, deneğin bilmediği bir ortama konulduğunda, yeni çevreye karşı artan stres seviyesi ile daha az keşfetmeye eğilim ve lokomotor hareketlerdeki davranışlarının değişiminin gözlemlenmesine dayalıdır. Keşfetme eğilimi ve lokomotor davranış, açık alanın 16 kareye bölünmesi

ve bu karelerin kaçında geçişin olduğunun yanı sıra hangi karelerde ne kadar zaman harcadığının hesaplanmasıyla belirlenir. Stres seviyesi yüksek hayvanlar, yerleştirildikleri karede veya o karenin çevresinde kalma eğilimi taşır. Bundan dolayı yerleştirildikleri bölgede harcadıkları süre fazla olmasına rağmen lokomotor hareket ve keşfetme eğilimi azalmaktadır.

Açık alan testi 1 m x 1 m alana sahiptir. Alanı aydınlatmak için 35 lükslük bir ışık kaynağı kullanılmıştır. Deney hayvanlarının ortama alışması için deneyden 30 dakika önce test odasına getirilmiştir. Testte kullanılan 42 Balb/c erkek fare, 16 parçaya bölünmüş alanın tam ortasına bırakılıp 5 dakika boyunca hareketleri kaydedilmiştir. Dokuz Eylül Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı Davranış Laboratuvarında bulunan Noldus Ethovision XT video tracking sistemi ile kayıt alınmıştır. Program, farenin bulunduğu alanda yürüme, durma ve geçirdiği süreleri kaydetmiştir. Her deneyden sonra yeni fareyi koymadan önce platform yüzeyi %70'lik alkol ile temizlenmiştir.

3.7.4.2. Kuyruktan Asma Testi

Kuyruktan Asma Testi (Tail Suspension Test-TST), potansiyel antidepresan ilaçların taranmasında ve depresyon ve anksiyete ile ilgili davranışları etkilemesi beklenen diğer manipülasyonların değerlendirilmesinde kullanılan bir fare davranış testidir. Bu testte fareler, kaçamayacakları veya yakındaki yüzeylere tutunamayacak şekilde kuyruklarından bant ile asılır. Depresyon benzeri davranış göstermeyen farelerde özellikle kendini sağa-sola sallanarak kurtarma, kuyruklarına veya asıldıkları banta tırmanma davranışları gözlemlenir. Depresyon benzeri davranış gösteren farelerde asıldıkları yerde patilerini karınlarında toplayarak hareketsiz kalma veya kendini temizleme davranışı gözlemlenmektedir (207).

Çalışmamızda fareler, kuyruklarından yukarı asıldıkları; 55 cm yükseklik, 60 cm genişlik, 11.5 cm derinliği olan 3 duvarlı dikdörtgen bir kutu içinde kuyruklarından bir bant yardımıyla bir kancaya asıldılar. Sağladığımız ölçümlere göre farenin asılı halde iken kafası ile alt zemin arasında 20 -25 cm aralık bırakılmıştır. Kutunun yan duvarları beyaz, alt zemini ise siyah renkti. Deneklerin test aşamasında birbirlerinden etkilenmemesi için kutu her testten sonra steril edici bir solüsyon ile silinmiştir. Test

izlemi için video kamera, farenin net görüntülenebildiği en yakın noktaya (35 -50 cm) kondu. Her bir fare toplamda 6 dakika izlendi ve çift-kör olarak izlenen videolarda immobilité ve mobilite süreleri değerlendirilmiştir.



Şekil 2. Kuyruktan Asma Testi Düzenegi

3.7.4.3. Porsolt Zorunlu Yüzme Testi

Porsolt Zorunlu Yüzme Testi (Forced Swim Test-FST), Porsolt ve arkadaşları tarafından 1978 yılında geliştirilen bir davranış testidir. İlk önce sıçanlarda denenilen testte sonradan farelerde denenmeye başlanmıştır. Hayvanlar, kaçamayacakları içi su dolu bir silindirin içinde yüzmeye zorlanır. Başlangıçta güçlü bir lokomotor aktivite sergileyen hayvanlar bir süre sonra karakteristik hareketsiz kalma davranışı gösterirler. Porsolt ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, bazı antidepresanların bu hareketsizliği azaltan davranışlara neden olduğu bildirilmiştir (208). Bu davranış testinde hayvanlarda genelde gözlemlenen 3 tipik davranış vardır. İlk davranış tipi, depresyon benzeri mod sergilemeyen hayvanlarda silindirin kenarından dışarı kaçmak için gösterdiği tırmanma (climbing) davranışdır. İkinci davranış, depresyon benzeri mod sergilediğini veya hayvanın yorulduğunu belirtilen yüzme (swimming) davranışdır. Bu harekette, hayvan arka patilerini karnına çeker, ön patileri ve kuyruğu ile suda yüzer. Üçüncü davranış, hayvanın hiçbir kaçma çabası göstermeyecek şekilde sadece

suyun içinde batmamak için kuyruğunu hareket ettirmesi ile bilinen immobil davranıştır. Depresif hayvanların ağırlıklı olarak yüzme ve hareketsiz (immobil) kalma davranışı sergilediği bildirilmiştir (209).

Çalışmamızda fareler, silindirin içinde yere değmesine veya duvardan atlamasına izin vermeyecek seviyede su bulunan bir silindire (yükseklik 50 cm, çap 30 cm) bireysel olarak yerleştirilmiştir. Silindirin yan tarafına ve 50 cm uzağa bir video kamera yerleştirildi. Suyun sıcaklığı 25 °C'de tutuldu. Farelerin birbirinden etkilenmemesi için su her testten sonra değiştirilmiştir. Fareler test aparatına yerleştirildikten sonra 5 dakika izlendi. 5 dakikalık video kesiti her biri 5 saniye olacak şekilde 60 parçaya bölünüp, her kesit tırmanma(climbing), yüzme(swimming) ve immobil olarak numaralandırıldı. Video kesitler çift-kör şeklinde analiz edilmiştir.



Şekil 3. Porsolt zorunlu yüzme testi düzeneği.

3.7.4.4. Morris Su Labirenti Testi

Morris Su Labirenti Testi (Morris Water Maze Test-MWM), 1981 yılında nöro bilimci Richard G. Morris tarafından geliştirilen, mekânsal hafıza ve uzun süreli hafızanın edinilmesini ve hipokampal öğrenmeyi test etmek amacıyla kullanılan bir davranış testidir (210). Çalışmada kullanılan su tankı, 140 cm çapında ve 75 cm yüksekliğindedir. Tanktaki su seviyesi, kaçış platformunun yüksekliğinin 1 cm üzerinde olacak şekilde 75 cm olarak ayarlandı. Tankın merkezinden 2 m yükseklikte farelerin davranışlarını izlemek ve kaydetmek için bir video kamera kuruldu. Kullanılan program aracılığıyla videoda görünen tank kuzey, güney, doğu ve batı

olmak üzere 4 eşit kadrana bölündü. Her kadranın üstünde hayvanın o bölgeyi öğrenmesini ve hatırlamasını sağlayacak renkli şekiller yerleştirildi. Kuzeye sarı küre, güneye yeşil küp, batıya mavi dikdörtgen, doğuya kırmızı üçgen şekilleri yerleştirilmiştir. Tank içerisindeki kaçış platformunun görünmemesi için tankın içi ve platform mat siyah renkte seçilmiştir. Hayvanlar 1 su labirenti görevinde 5 gün boyunca test edildi. Her gün fareler, suya (22 ± 1 °C) yerleştirilecek olup ekstra labirent ipuçları kullanarak gizli ama sabit bir kaçış platformu bulana kadar yüzmelerine izin verildi (maksimum yüzme süresi 60 saniye). Kaçış platformu, havuzun rastgele bölümlerinden birinin ortasına yerleştirildi. Denek 60 saniye içinde platformu bulamazsa; deneyci, fareyi platforma yerleştirip 15 saniye orada bırakıp hayvanın etrafı izlemesini sağlamıştır. Her fare, denemeler arası 60 saniyelik bir aralıkla günde beş ardışık deneme için test edildi. Her fareye arka arkaya dört gün (toplam 20 deneme) görev verilip 5. günde platformun havuzdan çıkarıldığı bir yoklama denemesi yapıldı. Fareler havuza yerleştirilip 60 saniye yüzmelerine izin verildi. Veriler, platformu ve seçilen kadranda geçirilen süreyi bulmak için gecikme zamanına göre analiz edildi. Bu deneyde, Noldus Ethovision XT kayıt sistemi kullanıldı.

Bu deneyde test edilen spasyal öğrenme, beyindeki hipokampus bölgesini doğru yön ve görsel ipuçlarını hatırlayarak kullanmayı hedeflemektedir. Farenin görsel ipuçlarına göre gizli platformu bulması veya hedef kadranı bulması ve orada süre geçirmesi beklenir (211). Bu testte, hayvanın doğru kadranı veya gizli platformu daha kısa sürede bulması hipokampal aktivite ve disfonksiyonunu değerlendirmek için kullanılan önemli bir parametredir ve sıklıkla kullanılır (212, 213).



Şekil 4. Morris su labirenti düzeneği.

3.7.5. *Sakrifikasyon ve Dokuların Ayrımı*

Çalışmamızda, davranış testlerinin hemen ardından fareler hafif eter anestezisi altında kardiyak punksiyon yolu ile sakrifiye edilmiştir. Sakrifikasyon sonrası hızlıca beyin çıkarılmıştır. Buzla soğutulan ortamda, kognitif fonksiyonlar ve davranış ile ilgili PFC ve hipokampus bölgeleri disseke edilmiştir. ELISA ve biyokimyasal parametreler için kullanılacak dokular -80 °C’de saklanmıştır. İmmunohistokimyasal ölçümler için kullanılacak dokular %10’luk formalin içine alınmış olup, doku takibi sonrası parafin bloklar şeklinde oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.7.6. *Biyokimyasal Değerlendirme*

Çalışmamızda, kognitif fonksiyonlar ve davranış ile ilişkili PFC ve hipokampus bölgelerindeki nörotrofik faktörlerden biri olan BDNF; proinflamatuvar sitokinlerden TNF- α ve IL-6; oksidatif stres biyobelirteçlerinden MDA ve GSH’ı değerlendirmek için ticari amaçlı ELISA kitleri kullanılmıştır. Total protein ölçümü için ticari protein kiti kullanılmıştır.

3.7.6.1. BDNF Ölçümü

BT-Lab Mouse BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) ELISA Kiti

Katalog No: E0013Mo

Lot. No: 202411008

Kit ölçüm aralığı 0.05-10 ng/ml; hassasiyeti 0.021 ng/ml'dir.

Standartlar ve reaktifler önerilen protokole göre hazırlanmıştır.

1. Kit oda sıcaklığına geldikten sonra standartlar için 7 kuyucuk, boşluk (blank) için bir kuyucuk hazırlanmıştır. Talimatlara 120 µl standart çözelti hazırlanıp, her standartlar için ayrılan kuyucuğa 50 µl standart pipetlenmiştir.
2. Ardından her kuyucuğa 40 µl örnek konulup, 10 µl BDNF antibody eklenmiştir. 50 µl streptavidin-HRP çözeltisi blank dışında diğer kuyucuklara eklenmiştir. Kuyucukların üstü şeffaf bir kapatıcı ile kapatılıp yavaşça çalkalanmıştır. 37 °C'de 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
3. Kitten çıkan 25X Wash Buffer X konsantrasyonuna dilüe edilmiştir. İnkübasyondan çıkan kuyucuklara 5 defa 1/25x Wash Buffer ile yıkanmıştır. Her yıkamada kuyucuğa 300 µl Wash Buffer eklenmiştir. Her yıkamada 30 sn-1 dk arası beklenmiştir. İçinde kalan sıvı, emici bir kağıt ile giderilmiştir.
4. Her kuyucuğa 50 µl substrat A ve 50 µl substrat B eklendikten sonra karanlık ortamda 37 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
5. Ardından her kuyucuğa 50 µl Stop solüsyonu eklenip, mavi rengin fosforlu sarı olması gözlemlenmiştir.
6. Oluşturulan absorbanslar hemen spektrofotometrik plak okuyucuda 450 nm'de ölçülmüştür.

3.7.6.2. TNF-α Ölçümü

BT-Lab Mouse TNF-α (Tumor Necrosis Factor Alpha) ELISA Kiti

Katalog No: E0117Mo

Lot. No: 202406083

Kit ölçüm aralığı 5-1000 ng/L; hassasiyeti 2.49 ng/L'dir.

Standartlar ve reaktifler önerilen protokole göre hazırlanmıştır.

1. Kit oda sıcaklığına geldikten sonra standartlar için 7 kuyucuk, boşluk (blank) için bir kuyucuk hazırlanmıştır. Talimatlara 120 µl standart çözelti hazırlanıp, her standartlar için ayrılan kuyucuğa 50 µl standart pipetlenmiştir.
2. Ardından her kuyucuğa 40 µl örnek konulup, 10 µl fare TNF- α antibody eklenmiştir. 50 µl streptavidin-HRP çözeltisi blank dışında diğer kuyucuklara eklenmiştir. Kuyucukların üstü şeffaf bir kapatıcı ile kapatılıp yavaşça çalkalanmıştır. 37 °C'de 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
3. Kitten çıkan 25X Wash Buffer X konsantrasyonuna dilüe edilmiştir. Inkübasyondan çıkan kuyucuklara 5 defa 1/25x Wash Buffer ile yıkanmıştır. Her yıkamada kuyucuğa 300 µl Wash Buffer eklenmiştir. Her yıkamada 30 sn-1 dk arası beklenmiştir. İçinde kalan sıvı, emici bir kağıt ile giderilmiştir.
4. Her kuyucuğa 50 µl substrat A ve 50 µl substrat B eklendikten sonra karanlık ortamda 37 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
5. Ardından her kuyucuğa 50 µl Stop solüsyonu eklenip, mavi rengin fosforlu sarı olması gözlemlenmiştir.
6. Oluşturulan absorbanslar hemen spektrofotometrik plak okuyucuda 450 nm'de ölçülmüştür.

3.7.6.3. IL-6 Ölçümü

BT-Lab Mouse IL-6 (Interleukin 6) ELISA Kiti

Katalog No: E0049Mo

Lot. No: 202403246

Kit ölçüm aralığı 3-900 pg/ml; hassasiyeti 1.5 pg/ml'dir.

Standartlar ve reaktifler önerilen protokole göre hazırlanmıştır.

1. Kit oda sıcaklığına geldikten sonra standartlar için 7 kuyucuk, boşluk (blank) için bir kuyucuk hazırlanmıştır. Talimatlara 120 µl standart çözelti hazırlanıp, her standartlar için ayrılan kuyucuğa 50 µl standart pipetlenmiştir.
2. Ardından her kuyucuğa 40 µl örnek konulup, 10 µl IL-6 antibody eklenmiştir. 50 µl streptavidin-HRP çözeltisi blank dışında diğer kuyucuklara eklenmiştir. Kuyucukların üstü şeffaf bir kapatıcı ile kapatılıp yavaşça çalkalanmıştır. 37 °C’de 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
3. Kitten çıkan 25X Wash Buffer X konsantrasyonuna dilüe edilmiştir. İnkübasyondan çıkan kuyucuklara 5 defa 1/25x Wash Buffer ile yıkanmıştır. Her yıkamada kuyucuğa 300 µl Wash Buffer eklenmiştir. Her yıkamada 30 sn-1 dk arası beklenmiştir. İçinde kalan sıvı, emici bir kağıt ile giderilmiştir.
4. Her kuyucuğa 50 µl substrat A ve 50 µl substrat B eklendikten sonra karanlık ortamda 37 °C’de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
5. Ardından her kuyucuğa 50 µl Stop solüsyonu eklenip, mavi rengin fosforlu sarı olması gözlemlenmiştir.
6. Oluşturulan absorbanslar hemen spektrofotometrik plak okuyucuda 450 nm’de ölçülmüştür.

3.7.6.4. MDA Ölçümü

BT-Lab Mouse MDA (Malondialdehyde) ELISA Kiti

Katalog No: E0049Mo

Lot. No: 202409014

Kit ölçüm aralığı 0.05-10 nmol/ml; hassasiyeti 0.023 nmol/ml’dir.

Standartlar ve reaktifler önerilen protokole göre hazırlanmıştır.

Kit oda sıcaklığına geldikten sonra standartlar için 7 kuyucuk, boşluk (blank) için bir kuyucuk hazırlanmıştır. Talimatlara 120 µl standart çözelti hazırlanıp, her standartlar için ayrılan kuyucuğa 50 µl standart pipetlenmiştir.

1. Ardından her kuyucuğa 40 µl örnek konulup, 10 µl anti-MDA antibody eklenmiştir. 50 µl streptavidin-HRP çözeltisi blank dışında diğer kuyucuklara

eklenmiştir. Kuyucukların üstü şeffaf bir kapatıcı ile kapatılıp yavaşça çalkalanmıştır. 37 °C’de 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

2. Kitten çıkan 25X Wash Buffer X konsantrasyonuna dilüe edilmiştir. İnkübasyondan çıkan kuyucuklara 5 defa 1/25x Wash Buffer ile yıkanmıştır. Her yıkamada kuyucuğa 300 µl Wash Buffer eklenmiştir. Her yıkamada 30 sn-1 dk arası beklenmiştir. İçinde kalan sıvı, emici bir kağıt ile giderilmiştir.
3. Her kuyucuğa 50 µl substrat A ve 50 µl substrat B eklendikten sonra karanlık ortamda 37 °C’de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
4. Ardından her kuyucuğa 50 µl Stop solüsyonu eklenip, mavi rengin fosforlu sarı olması gözlemlenmiştir.
5. Oluşturulan absorbanslar hemen spektrofotometrik plak okuyucuda 450 nm’de ölçülmüştür.

3.7.6.5. GSH Ölçümü

BT-Lab Mouse GSH (Glutathione) ELISA Kiti

Katalog No: E2594Mo

Lot. No: 202305002

Kit ölçüm aralığı 0.5-200 ng/ml; hassasiyeti 0.33 ng/ml’dir.

Standartlar ve reaktifler önerilen protokole göre hazırlanmıştır.

1. Kit oda sıcaklığına geldikten sonra standartlar için 7 kuyucuk, boşluk (blank) için bir kuyucuk hazırlanmıştır. Talimatlara 120 µl standart çözelti hazırlanıp, her standartlar için ayrılan kuyucuğa 50 µl standart pipetlenmiştir.
2. Ardından her kuyucuğa 40 µl örnek konulup, 10 µl fare GPx1 antibody eklenmiştir. 50 µl streptavidin-HRP çözeltisi blank dışında diğer kuyucuklara eklenmiştir. Kuyucukların üstü şeffaf bir kapatıcı ile kapatılıp yavaşça çalkalanmıştır. 37 °C’de 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
3. Kitten çıkan 25X Wash Buffer X konsantrasyonuna dilüe edilmiştir. İnkübasyondan çıkan kuyucuklara 5 defa 1/25x Wash Buffer ile yıkanmıştır. Her yıkamada kuyucuğa 300 µl Wash Buffer eklenmiştir. Her yıkamada 30 sn-1 dk arası beklenmiştir. İçinde kalan sıvı, emici bir kağıt ile giderilmiştir.

4. Her kuyucuğa 50 µl substrat A ve 50 µl substrat B eklendikten sonra karanlık ortamda 37 °C’de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
5. Ardından her kuyucuğa 50 µl Stop solüsyonu eklenip, mavi rengin fosforlu sarı olması gözlemlenmiştir.

Oluşturulan absorbanslar hemen spektrofotometrik plak okuyucuda 450 nm’de ölçülmüştür.

3.7.6.6. Total Protein Ölçümü

Çalışmamızda, PFC ve hipokampus dokularında total protein ölçümü Pierce BCA Protein Essay Kit (23227, Thermo Scientific) kullanılmıştır. Kit, protokole göre hazırlanmıştır.

1. Solüsyon A ve B 50:1 oranında karıştırıldı. Çalışma solüsyonu hazırlandı.
2. Standart ve doku örneklerinden 25 µl kuyucuklara aktarıldı.
3. Kuyucuklara 200 µl çalışma solüsyonu eklendi.
4. Kuyucuklar plak film ile kapatıldıktan sonra 37 °C’de 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
5. Oluşturulan absorbanslar 562 nm’de ölçüldü.

Sonuçlar 20-2000 µg/mL arasında hazırlanan standartlar doğrultusunda, standart grafiği yardımıyla hesaplandı.

3.7.7. Histolojik İnceleme

Alınan beyin dokuları %10’luk formalin çözeltisinde 48 saat bekletilmiştir. Bir gün sonra dokular ışık mikroskobu ile görüntülenmesi için gereken doku takibi prosedürü ile parafin bloklara gömülmüştür. Paxinos ve Watson’nın Fare Beyin Atlası yardımı ile parafin bloklardan PFC ve hipokampus bölgelerine denk gelecek şekilde kesitler alındı. Bu kesitler 5 µm kalınlığında mikrotom (Finesse ME +, Thermo Scientific) ile alınmıştır. Parafinli kesitler lizin kaplı lamlara yerleştirilmiştir. Ardından lamalar, histolojik ölçümler için cresyl violet boya ile boyanmıştır. Elde edilen boyalı dokularda ışık mikroskobu ile hücre sayımı yapılmıştır. Hücre sayımında boyanan dokular 40X objektif ile 16800 µm² sayım alanı kullanılmıştır. Her kesitte 3

farklı bölgede sayım yapıldıktan sonra ortalamaları alınmıştır. Çıkan sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir.

3.7.7.1. Doku Takibi Prosedürü

%10'luk formalin çözeltisinde 48 saat bekletilen dokular doku takibi yapılmadan 1 gün önce akan suyun altında bekletilip fiksatiften ayrılmıştır. Ardından gerçekleştirilen işlemler aşağı sıralanmıştır:

- Dokular, dehidratasyonu sağlamak için 20'şer dakika sırasıyla %70-80-96'lık Etil alkol serilerinde bekletilmiştir.
- Ardından, postfiksasyon zinciri için 20'şer dakika sırasıyla Aseton I-II-III-IV serilerinde bekletilmiştir.
- Şeffaflaştırma işlemi, 30'ar dakika Ksilol I ve II'de bekletilerek gerçekleştirildi.
- Dokular, 60 °C'lik etüvde erimiş Parafin I ve II de 1'er saat bekletilmiştir.
- Son olarak Parafin Dispanser'de eritilmiş sert parafin ile dokular bölgelerine göre ayrılarak bloklanmıştır. Bloklanan dokular soğuduktan sonra oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.7.7.2. Cresyl Violet ile Boyama

PFC ve Hipokampus bölgelerinde 5 μ m kalınlığında kesitler alındıktan sonra lizin kaplı lamalara yerleştirilmişti. Ardından bu dokular boyama prosedürü için ayrılmıştır. Boyama prosedürü aşağıda belirtilmiştir:

- Deparafinizasyonu sağlamak için sokular sırasıyla, 1 gece 60 °C'lik etüvde bekletildi. Ardından 60 °C'lik etüvde 20 dk Ksilol I'de bekletildi. En son oda sıcaklığında 10'ar dakika Ksilol II ve III'te bekletilmiştir.
- Rehidratasyonu sağlamak için dokular sırasıyla %100-96-80-70'lik etil alkol serisinde çalkalanmıştır.
- Dokular 5 dakika distile su içerisinde bekletildikten sonra, 30 dakika cresyl violet boyama solüsyonun içinde bekletilmiştir.

- Tekrar sırasıyla %70-96'lık etil alkol serisinde çalkalanan dokular, şeffaflaştırma işlemi için 20'şer dakika Ksilol I-II-III'te oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- En son dokular entellan ile kapatılıp kurumaya kaldırılmıştır.

3.7.7.3. Nöron Sayımı

Elde edilen cresyl violet ile boyalı dokularda ışık mikroskobu ile hücre sayımı yapılmıştır. Hücre sayımında boyanan dokular 40X objektif ile 16800 μm^2 sayım alanı kullanılmıştır. Her kesitte 3 farklı bölgede sayım yapıldıktan sonra ortalamaları alınmıştır. Çıkan sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir.

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Tüm veriler ortalama $\pm$ standart hata şeklinde gösterilmiştir. Grup ortalamaları arasında farklar IBM SPSS 22.0 programı ile One Way ANOVA testi, post-hoc LSD testi ile tekrarlı ölçümler için repeated-measures ANOVA, parametrik olmayan veriler için Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. Her testte $p < 0.05$ anlamlılık düzeyi esas alınmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Vücut Ağırlıkları

Hayvanların haftalık olarak vücut ağırlıkları kaydedilmiş olup; her grubun vücut ağırlığı ortalaması alınarak haftalık değişimleri incelenmiştir. Buna göre hayvanların vücut ağırlıkları anlamlı olarak arttı ($p<0.05$).

Tablo 3'te farelerin haftalık vücut ağırlıklarının gruplar arası karşılaştırılması değerlendirilmiştir.

Tablo 3. Haftalık ağırlık değişimi (g).

Gruplar	İlk Hafta	1. Hafta	2. Hafta	3. Hafta	4. Hafta	5. Hafta
K	21,26±3,2	24,07±2,75	25,5±2,6	28,29±2,85	29,93±4,15	30,2±3,7*
SI	19,96±2,3	22,69±2,4	54,03±2,3	26,84±2,15	28±2,35	28,59±2,5*
ESFN	24,19±2,95	26,64±3,55	29,69±2,75	31,81±2,6	33,67±3,1	34,56±3,25*#
SI+ESFN	24,46±3,2	26,21±4	28,67±2,3	30,13±2,95	30,76±3,4	29,93±3,2*
GSFN	25,29±2,05	30,69±2,25	33,1±3,8	35,04±2,95	35,87±4,85	36,33±4*#
SI+GSFN	25,29±2,05	31,7±2,5	33,04±1,6	35,16±2,15	33,99±3,9	35,3±3,25*&

*: $p<0.05$, Her grubun ilk haftası ile karşılaştırıldığında,

#: $p<0.05$, K grubunun 5. haftası ile karşılaştırıldığında,

&: $p<0.05$, SI grubunun 5. haftası ile karşılaştırıldığında,

Çalışmada; K grubunun ilk haftaya göre 5. hafta vücut ağırlığı anlamlı olarak arttı ($p=0.0021$). SI grubunun ilk haftaya göre 5. hafta vücut ağırlığı anlamlı olarak arttı ($p<0.0001$). ESFN grubunun ilk haftaya göre 5. hafta vücut ağırlığı anlamlı olarak arttı ($p=0.0007$). SI+ESFN grubunun ilk haftaya göre 5. hafta vücut ağırlığı anlamlı olarak arttı ($p=0.0046$). GSFN grubunun ilk haftaya göre 5. hafta vücut ağırlığı anlamlı olarak arttı ($p=0.0008$). SI+GSFN grubunun ilk haftaya göre 5. hafta vücut ağırlığı anlamlı olarak arttı ($p=0.0296$).

İlk hafta GSFN ve SI+GSFN gruplarının K grubuna göre vücut ağırlıkları anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla $p=0.0036$, $p=0.036$). İlk hafta GSFN ve

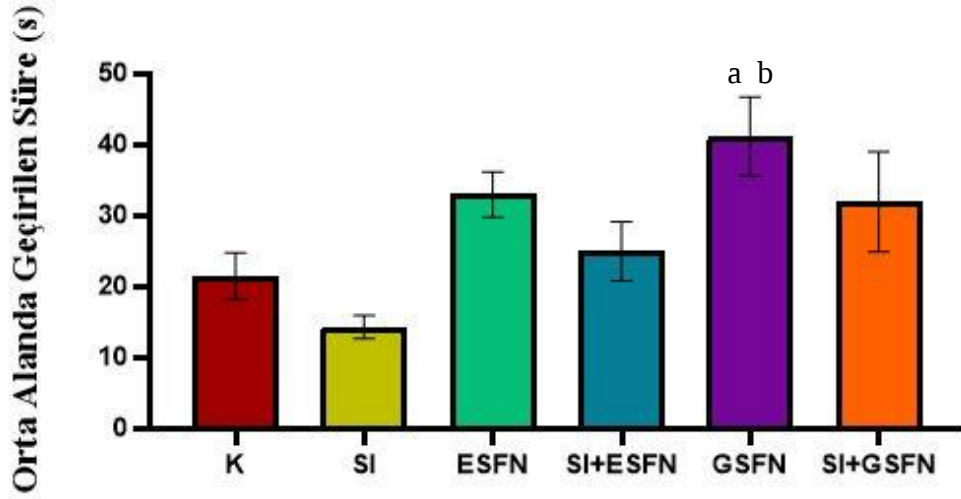
SI+GSFN gruplarının SI grubuna göre vücut ağırlıkları anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla $p=0.044$, $p=0.034$). 1. hafta GSFN ve SI+GSFN gruplarının K grubuna göre vücut ağırlıkları anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla $p=0.0025$, $p=0.023$). 1. hafta GSFN ve SI+GSFN gruplarının SI grubuna göre vücut ağırlıkları anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla $p<0.0001$, $p=0.0020$). 1. hafta SI+GSFN grubu SI+ESFN grubuna göre vücut ağırlığı anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0.0444$). 2. hafta ESFN, SI+ESFN, GSFN ve SI+GSFN gruplarının K grubuna göre vücut ağırlıkları anlamlı olarak daha yüksek bulundu (sırasıyla $p=0.0049$, $p=0.0276$, $p=0.0046$, $p=0.0011$). 2. hafta ESFN, GSFN ve SI+GSFN gruplarının SI grubuna göre vücut ağırlıkları anlamlı olarak daha yüksek bulundu (sırasıyla $p=0.0284$, $p=0.0003$, $p=0.0010$). 2. hafta ESFN grubunun SI+GSFN grubuna göre vücut ağırlıkları anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p=0.0117$). 2. hafta GSFN ve SI+GSFN gruplarının SI+ESFN grubuna göre vücut ağırlıkları anlamlı olarak daha yüksek bulundu (sırasıyla $p=0.0447$, $p=0.0129$). 3. hafta GSFN ve SI+GSFN gruplarının K grubuna göre vücut ağırlıkları anlamlı olarak daha yüksek bulundu (sırasıyla $p=0.0042$, $p=0.0041$). 3. hafta ESFN, GSFN ve SI+GSFN gruplarının SI grubuna göre vücut ağırlıkları anlamlı olarak daha yüksek bulundu (sırasıyla $p=0.0484$, $p<0.0001$, $p=0.0016$). 3. hafta ESFN, SI+ESFN gruplarının SI+GSFN grubuna göre vücut ağırlıkları anlamlı olarak daha düşük bulundu (sırasıyla $p=0.0139$, $p=0.0282$). 4. hafta GSFN grubunun K grubuna göre vücut ağırlığı anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p=0.0277$). 4. hafta ESFN, GSFN ve SI+GSFN gruplarının SI grubuna göre vücut ağırlığı anlamlı olarak daha yüksek bulundu (sırasıyla $p=0.0238$, $p=0.0024$, $p=0.0142$). 5. Hafta ESFN ve GSFN gruplarının K grubuna göre vücut ağırlıkları anlamlı olarak daha yüksek bulundu (sırasıyla $p=0.0434$, $p=0.0277$). 5. Hafta ESFN, GSFN ve SI+GSFN gruplarının SI grubuna göre vücut ağırlıkları anlamlı olarak daha yüksek bulundu (sırasıyla $p=0.0153$, $p=0.0011$, $p=0.0298$). 5. Hafta ESFN grubunun SI+ESFN grubuna göre vücut ağırlığı anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p=0.0112$).

4.2. Açık Alan Testi Bulguları

Gruplar arası lokomotor aktiviteyi değerlendirmek için açık alan testi uygulanmıştır. Testte hayvanların toplam kat ettikleri mesafe (cm), orta alandaki bulunma süreleri (s) ve ortalama hızları (cm/s) değerlendirilmiştir. Gruplar arasında

hayvanların kat ettikleri mesafe ve ortalama hızları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Şekil 5’de açık alan testinde orta alanda geçirilen sürenin gruplar arası karşılaştırılması verilmiştir.



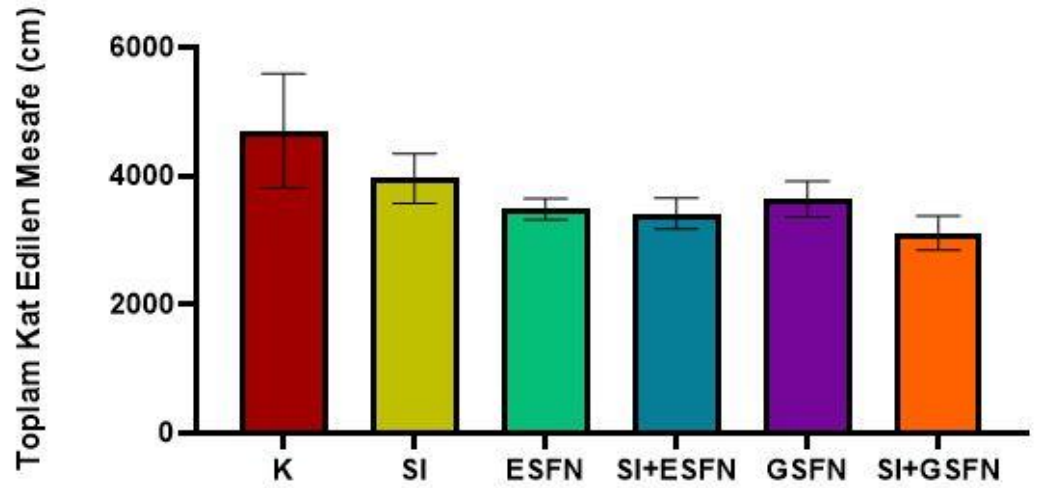
Şekil 5. Açık Alan testinde orta alanda geçirilen süre (s).

a: $p < 0.05$, K grubu ile karşılaştırıldığında,

b: $p < 0.005$, SI grubu ile karşılaştırıldığında,

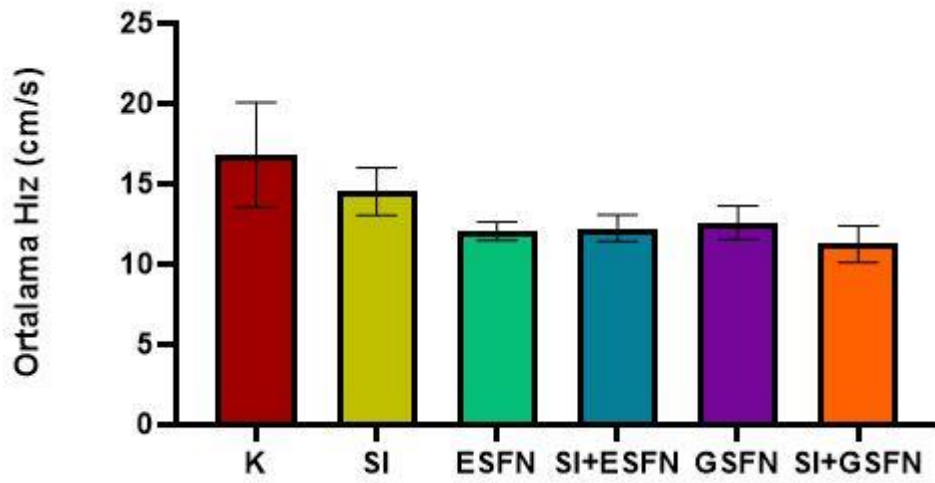
GSFN grubunun orta alanda geçirdiği süre K ve SI gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla $p=0.0423$, $p=0.021$).

Şekil 6’de açık alan testinde toplam kat edilen mesafede gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p > 0.05$).



Şekil 6. Açık alan testinde toplam kat edilen mesafe (cm).

Şekil 7’te açık alan testinde ortalama hızda gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

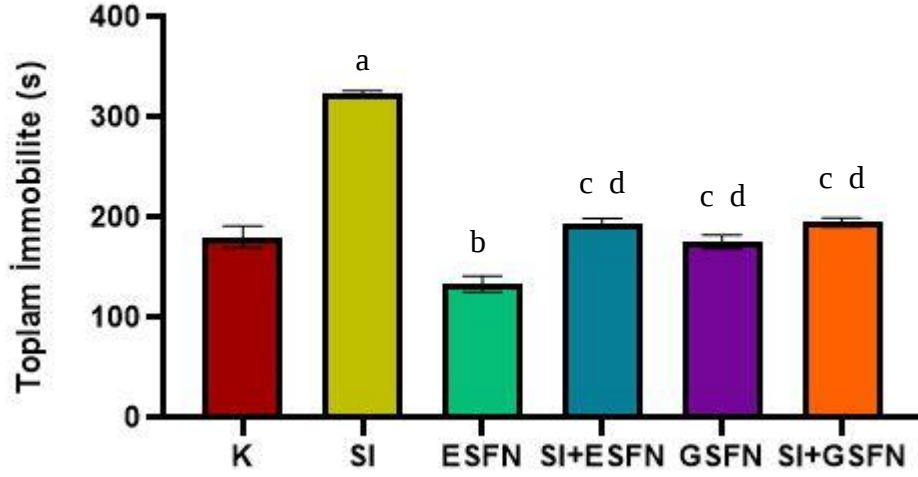


Şekil 7. Açık alan testinde ortalama hız (cm/s).

4.3. Kuyruktan Asma Testi Bulguları

Gruplar arası depresyon benzeri davranış ve anksiyeteyi değerlendirmek için kuyruktan asma testi uygulanmıştır. Hayvanların 6 dakika boyunca immobilité süreleri (s) ölçülmüştür.

Şekil 8’de kuyruktan asma testinde immobilité sürelerinin gruplar arası karşılaştırılması verilmiştir.



Şekil 8. Kuyruktan asma testinde immobilité süreleri (s).

- a: $p < 0.0001$, K grubu ile karşılaştırıldığında,
- b: $p < 0.0005$, K grubu ile karşılaştırıldığında,
- c: $p < 0.0001$, SI grubu ile karşılaştırıldığında,
- d: $p < 0.005$, ESFN grubu ile karşılaştırıldığında,

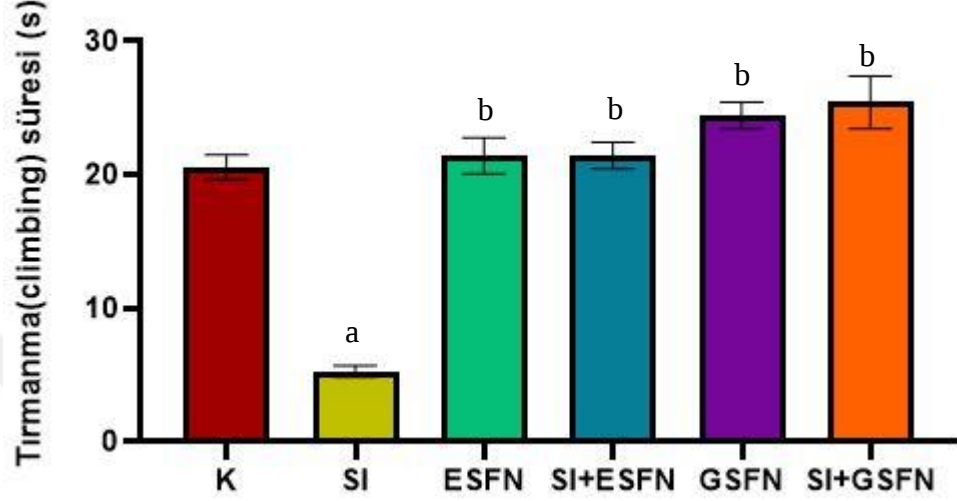
SI grubunun toplam immobilité süresi K grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.0001$). ESFN grubunun toplam immobilité süresi K grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p = 0.0003$). ESFN, SI+ESFN, GSFN ve SI+GSFN gruplarının toplam immobilité süresi SI grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük bulundu (sırasıyla $p < 0.0001$, $p < 0.0001$, $p < 0.0001$, $p < 0.0001$). SI+ESFN GSFN ve SI+GSFN gruplarının total immobilité süresi ESFN grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla $p < 0.0001$, $p = 0.0016$, $p < 0.0001$).

4.4. Porsolt Zorunlu Yüzme Testi Bulguları

Gruplar arası depresyon benzeri davranış ve anksiyeteyi değerlendirmek için Porsolt zorunlu yüzme testi uygulanmıştır. Hayvanların suda kaldıkları 5 dakika

boyunca tırmanma (climbing), yüzme (swimming) ve immobilité süreleri (s) ölçülmüştür.

Şekil 9'te Porsolt zorunlu yüzme testinde tırmanma (climbing) davranışında geçirilen sürenin gruplar arası karşılaştırılması verilmiştir.



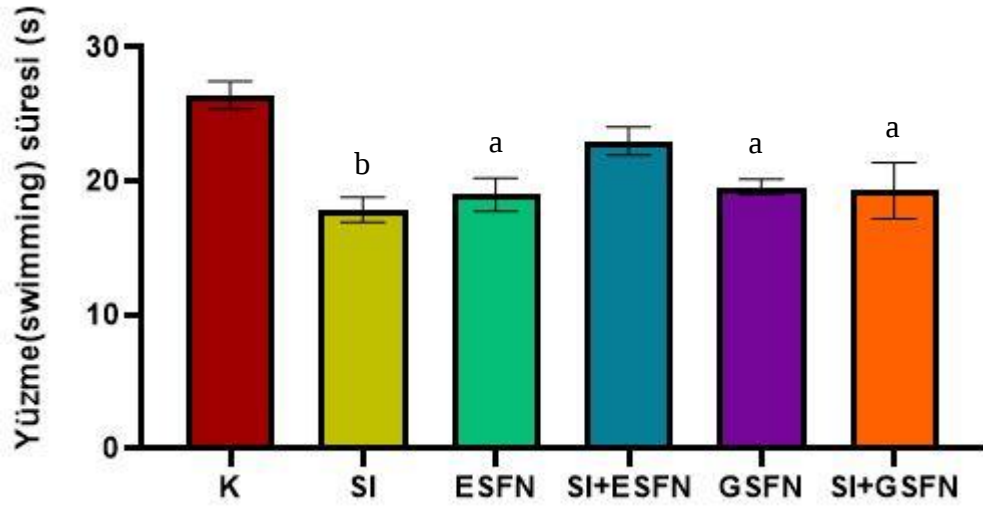
Şekil 9. Porsolt zorunlu yüzme testinde tırmanma (climbing) davranış süresi (s).

a: $p < 0.0001$, K grubu ile karşılaştırıldığında,

b: $p < 0.0001$, SI grubu ile karşılaştırıldığında,

SI grubunun tırmanma (climbing) süresi K grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p < 0.0001$). ESFN, SI+ESFN, GSFN ve SI+GSFN gruplarının tırmanma (climbing) süreleri SI grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha yüksek bulundu (sırasıyla $p < 0.0001$, $p < 0.0001$, $p < 0.0001$, $p < 0.0001$).

Şekil 10'te Porsolt zorunlu yüzme testinde yüzme (swimming) davranışında geçirilen sürenin gruplar arası karşılaştırılması verilmiştir.



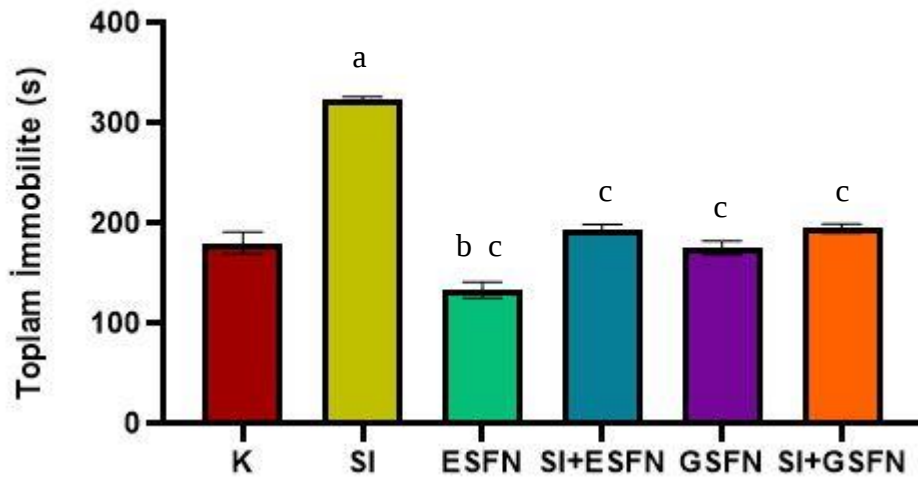
Şekil 10. Porsolt zorunlu yüzme testinde yüzme (swimming) davranışı süresi (s).

a: $p < 0.0005$, K grubu ile karşılaştırıldığında,

b: $p < 0.05$, K grubu ile karşılaştırıldığında,

SI grubunun yüzme (swimming) süreleri K grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p = 0.0003$). ESFN, GSFN ve SI+GSFN gruplarının yüzme (swimming) süreleri K grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha düşük bulundu (sırasıyla $p = 0.0021$, $p = 0.0052$, $p = 0.0033$).

Şekil 11’de Porsolt zorunlu yüzme testinde immobilité davranışında geçirilen sürenin gruplar arası karşılaştırılması verilmiştir.



Şekil 11. Porsolt zorunlu yüzme testinde immobilité süresi (s).

a: $p<0.0001$, K grubu ile karşılaştırıldığında,

b: $p<0.001$, K grubu ile karşılaştırıldığında,

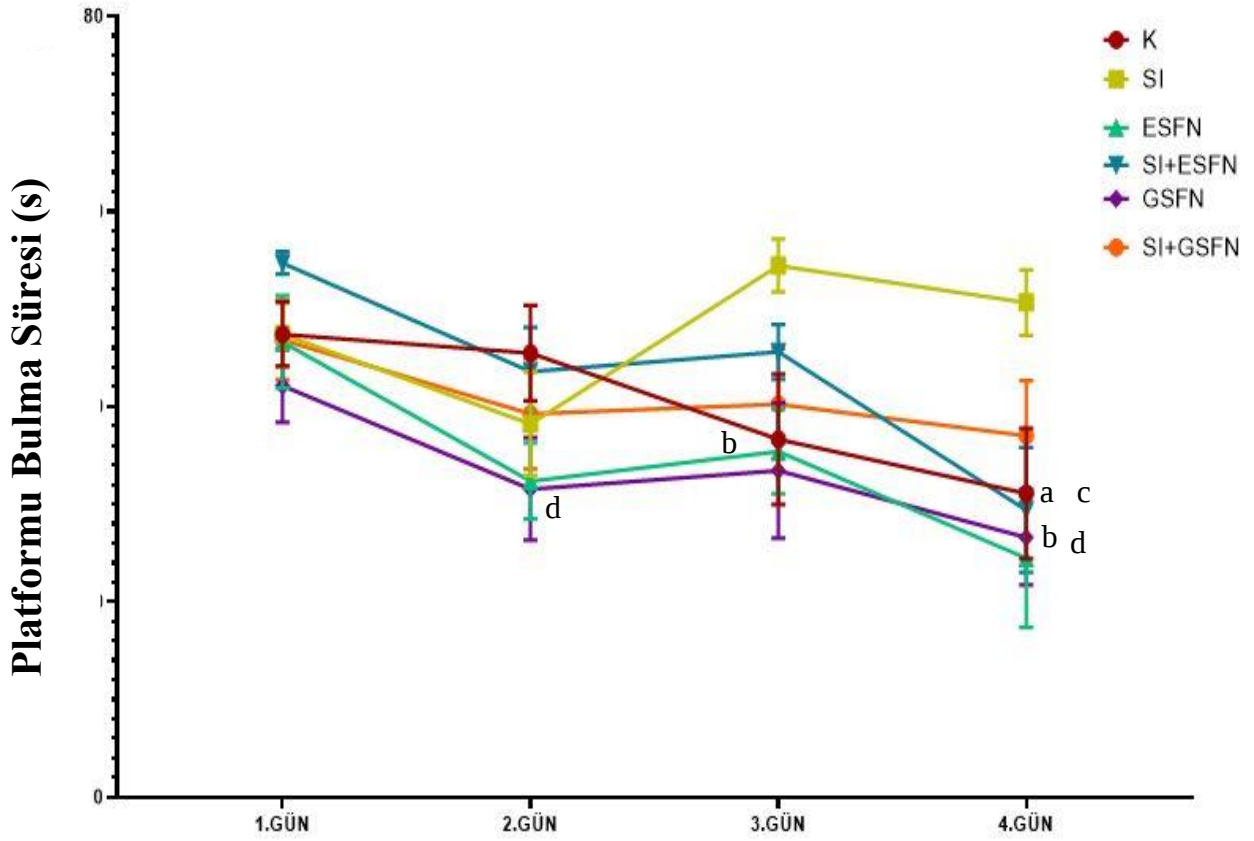
c: $p<0.0001$, SI grubu ile karşılaştırıldığında,

SI grubunun immobilité süresi K grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.0001$). ESFN grubunun immobilité süresi K grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p=0.0098$). ESFN, SI+ESFN, GSFN ve SI+GSFN gruplarının immobilité süresi SI grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha düşük bulundu (sırasıyla $p<0.0001$, $p<0.0001$, $p<0.0001$, $p<0.0001$).

4.5. Morris Su Labirenti Bulguları

Gruplar arasındaki kognitif fonksiyonları ölçmek için Morris su labirenti testi uygulanmıştır. Hayvanların ilk 4 günde platformu bulmak için geçirdikleri ortalama süre, hedef kadranda bulunma süreleri değerlendirilmiştir. Testte öğrenmenin değerlendirildiği 5. günde (probe gün) platformu bulma süreleri ve platformun zıt kadranda geçirdiği süreler değerlendirilmiştir. Testin 5. gününde platformun zıt kadranda geçirilen ortalama sürede gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Şekil 12’de Morris su labirenti testinde ilk 4 günde platformu bulmak için geçirdikleri ortalama sürenin gruplar arası karşılaştırılması değerlendirilmiştir.



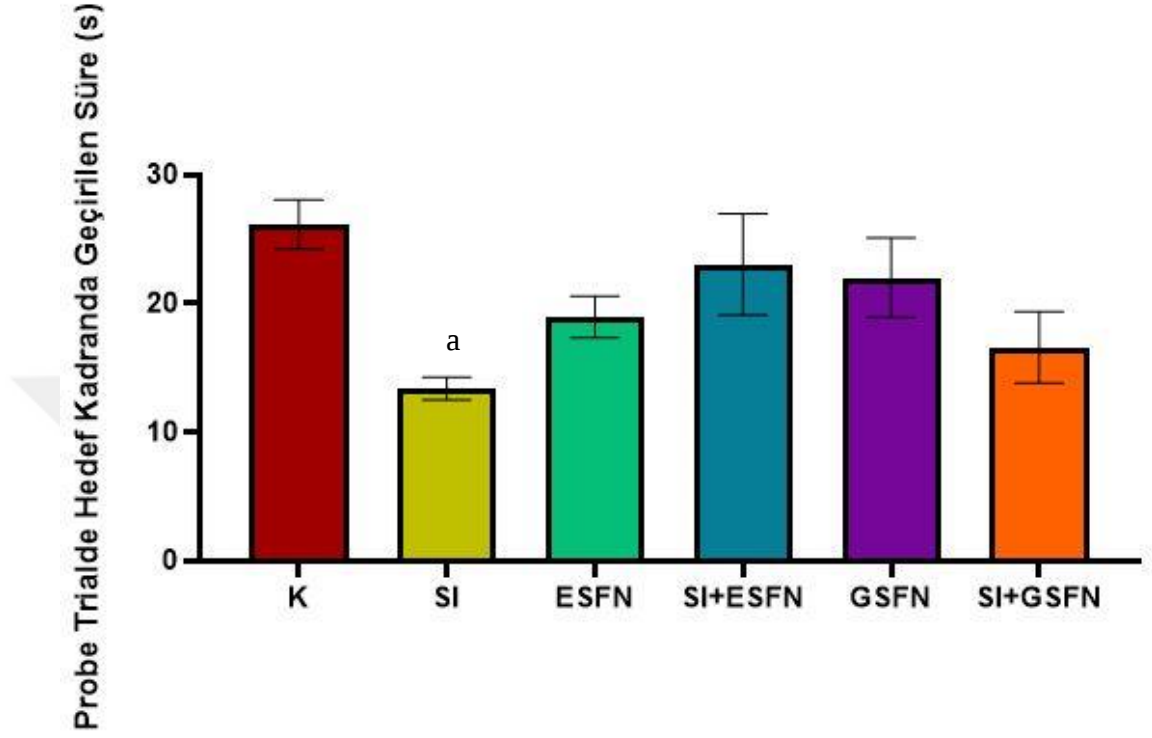
Şekil 12. Morris su labirenti testinde ilk 4 günde platformu bulma süresi (s).

- a: $p < 0.05$, K grubu ile karşılaştırıldığında,
- b: $p < 0.05$, SI grubu ile karşılaştırıldığında,
- c: $p < 0.05$, SI+ESFN grubu ile karşılaştırıldığında,
- d: $p < 0.05$, GSFN grubu ile karşılaştırıldığında,

K grubundaki hayvanlar testin 1. gününe kıyasla 4. günde platformu anlamlı olarak daha hızlı buldu ($p=0.0429$). ESFN grubu 3. günde platformu SI grubuna göre anlamlı olarak daha hızlı buldu ($p=0.0344$). GSFN grubu 4. günde platformu SI grubuna göre anlamlı olarak daha hızlı buldu ($p=0.0185$).

SI+ESFN grubundaki hayvanlar 1 ve 2. güne kıyasla 4. gün platformu anlamlı olarak daha hızlı buldu (sırasıyla $p=0.0234$, $p=0.0132$). GSFN grubundaki hayvanlar 1. güne kıyasla 2 ve 4. günde platformu anlamlı olarak daha hızlı buldu (sırasıyla $p=0.0485$, $p=0.0309$).

Şekil 13’da Morris su labirenti testinde 5. günde yapılan hatırlama testinde (probe trial) hedef kadranda geçirdikleri ortalama sürenin gruplar arası karşılaştırılması değerlendirilmiştir.

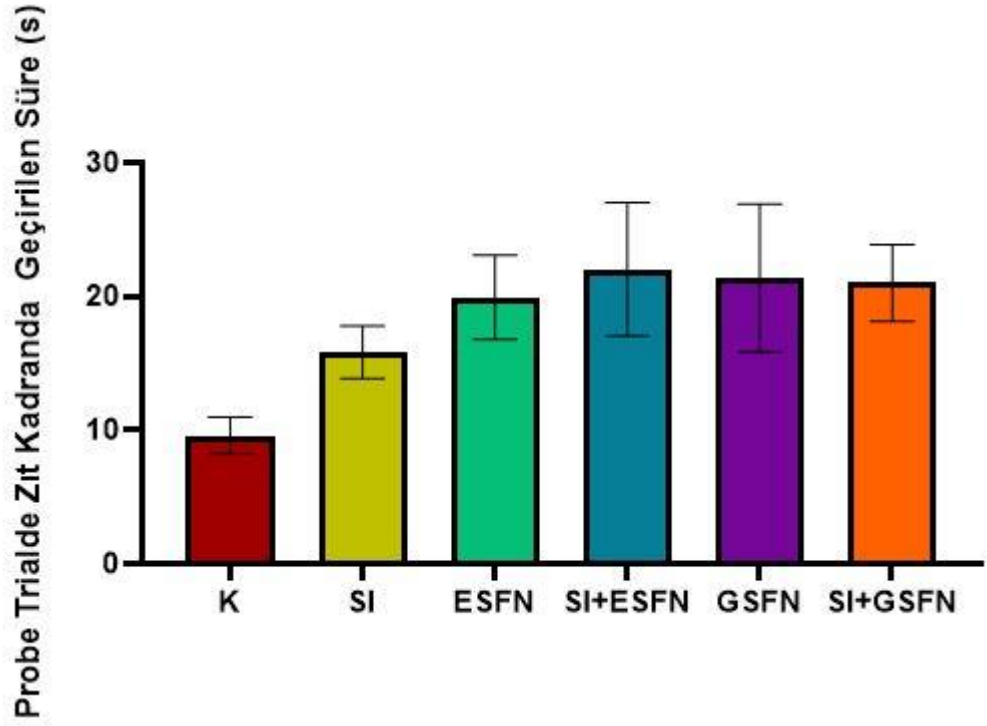


Şekil 13. Morris su labirenti testinde 5. günde hedef kadranda geçirilen süre (s).

a: $p < 0.05$, K grubu ile karşılaştırıldığında,

SI grubunun hedef platformda geçirdiği süre K grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p = 0.0148$).

Şekil 14’da Morris su labirenti testinde 5. günde (probe trial) platformun zıt kadranda geçirdikleri ortalama sürede gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0.05$).

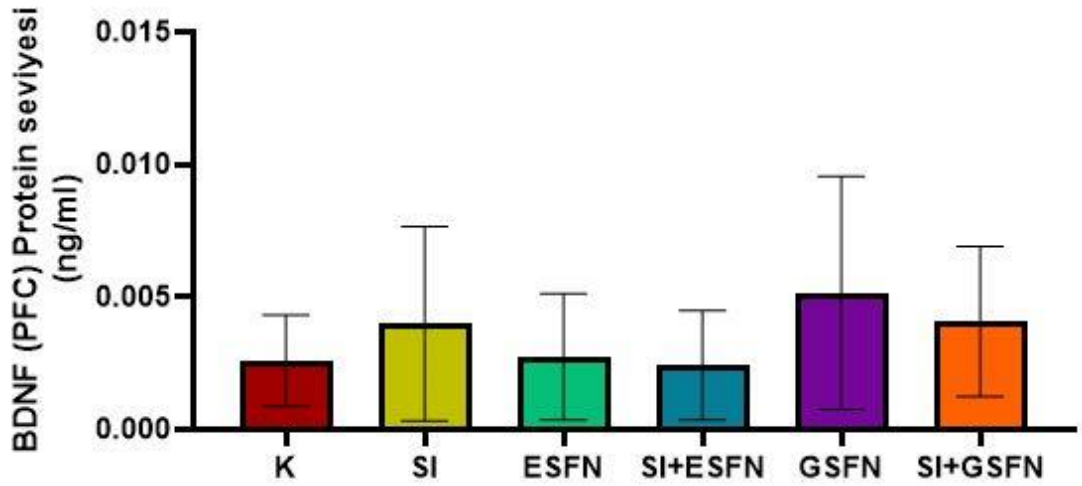


Şekil 14. Morris su labirenti testinde 5. günde platformun zıt kadranda geçirilen süre(s).

4.6. Prefrontal Korteks ve Hipokampus BDNF Seviyeleri

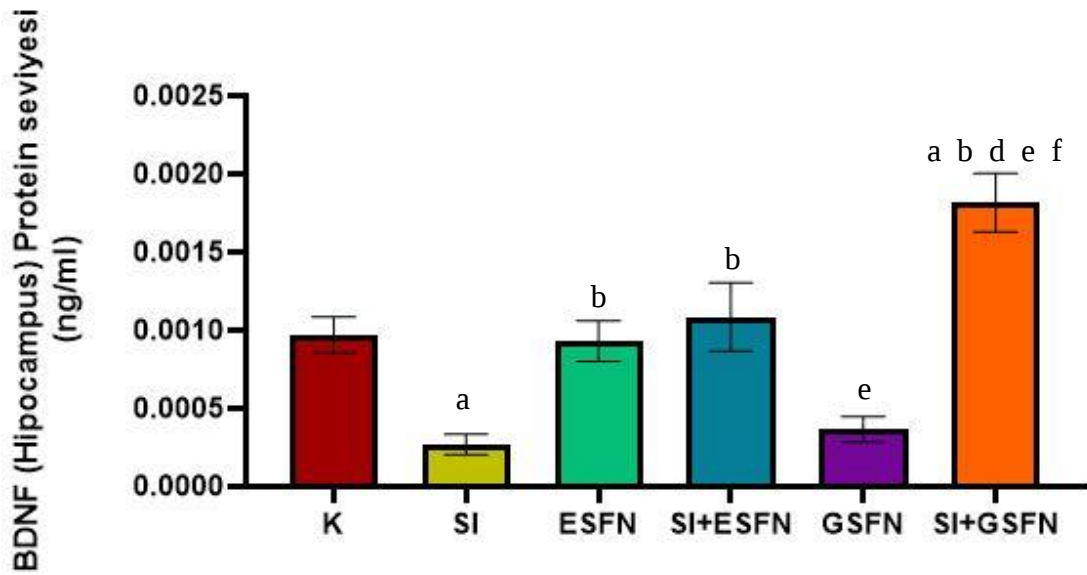
Gruplarda bilişsel fonksiyonlar ve davranış ile ilgili beyin bölgeleri olan PFC ve hipokampus BDNF seviyeleri değerlendirilmiştir. PFC’te BDNF protein seviyesinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Şekil 15’de PFC’deki BDNF protein seviyelerinin gruplar arası karşılaştırılması değerlendirilmiştir ($p>0.05$).



Şekil 15. PFC BDNF protein seviyesi (ng/ml).

Şekil 16'da Hipokampus BDNF protein seviyelerinin gruplar arası karşılaştırılması değerlendirilmiştir.



Şekil 16. Hipokampus BDNF protein seviyesi (ng/ml).

- a: $p < 0.05$, K grubu ile karşılaştırıldığında,
- b: $p < 0.05$, SI grubu ile karşılaştırıldığında,
- c: $p < 0.0001$, SI grubu ile karşılaştırıldığında,
- d: $p < 0.005$, ESFN grubu ile karşılaştırıldığında,

e; $p<0.05$, SI+ESFN grubu ile karşılaştırıldığında,

f; $p<0.0001$, GSFN grubu ile karşılaştırıldığında,

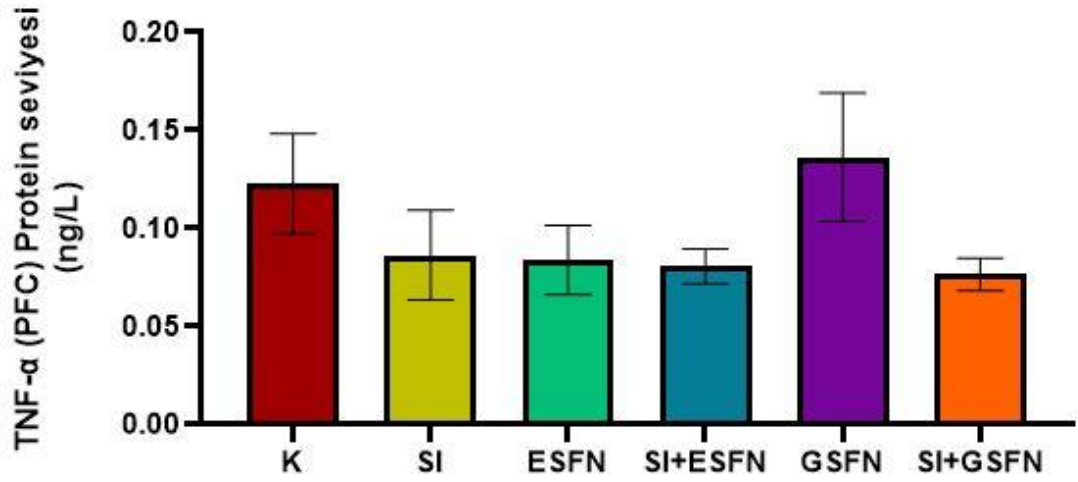
SI grubunun hipokampustaki BDNF protein seviyesi K grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0.0210$). SI+GSFN grubunun hipokampustaki BDNF protein seviyesi K grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p=0.0035$). ESFN ve SI+ESFN gruplarının hipokampustaki BDNF protein seviyesi SI grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu (sırasıyla $p=0.0328$, $p=0.0051$). SI+GSFN grubunun hipokampustaki BDNF protein seviyesi SI grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p<0.0001$).

SI+GSFN grubunun hipokampustaki BDNF protein seviyesi ESFN grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p=0.0021$). GSFN grubunun hipokampustaki BDNF protein seviyesi SI+ESFN grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p=0.0252$). SI+GSFN grubunun hipokampustaki BDNF protein seviyesi SI+ESFN grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p=0.0146$). SI+GSFN grubunun hipokampustaki BDNF protein seviyesi GSFN grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p<0.0001$).

4.7. Prefrontal Korteks ve Hipokampus TNF- α Seviyeleri

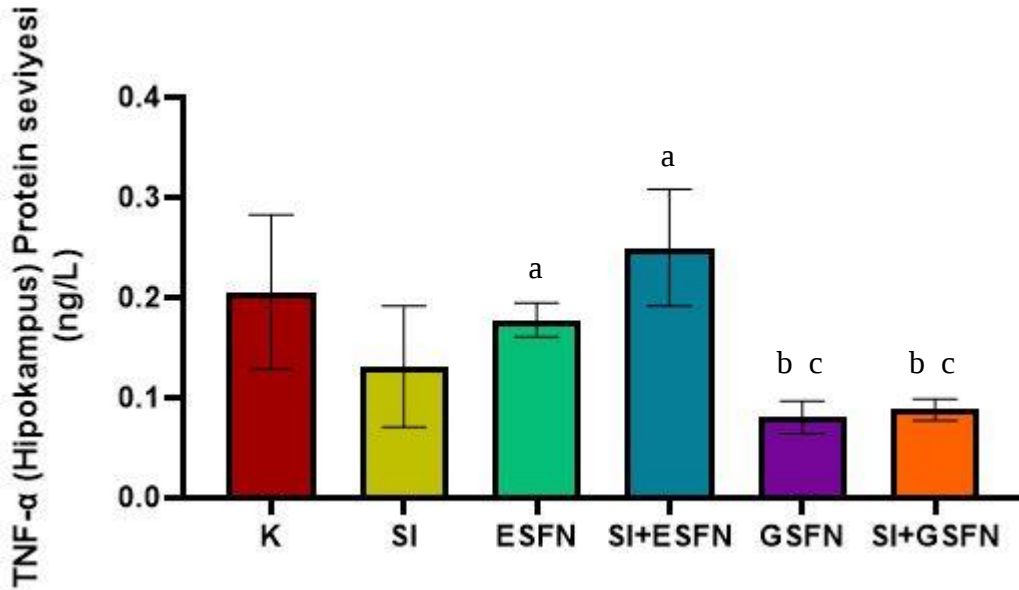
Gruplarda hücre ölümü ve hücredeki inflammatuar yanıtını ölçmek için PFC ve hipokampusta proinflammatuar sitokin olan TNF- α seviyeleri değerlendirilmiştir. Değerlendirmelerde PFC'deki TNF- α protein seviyelerinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Şekil 17'te PFC'deki TNF- α protein seviyesinin gruplar arası karşılaştırması değerlendirilmiştir ($p>0.05$).



Şekil 17. PFC TNF-α protein seviyesi (ng/L).

Şekil 18'te hipokampus TNF-α protein seviyesinin gruplar arası karşılaştırılması değerlendirilmiştir.



Şekil 18. Hipokampus TNF-α protein seviyesi (ng/L).

a: $p < 0.005$, SI grubu ile karşılaştırıldığında,

b: $p < 0.05$, ESFN grubu ile karşılaştırıldığında,

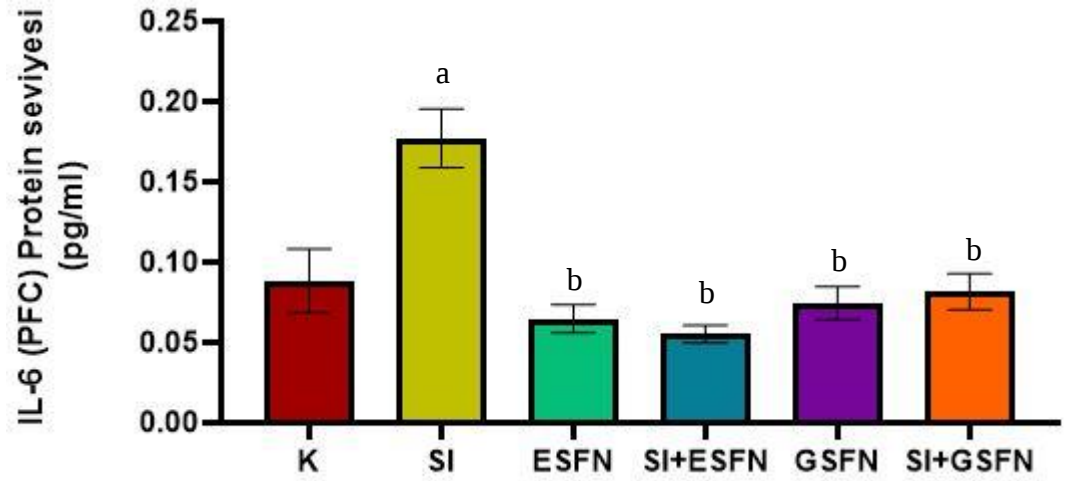
c: $p < 0.005$, SI+ESFN grubu ile karşılaştırıldığında,

ESFN ve SI+ESFN gruplarının hipokampus TNF- α protein seviyesi SI grubuna göre anlamlı olarak arttı (sırasıyla $p=0.0016$, $p=0.0003$). GSFN ve SI+GSFN gruplarının hipokampus TNF- α protein seviyesi ESFN grubuna göre anlamlı olarak azaldı (sırasıyla $p=0.0028$, $p=0.007$). GSFN ve SI+GSFN gruplarının hipokampus TNF- α protein seviyesi SI+ESFN grubuna göre anlamlı olarak azaldı (sırasıyla $p=0.0006$, $p=0.0014$).

4.8. Prefrontal Korteks ve Hipokampus IL-6 Seviyeleri

Gruplarda hücre ölümü ve hücredeki inflamatuvar yanıtını ölçmek için PFC ve hipokampusta proinflamatuvar sitokin olan IL-6 seviyeleri değerlendirilmiştir.

Şekil 19’te PFC’de IL-6 protein seviyesinin gruplar arası karşılaştırılması değerlendirilmiştir.



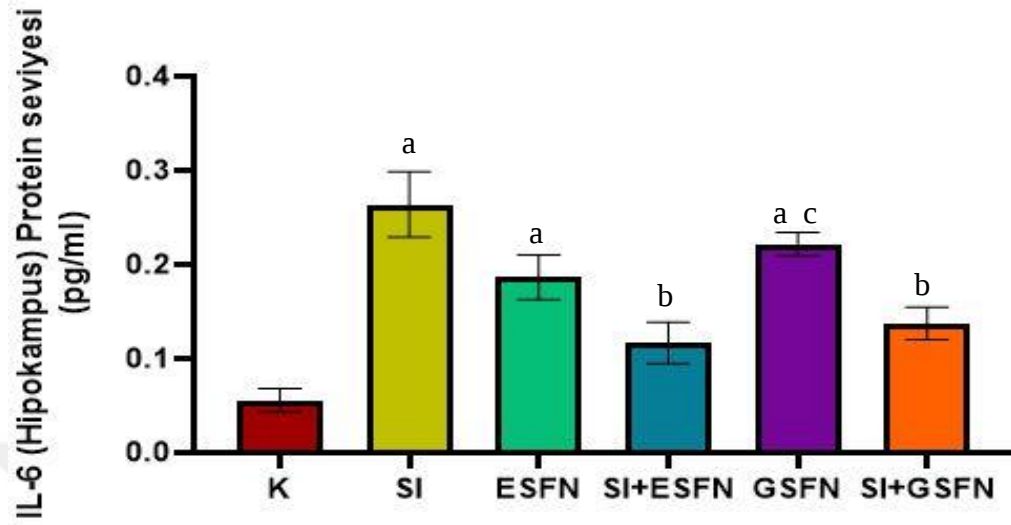
Şekil 19. PFC IL-6 protein seviyesi (pg/ml).

a: $p=0.0005$, K grubu ile karşılaştırıldığında,

b: $p<0.0005$, SI grubu ile karşılaştırıldığında,

SI grubunun PFC IL-6 protein seviyesi K grubuna göre anlamlı olarak arttı ($p=0.0005$). ESFN, SI+ESFN, GSFN ve SI+GSFN gruplarının PFC IL-6 protein seviyesi SI grubuna göre anlamlı olarak azaldı (sırasıyla $p<0.0001$, $p<0.0001$, $p<0.0001$, $p=0.0002$).

Şekil 20’da Hipokampus IL-6 protein seviyesinin gruplar arası karşılaştırılması değerlendirilmiştir.



Şekil 20. Hipokampus IL-6 protein seviyesi (pg/ml).

a: $p < 0.005$, K grubu ile karşılaştırıldığında,

b: $p < 0.005$, SI grubu ile karşılaştırıldığında,

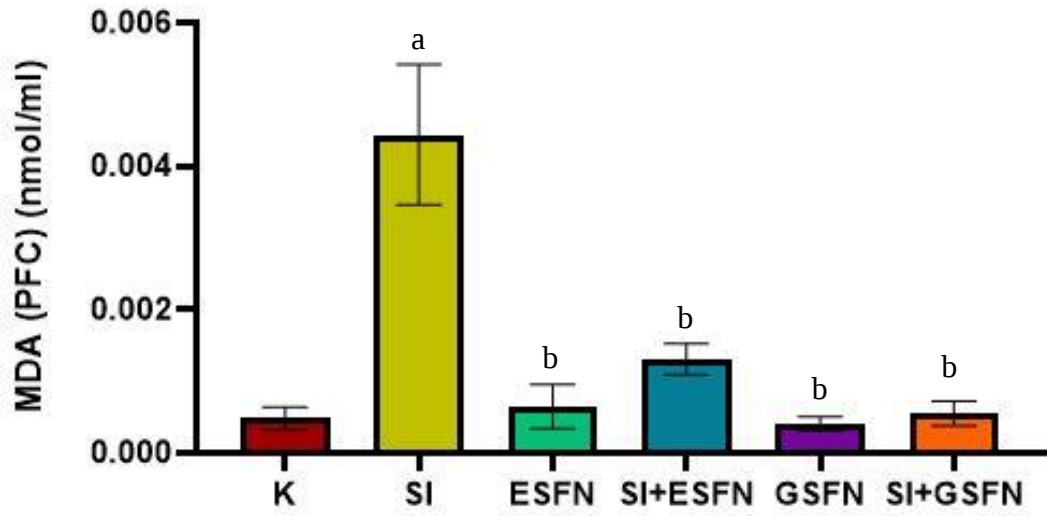
c: $p < 0.05$, SI+ESFN grubu ile karşılaştırıldığında,

SI, ESFN ve GSFN gruplarının hipokampus IL-6 protein seviyesi K grubuna göre anlamlı olarak arttı (sırasıyla $p=0.0001$, $p=0.0019$, $p=0.0001$). SI+ESFN ve SI+GSFN gruplarının hipokampus IL-6 protein seviyesi SI grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (sırasıyla $p=0.0004$, $p=0.0028$). GSFN grubunun hipokampus IL-6 protein seviyesi SI+ESFN grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p=0.0191$).

4.9. Prefrontal Korteks ve Hipokampusta MDA Seviyeleri

Gruplarda antioksidan savunma ve oksidatif stresi ölçmek için PFC ve hipokampusta MDA seviyelerine bakılmıştır.

Şekil 21’de PFC MDA seviyesinin gruplar arası karşılaştırılması değerlendirilmiştir.



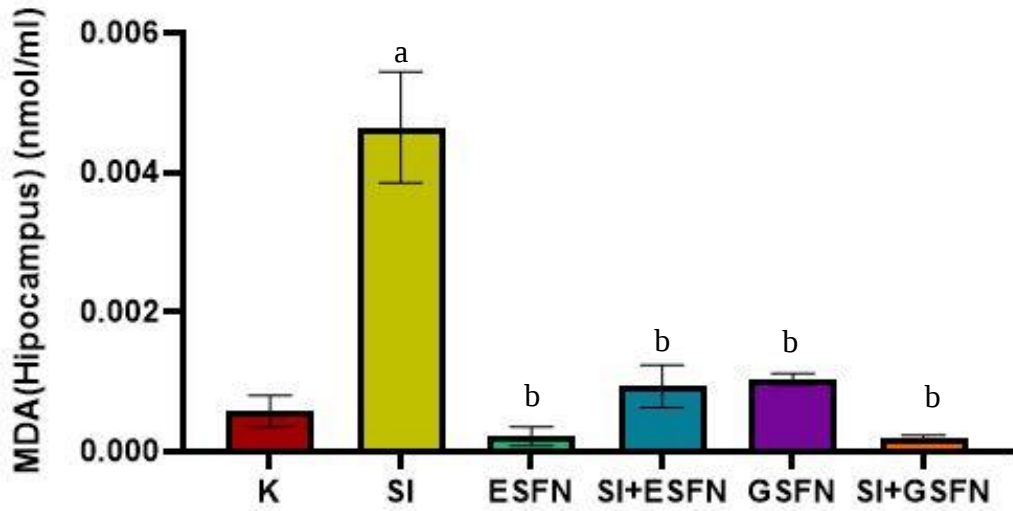
Şekil 21. PFC MDA seviyesi (nmol/ml).

a: $p<0.0001$, K grubu ile karşılaştırıldığında,

b: $p<0.0005$, SI grubu ile karşılaştırıldığında,

SI grubunun PFC’teki MDA seviyesi K grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ($p<0.0001$). ESFN, SI+ESFN, GSFN ve SI+GSFN gruplarının PFC MDA seviyesi SI grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır (sırasıyla $p<0.0001$, $p=0.0002$, $p<0.0001$, $p<0.0001$).

Şekil 22’de Hipokampus MDA seviyesinin gruplar arası karşılaştırılması değerlendirilmiştir.



Şekil 22. Hipokampus MDA seviyesi (nmol/ml).

a: $p < 0.0001$, K grubu ile karşılaştırıldığında,

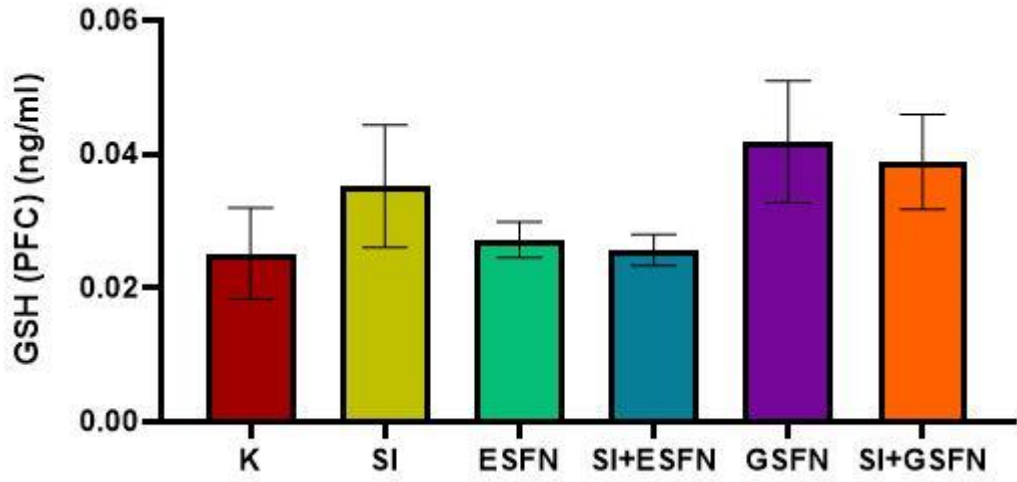
b: $p < 0.0001$, SI grubu ile karşılaştırıldığında,

SI grubunun hipokampus MDA seviyesi K grubuna göre anlamlı olarak yükselmiştir ($p < 0.0001$). ESFN, SI+ESFN, GSFN ve SI+GSFN gruplarının hipokampus MDA seviyesi SI grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır (sırasıyla $p < 0.0001$, $p < 0.0001$, $p < 0.0001$, $p < 0.0001$).

4.10. Prefrontal Korteks ve Hipokampusta GSH Seviyeleri

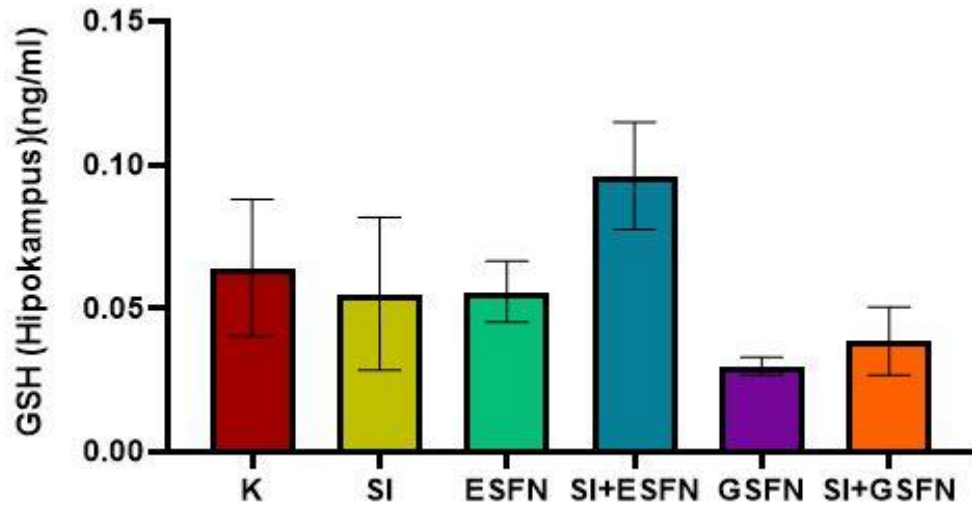
Gruplarda antioksidan savunma ve oksidatif stresi ölçmek için PFC ve hipokampusta GSH seviyelerine bakılmıştır. Değerlendirmede PFC ve Hipokampus GSH seviyelerinde gruplar arası anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

Şekil 23’de PFC GSH seviyelerinin gruplar arası karşılaştırılması değerlendirilmiştir ($p > 0.05$).



Şekil 23. PFC GSH seviyesi (ng/ml).

Şekil 24’de Hipokampus GSH seviyelerinin gruplar arası karşılaştırılması değerlendirilmiştir ($p>0.05$).

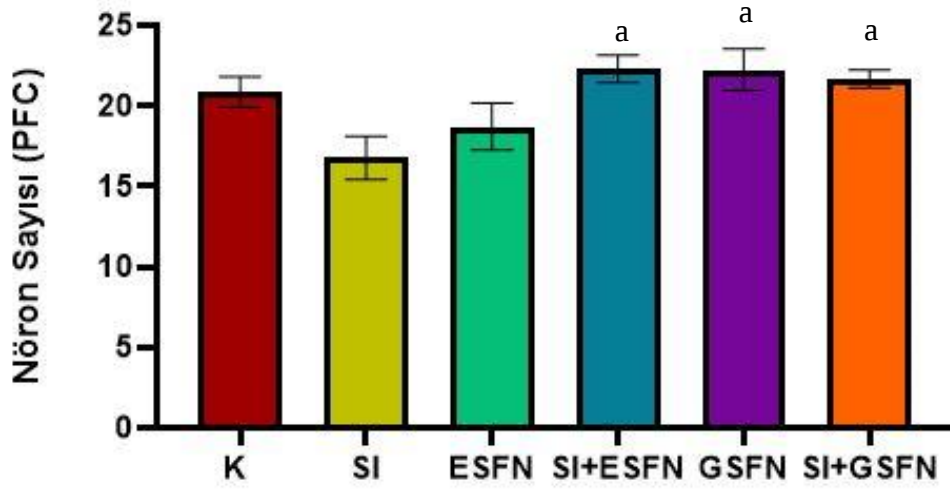


Şekil 24. Hipokampus GSH seviyesi (ng/ml).

4.11. Hücre Sayımı Bulguları

Gruplarda PFC ve hipokampus bölgelerinde nöron sayımı yapılmıştır.

Şekil 25’de PFC bölgesindeki nöron sayısının gruplar arası karşılaştırılması değerlendirilmiştir.

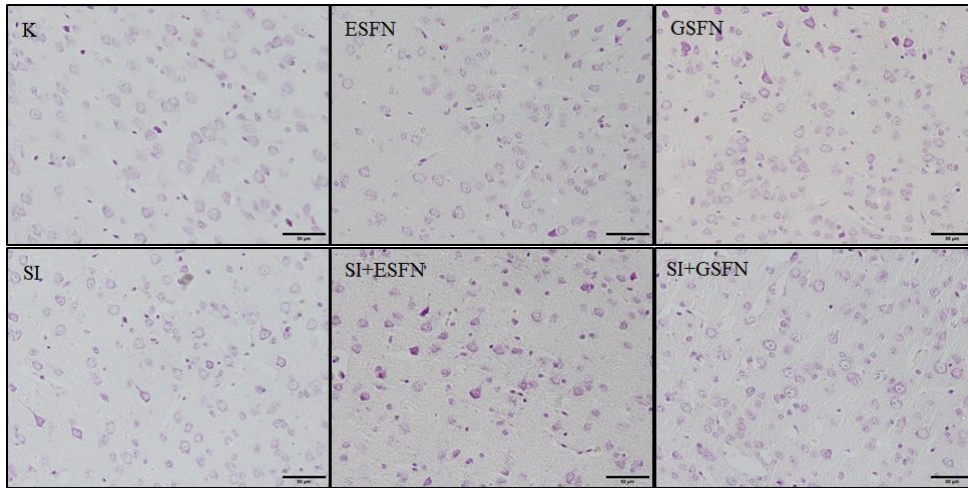


Şekil 25. PFC bölgesindeki nöron sayısı.

a: $p < 0.05$, SI grubu ile karşılaştırıldığında,

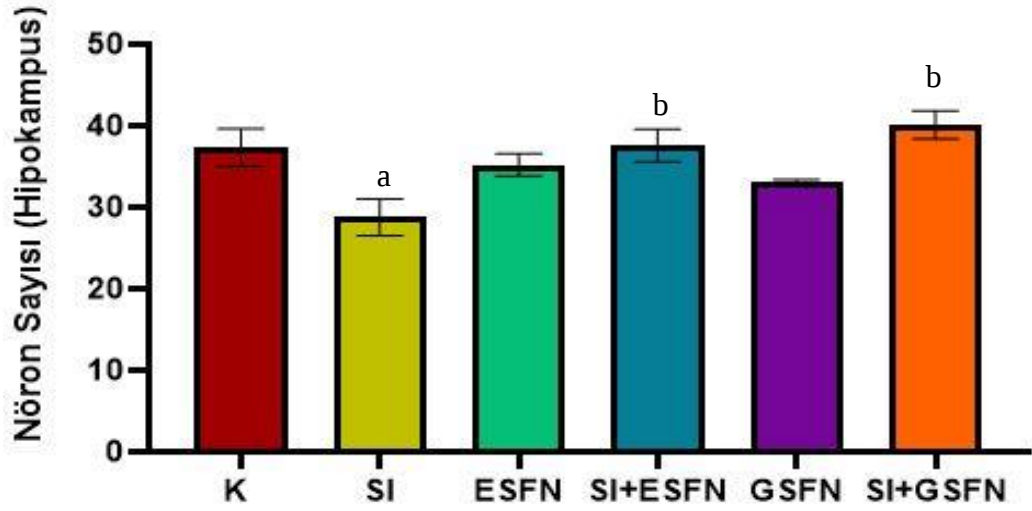
SI+ESFN, GSFN ve SI+GSFN gruplarının PFC bölgesindeki nöron sayısı SI grubuna göre anlamlı olarak artmıştır (sırasıyla $p=0.015$, $p=0.0163$, $p=0.0402$).

Şekil 26’da PFC nöron görüntülerinden örnekler gösterilmiştir.



Şekil 26. PFC nöron görüntüleri.

Şekil 27’da Hipokampus bölgesindeki nöron sayısının gruplar arası karşılaştırılması değerlendirilmiştir.



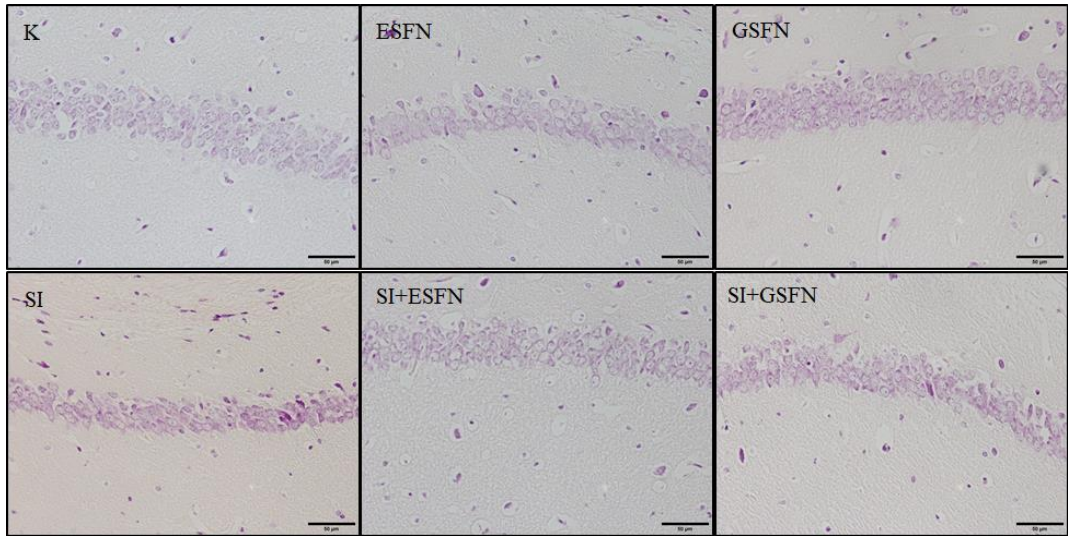
Şekil 27. Hipokampus bölgesindeki nöron sayısı.

a: $p < 0.05$, K grubu ile karşılaştırıldığında,

b: $p < 0.05$, SI grubu ile karşılaştırıldığında,

SI grubunun hipokampus bölgesindeki nöron sayısı K grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır ($p=0.0202$). SI+ESFN ve SI+GSFN gruplarının hipokampus bölgesindeki nöron sayısı SI grubuna göre anlamlı olarak artmıştır (sırasıyla $p=0.0159$, $p=0.0017$).

Şekil 28’de hipokampus nöron görüntülerinden örnekler gösterilmiştir.



Şekil 28. Hipokampus nöron görüntüleri.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda kronik sosyal izolasyon stresine maruz kalan adölesan erkek farelerde Sülförafan'ın bilişsel fonksiyonlar, davranış ve PFC-Hipokampus BDNF, TNF- α , IL-6, MDA ve glutatyon seviyelerine etkilerini inceledik. Sülförafan uygulamasının bilişsel fonksiyonları arttırdığı, depresyon benzeri davranışı azalttığını gözlemledik.

5.1. Vücut Ağırlığı Üzerindeki Etkiler

Çalışmamızdaki K, SI, ESFN, SI+ESFN, GSFN ve SI+GSFN gruplarındaki hayvanların 5. hafta vücut ağırlıkları başlangıç ağırlıklarına göre anlamlı olarak arttı. Bu durum büyük olasılıkla hayvanların adölesan dönemden erişkinliğe kadar geçen sürede deneye katılmalarından kaynaklanmaktadır.

Çalışmamızda, 5. haftada ESFN ve GSFN grupları K grubuna göre, SI+ESFN ve SI+GSFN grupları SI grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek ağırlıkta bulundu. Sosyal izolasyonun farelerde vücut ağırlığının azalmasına neden olduğuna dair literatürde çalışmalar vardır (214). Ancak SFN takviyesinin deney hayvanlarında vücut ağırlığında artış/azalışa neden olabileceği ile ilgili bir veri bulunmamaktadır. Bizim verilerimiz SFN 'nin kilo artışına katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir, bu konunun açıklığa kavuşması için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

5.2. Davranış Deneyleri Üzerindeki Etkiler

5.2.1. Açık Alan Testi üzerindeki Etkiler

Çalışmamızda, açık alan testinde GSFN grubu K ve SI grubuna göre anlamlı olarak orta alanda daha fazla süre geçirdi. Ancak toplam kat edilen mesafe (cm) ve ortalama hızda (cm/s) anlamlı bir fark bulunmadı. Orta alanda geçirilen sürenin azalması, test esnasında kat ettikleri mesafenin az olması ve ortalama hızın düşmesi depresyon benzeri davranışların artmasıyla ilişkilendirilmektedir (206). Kronik sosyal izolasyon modelinin depresyon benzeri davranışlara, bilişsel fonksiyonların bozulmasına neden olduğu bilinmektedir. LPS kaynaklı depresyon benzeri davranış modeli oluşturulan bir çalışmada, SFN uygulaması lokomotor aktivitede bir fark

oluşturmamıştır (35). Çalışmalarda SFN takviyesinde doz ve gün sayılarının farklı olması birçok bulguyu etkilemektedir (34, 35, 204). Dört haftalık kronik hafif strese maruz kalan yetişkin farelerde 14 gün boyunca 10 mg/kg SFN i.p. uygulamasının açık alan testinde orta alanda geçirdiği süre artmıştır (34). Sosyal yenilgi stresi (SSDS) ile depresyon benzeri davranış modeli oluşturulan adölesan farelerin orta alanda geçirdikleri süre azalmıştır. Bu farelere stresten 30 dk öncesinde 10 mg/kg SFN i.p. uygulaması yapmıştır. SFN tedavisi alan farelerde orta alanda geçirilen süre artmıştır (200). Ancak fare gibi küçük hayvanların kendi alanlarına kıyasla bu kadar büyük bir alana bırakılması zaten anksiyete benzeri davranış oluşturabileceği ve bu testin her zaman %100 güvenilir sonuç vermediği düşünülmektedir (215). Ayrıca hayvan türü, yaşı, cinsiyeti, stres modeli, açık alan testinin büyüklüğü her çalışmada sonuçları değiştirebilmektedir (34, 35, 200, 216). Bu sonuçlar düzenli SFN takviyesinin lokomotor aktiviteyi artırabileceği ve depresyon-anksiyete benzeri davranışları önleyebileceğini düşündürmektedir.

5.2.2. Kuyruk Asma Testi Üzerindeki Etkiler

Kuyruktan asma testi depresyon benzeri davranış belirtici olarak kullanılmaktadır (207). Testte, kuyruklarından asılan farelerin kendilerini kurtarmak için kuyruklarına tırmanması depresyon benzeri davranış göstermediği anlamına gelir. Çalışmamızda, sosyal izole grubun immobilité süresi arttı. Erken ve geç SFN uygulaması sosyal izole gruplarda immobilité süresini azalttı. Bu bulguya göre farelerde kronik sosyal izolasyon stresine maruz kaldıktan sonra erken veya geç SFN uygulaması depresyon benzeri davranışı iyileştirdi diyebiliriz. Ancak SFN verilen gruplar arasında da fark vardı. Geç SFN verilen grubun immobilité süresi erken SFN verilen gruba göre daha yüksekti. Bu sonuçlara göre, enjeksiyonla SFN uygulamasının da bir stres kaynağı olduğunu düşünmekteyiz (226) çünkü erken dönem SFN verilen farelerde, enjeksiyon sonrası davranış testlerine kadar geçen süre daha uzundu. Geç dönem SFN alan farelerde ise enjeksiyondan 1 gün sonra davranış testlerine başlanmasının immobilité süresini etkilediğini düşünüyoruz.

SFN'nin duygudurum ve nöronlar üzerindeki koruyucu etkisini araştıran bir çalışmada, LPS ile depresyon modeli oluşturulmuştur. Stres grubunda kuyruktan asma testinde immobilité süresi yüksek bulunmuştur. Bu farelere LPS enjeksiyonundan 30

dakika önce verilen tek doz 10 mg/kg SFN i.p. uygulamasının immobilité süresini azalttığı bildirilmiştir (35). Başka bir çalışmada, fluoxetine verilen farelerde 14 gün 10 mg/kg SFN i.p. uygulaması kuyruktan asma testinde immobilité süresini azaltmıştır (34). Kronik sosyal yenilgi stresi oluşturulan 8 haftalık erkek farelerde immobilité süresi artarken; tek doz 10 mg/kg SFN i.p. uygulamasının immobilité süresini azalttığı bildirilmiştir (201). Benzer bir çalışmada, SSDS stresine maruz kalan 8 haftalık erkek farelerde immobilité süresi artmıştır (204). LPS ile depresyon benzeri davranış modeli oluşturulan 4 haftalık adölesan erkek farelerde kuyruktan asma testinde gruplar arasında immobilité sürelerinde farklılık yokken, aynı çalışmada hayvanlara LPS yerine SSDS stresi uygulandığında grubun immobilité süresi artmıştır. SSDS + SFN verildiğinde immobilité süresi azalmıştır (200).

Çalışmamızda, sosyal izolasyon stresinin depresyon benzeri davranışa neden olduğu; düzenli SFN uygulamasının bu bulguları iyileştirdiğini gördük. Ancak SFN uygulamasının stresle beraber veya sonra kullanılması ile ilgili literatürde bir veri bulunmamaktadır. Bizim verilerimiz erken dönem SFN uygulamasının depresyon benzeri davranışı önleyebileceği/engelleyebileceğini düşündürmektedir, bu konuyla ilgili daha ileri çalışmaya ihtiyaç vardır.

5.2.3. Porsolt Zorunlu Yüzme Testi Üzerindeki Etkiler

Porsolt zorunlu yüzme testi, depresyon benzeri davranışları ve bir maddenin antidepresan etkinliğini ölçmek için kullanılan bir davranış testidir (208). Her ne kadar bazı çalışmalar bu testte immobilité ve mobilite sürelerinin bulgularını sunmuş olsa da biz çalışmamızda immobilitéye ek olarak tırmanma ve yüzme gibi belirli karakteristik davranışları da değerlendirdik. Farelerde tırmanma davranışı, kendini kurtarma, çözüm üretme, kaçış gibi pek çok yaşama dair temel mücadeleyi göstermektedir. Aynı şekilde yüzme davranışının artması, lokomotor aktivitenin arttığını, depresyon benzeri davranış göstermediğini belirtir. İmmobilité çaresizliği, kabullenışı gösterir ve depresyon benzeri davranış belirteçlerindendir (217, 218).

Farelerde kullanılan kronik stres modellerinden biri öngörülemez yenilgi stresidir. Farklı stresörlerin (belirli bir alanda sıkıştırılma, sıcak/soğuk uygulama vs) belirli bir zaman boyunca farklı sıralarda farelere uygulanmasıyla bu model

oluşturulur. Dört haftalık öngörülemez kronik stresin uygulandığı farelerde, stres öncesi tek doz 10 mg/kg SFN i.p. uygulaması yüzme süresini azaltmış, tırmanma süresini arttırmıştır (34). LPS kaynaklı depresyon modeli oluşturulan 8 haftalık farelerde, strese 30 dakika önce verilen 10 mg/kg SFN i.p. immobilité süresini azaltmıştır (35). Kronik sosyal yenilgi stresine (CSDS) maruz kalan farelerde zorunlu yüzme testinde immobilité süresi artmıştır (216). Benzer bir çalışmada, CSDS stresine maruz kalan farelere tek doz 10 mg/kg i.p. SFN uygulaması immobilité süresini azaltmıştır (201).

Bizim çalışmamızda erken ve geç dönem SFN verilen sosyal izole farelerde immobilité süreleri azalmış ve tırmanma süreleri artmıştır. SFN yüzme süreleri azaltmış görünse de burada tırmanma davranışı ön plana çıkmıştır. Bu bulgular ışığında, SFN uygulamasının depresyon benzeri davranışı iyileştirdiğini söyleyebiliriz. Ancak bunu hangi yollarla (nörotransmitter/nörohormonların salınımı ve/veya onların reseptörleri üzerinde) gerçekleştirdiğini anlamak üzere daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

5.2.4. Morris Su Labirenti Üzerindeki Etkiler

MWM testi, hipokampus bağımlı öğrenme ve bellek performansını ölçmekte kullanılan bir testtir. Mekânsal öğrenme ve bellek ile ilgili ana merkezlerden biri olan hipokampus, nöronal aktivitenin yoğun olması nedeniyle nörogenez süreçlerinden etkilenir. Öğrenme ve belleğin ölçüldüğü davranış testlerinde tekrarlanan nöronal aktivasyonun uzun süreli sinaptik güçlendirmeyi arttığı, nörogenez sürecini hızlandırdığı bilinmektedir (95).

LPS ile depresyon benzeri davranış oluşturulan bir çalışmada, tek doz 20 mg/kg SFN i.p. uygulaması hedef kadranda geçirilen süreyi arttırmıştır. Sadece SFN verilen grupta 1 ve 4. Günde platformu bulma süreleri arasında bir fark bulunmadığı gösterilmiştir (203). Başka bir çalışmada, kronik strese maruz kalan grubun ilk 4 günde platformu bulma süresi ve toplam kat ettikleri mesafede bir fark bulunmamıştır (219). Üç haftalık adolesan erkek farelerde 30 gün süreyle uygulanan sosyal yenilgi stresi sonrası hedef kadranda geçirilen süre azalmış, gruplar arasında zıt kadranda geçirilen sürede bir fark bulunmamıştır (220).

Çalışmamızda, sosyal izole grup dışındaki tüm gruplar testin ilk gününe kıyasla 4. gün platformu daha kısa sürede buldu. SI grubu öğrenme ve bellek davranışı en kötü olan gruptu. K, SI+ESFN ve GSFN grupları testin dördüncü günde platformu en kısa sürede buldular ve platformun yerini en iyi öğrenen gruplardı. Sosyal izole olup erken dönem SFN verilen grubun hedef kadranda geçirdiği süre diğer SFN alan gruplara göre daha yüksekti. Ayrıca erken SFN uygulaması hipokampal nöron sayısını ve BDNF seviyesini de arttırdı. Sosyal izole grupta erken dönem SFN uygulamasının kronik sosyal izolasyon stresinin kognitif fonksiyonlar üzerinde yarattığı olumsuz etkiyi önlemiş veya hafifletmiş olabileceğini düşündürmektedir.

SFN verilen tüm gruplarda her ne kadar probe trialde hedef kadranda geçirilen süre azalsa da bir fark yoktu. Sosyal izole olup erken veya geç dönem SFN verilen gruplarda hedef kadranda geçirilen süre kontrol grubuna yaklaştı. Erken ve geç SFN alan gruplardaki fark SFN uygulama zamanı ile ilgili olabilir. Geç dönem SFN alan grup, davranış testlerine başlamadan önce 7 gün boyunca enjeksiyon stresine maruz kaldı. Erken dönem SFN alan grup aynı şekilde enjeksiyon stresine maruz kalsa da davranış testlerine kadar geçen süre 3 hafta idi. Bu da gruplar arasında öğrenme sürelerinin farklı olmasına yol açmış olabilir. Erken ve geç dönem SFN uygulamasının öğrenme davranışı üzerindeki etkisi net bilinmemektedir. Bu konuda bizim çalışmamız yapılan ilk araştırma olup, yeterli karşılaştırma için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

5.3. BDNF Seviyesi Üzerindeki Etkiler

BDNF birçok beyin bölgesinde uyarıcı veya engelleyici sinapları düzenlemektedir. Aynı zamanda bilişsel fonksiyonlar ve öğrenme-bellek altında yatan hücresel süreçlerin ideal ve temel düzenleyicisidir (19, 20).

BDNF transkripsiyonunun mikrogialar üzerindeki inflamatuvar etkisinin incelendiği bir çalışmada, 10 gün SSDS stresine maruz kalan 8 haftalık farelerde mPFC’de BDNF seviyeleri azalmış; 10 mg/kg i.p. SFN ile tedavi edildiğinde mPFC’de BDNF seviyeleri artmıştır (221). Kronik sosyal yenilgi stresine maruz kalan sıçanlarda, SFN uygulamasının mPFC’de BDNF seviyelerinde bir farklılığa neden olmamış ancak hipokampal BDNF seviyeleri ölçüldüğünde, stres grubunun BDNF

seviyesinin azaldığı; tek doz 10 mg/kg i.p. SFN ile tedavi edildiğinde ise stres + SFN grubunun BDNF seviyelerinin arttığı gösterilmiştir (201). Kronik öngörülemez strese ve sosyal izolasyona maruz kalan sıçanlarda, hipokampus BDNF seviyelerinin azaldığı bildirilmiştir (141). Sosyal yenilgi stresine maruz kalan 8 haftalık farelere, 10 mg/kg SFN i.p. verildikten sonra hipokampus BDNF seviyesinin arttığı, depresyon benzeri davranışın gerilediği ve hipokampus CA1 ve CA3 bölgelerindeki nöronlarda dendritik büyüme görüldüğü belirtilmiştir (35).

Çalışmamızda, PFC BDNF protein seviyelerinde bir fark bulunmadı. Hipokampusta, sosyal izole grubun BDNF protein seviyesi daha düşüktü. Sosyal izole gruplarımıza SFN uygulandığında BDNF seviyeleri SI grubuna göre anlamlı olarak yükseldi. Geç dönem SFN verilen sosyal izole grubun BDNF seviyesi erken dönem SFN verilen sosyal izole gruba göre daha yüksekti. Ayrıca hipokampal nöron sayısı hem erken hem de geç SFN alan sosyal izole gruplarda yüksekti. SFN'nin BDNF üzerine olan etkileri kısa sürede ortaya çıkıyor olabilir. Çalışmamızda erken dönem gruplara deneyin ilk haftasında, geç dönem gruplara ise deneyin 4. haftasında SFN verdik. Geç SFN alan grupların BDNF ölçümleri 1 hafta, erken SFN alan grupların BDNF ölçümleri 4 hafta sonra yapılmış oldu. Kronik sosyal izolasyon stresi-BDNF ve SFN ilişkisinde birçok yolak (mTOR, MAPK, NRF2 SIRT2 vb) rol oynasa da, SFN'nin kısa ve uzun süreli etkilerini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır (18, 19, 108, 203, 216). Sosyal izolasyon stresinin bilişsel fonksiyonlar üzerindeki olumsuz etkileri düşünüldüğünde SFN, gerilemiş kognitif fonksiyonlar, depresyon ve anksiyete benzeri davranışları iyileştirmek/önlemek için kullanılabilir. Bu konuda daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

5.4. TNF- α Seviyesi Üzerindeki Etkiler

TNF- α , hücrel stres sonrası salınan proinflamatuvar sitokinlerden biridir. Özellikle hücrel sağkalım ve apoptozis mekanizmalarını harekete geçirdiği bilinmektedir (143).

Kronik yenilgi stresine maruz kalan farelerde serum TNF- α seviyesi yüksek bulunmuş; tek doz 10 mg/kg SFN i.p. ile tedavi edilmesi serum TNF- α seviyelerini azaltmıştır (34). Benzer bir çalışmada, CSDS stresinin serum TNF- α seviyelerini

arttırdığı, SFN ile tedavi sonrası serum TNF- α seviyesinin azaldığı görülmüştür (221). Adölesan farelerde yapılan bir çalışmada LPS kaynaklı stresin, mPFC ve hipokampusta TNF- α seviyelerini arttırdığı görülmüştür (200). LPS ile depresyon modeli oluşturulan farelerde hipokampus TNF- α seviyesi artmıştır. Çalışmada, stres kaynaklı inflamatuvar sitokin seviyesinin arttığı, buna bağlı sinaptik protein seviyelerinin azaldığı; bu durumun depresyon benzeri davranışa yol açtığı bildirilmiştir (203).

Çalışmamızda PFC’de TNF- α seviyelerinde anlamlı bir fark bulunmadı. Hipokampus TNF- α seviyelerinde kontrol grupları (K ve SI) arasında bir fark bulunmadı. Geç dönem SFN alan grubun hipokampus TNF- α seviyesinin erken dönem SFN alan gruba göre daha düşüktü. SI+GSFN grubunun hipokampus TNF- α seviyesi SI+ESFN grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktü.

SFN ve TNF- α ile ilgili çalışmaların çoğu erişkinlik dönemindeki farelerde yapılmış veya serum TNF- α seviyeleri ölçülmüştür (200, 203, 221). SFN’nin TNF- α üzerindeki etkileri dokuda kısa dönemde ortaya çıkarak hücrel inflamasyonun ilerlemesini engelliyor veya yavaşlatıyor olabilir. Dokuda TNF- α seviyesini ölçen yeterli çalışma yoktur. TNF- α , SFN-sosyal izolasyon ilişkisindeki mekanizmalar bilinmemektedir, bu konuda daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

5.5. IL-6 Seviyesi Üzerindeki Etkiler

IL-6, inflamasyon ve akut bağışıklık yanıtlarında üretilen bir sitokindir (151). Kronik strese bağlı artmış IL-6 seviyesi depresyon benzeri davranış ve nöroinflamasyon ile ilişkilendirilmiştir (156, 157). Yapılan bir çalışmada, 4 hafta kronik yenilgi stresine (CMS) maruz kalan farelerde serum IL-6 seviyesi artmıştır. Stresli grubun 14 gün boyunca 10 mg/kg SFN i.p. uygulaması, IL-6 seviyesini azaltmıştır (34). Benzer bir çalışmada, kronik strese maruz kalan farelerde SFN ile tedavi serum IL-6 seviyelerinin düşmesine neden olmuştur (221). LPS ile farelerde depresyon benzeri davranış modelinde, BV2 mikrogial hücre kültürüne 2.5 μ M SFN eklenmesinin mikrogiallarda IL-6 seviyesinin düşmesine neden olduğu bildirilmiştir (222).

Çalışmamızda, PFC’te SI grubunun IL-6 seviyesi yüksekti. Erken ve geç dönem SFN verilmesi sosyal izole gruplarda PFC IL-6 seviyelerini düşürdü. Aynı gruplarda kuyruktan asma ve zorunlu yüzme testinde immobilité süreleri SFN verildikten sonra azaldı. SFN’nin erken veya geç dönem verilmesinin lokomotor aktiviteyi arttırdığını ve depresyon benzeri davranışı iyileştirdiğini söyleyebiliriz. Hipokampusta SI grubu daha yüksek IL-6 seviyesine sahipti. Ancak erken ve geç dönem SFN verilen grupların kontrol grubuna göre IL-6 seviyesi yükseldi. Kontrol grupları dahil tüm hayvanlar 7 gün enjeksiyon stresine maruz kaldı; ancak IL-6 özellikle akut strese karşı seviyesi artan bir sitokindir. Erken SFN verilen grupta deney süresinin son haftasında davranış testleri uygulanmıştır. Davranış testleri esnasında elle tutulma, kuyruktan asma ve suya bırakılma kısa süreli strese neden olabilir. Dolayısıyla akut stres belirteci olan IL-6 seviyesini yükseltmiş olabilir. Geç SFN verilen gruplarda SFN uygulama zamanı deneyin sonlanmasından 1 hafta önce olduğu için yüksek IL-6 seviyesine neden olabileceğini düşünüyoruz. Ek olarak geç SFN alan grupta nöron sayısı kontrol grubuna göre arttı. Akut stresin adölesanlarda nöroenez ve LTP sürecini olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir (227). Geç SFN alan grupta IL-6 seviyesinin artması nöroenez sürecini olumlu yönde etkilemiş olabilir. SFN’nin hangi yollarla IL-6 seviyelerini azalttığını anlamak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

5.6. MDA Seviyesi Üzerindeki Etkiler

MDA, ROS/RNS ve çoklu doymamış lipidler arasındaki reaksiyonun ürünüdür. Hücre hasarında yüksek düzeyde lipid oksidasyon ürünleri tespit edilebilir (163). Kronik sosyal yenilgi stresine maruz kalan 8 haftalık erkek farelerde, mPFC ve hipokampusta MDA seviyeleri daha yüksek bulunmuş olup, artmış MDA seviyelerinin sosyal davranışı azalttığı ve depresyon benzeri davranışa yol açtığı bildirilmiştir (216).

Çalışmamızda, sosyal izole grubun PFC ve hipokampus MDA seviyesi tüm gruplara göre daha yüksekti. Erken ve geç SFN uygulamasıyla sosyal izole grupların (Sİ-ESFN, Sİ-GSFN) PFC MDA seviyesi azaldı. Buna ilaveten hipokampusta da aynı sonucu gördü yani sosyal izole grupların SFN ile tedavisi hipokampus MDA seviyelerini azalttı. Ancak SFN verilen kontrol grupları (ESFN ve GSFN) ile SI+ESFN ve SI+GSFN grupları arasında PFC ve hipokampusta MDA seviyesinde bir fark yoktu.

Bulgularımıza göre, sosyal izolasyonun oksidatif stresi ve depresyon benzeri davranışı arttırdığını, erken/geç SFN uygulamasının ise sosyal izole gruplarda oksidatif stresi azaltarak depresyon benzeri davranışı iyileştirdiğini söyleyebiliriz. Ancak kronik sosyal izolasyon veya kronik sosyal stres alanında yapılan çalışmalarda çoğunlukla serum MDA seviyeleri ölçülmüştür (29, 216). Yeterli karşılaştırma için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

5.7. GSH Seviyesi Üzerindeki Etkiler

Kronik sosyal izolasyon stresi, hücrede total antioksidan kapasitesinin düşmesine ve bundan dolayı detoksifikasyon mekanizmasının bozulmasına neden olmaktadır. Hücrede GSH seviyesinin yükselmesi detoksifikasyonu ve hücrel sağkalıma katkıda bulunmaktadır (170). Yapılan bir çalışmada, CSDS stresine maruz kalan 8 haftalık erkek farelerde kontrol ve stres grubu arasında mPFC GSH seviyelerinde bir fark bulunmamıştır (216). Farklı yaşlarda dişi ve erkek sıçanlarda yapılan bir çalışmada, redoks homeostazını korumak için hayvanlara uzun süreli SFN tedavisi verilmiştir. Çalışmada, 3 ay boyunca subkutan 0,5 mg/kg SFN tedavisinin 15 aylık yetişkin dişi sıçanlarda beyin korteksinde ve hipokampusta GSH seviyelerini azalttığı bildirilmiştir (223). Başka bir çalışmada ise 3 haftalık sosyal izolasyona maruz kalan sıçanlarda hipokampal GSH seviyelerinde bir fark olmadığı ve hipokampusun GSH'a duyarsız olduğu yorumu yapılmıştır (173). Biz de çalışmamızda, PFC ve hipokampus GSH seviyelerinde gruplar arasında anlamlı fark bulamadık. Yapılan kısıtlı sayıda çalışmada, kronik sosyal izolasyonun oksidatif stresi arttırdığı ve redoks döngüsünü bozduğu bilinmektedir (173, 216, 223). Ancak, kronik sosyal izolasyon çalışmalarının pek azı beyin dokusunda GSH seviyelerini değerlendirmiştir (173, 216). Bu konuda doğru karşılaştırmalar yapabilmek için daha ileri çalışmalar gereklidir.

5.8. Nöron Sayısı Üzerindeki Etkiler

Kronik strese maruz kalmanın beyinde hücre ölümünü ve nöronal atrofiyi artırdığı bilinmektedir (35). Alzheimer modeli oluşturulan erkek ve dişi farelerde, 90 gün boyunca oral gavaj ile 25 mg/kg SFN tedavisi hipokampal kolinerjik nöron sayısını artırmıştır (224). CSDS maruz kalan erkek farelerde, strese maruz kaldıktan 1 ay sonra PFC'deki nöron dendritlerinde kısalma görülmüştür (225).

Adölesan farelerde kronik sosyal izolasyon stresinin PFC’de depresyon benzeri davranışlara neden olduğu bilinmektedir (35). Çalışmamızda, erken/geç SFN verilen sosyal izole gruplarda PFC’de nöron sayısı arttı, SFN’nin stres sonrası uygulanması ile prefrontal nörojeneze katkıda bulunabileceğini söyleyebiliriz. Aynı zamanda bu gruplarda kuyruktan asma ve zorunlu yüzme testinde depresyon benzeri davranışın iyileştiğini gördük. Bu sonuçlara göre SFN uygulamasının depresyon benzeri davranışı azalttığı şeklinde yorumlayabiliriz. Geç SFN verilen grupta PFC’de nöron sayısı kontrol grubuna göre arttı. Ancak aynı sonucu erken SFN verilen grupta görmedik. Kuyruktan asma testinde geç SFN verilen grup erken SFN verilen gruba göre daha az depresyon benzeri davranış göstermişti. Kronik sosyal izolasyon stresine maruz kaldıktan sonra verilen SFN’in hücre sayısını arttırması nöroenez süreçlerini olumlu yönde etkiliyor olabilir.

Adölesan farelerde kronik sosyal izolasyon stresinin hipokampal hücre proliferasyonuna ve nöroenez süreçlerini olumsuz etkilediği bilinmektedir (203). Çalışmamızda, sosyal izole grupta hipokampal nöron sayısı daha düşüktü. Erken ve geç SFN verilmesi sosyal izole gruplarda hipokampal nöron sayısını artırdı. Aynı zamanda erken ve geç SFN verilen sosyal izole gruplarda hipokampus BDNF seviyesi de artmıştı. Buna ilaveten MWM testinde probe trialde SI grubu hedef kadranda daha az zaman geçirmişti. Bu bilgiler ışığında, kronik sosyal izolasyon stresine karşı SFN’nin hipokampal nörojeneze ve kognitif fonksiyonların geliştirilmesinde katkısı olabileceğini düşünmekteyiz. SFN’nin hipokampal nörojeneze katkısını anlamak ve geliştirmek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada;

* TST ve FST testlerinde sosyal izolasyonun depresyon benzeri davranışa neden olduğu; grupların SFN ile tedavisinden sonra bu davranışın gerilediği görüldü. Aynı zamanda sosyal izole grupların SFN ile tedavisinden sonra PFC nöron sayılarında arttı.

* Erken dönem (4-5 haftalık) veya Geç dönem (7-8 haftalık) SFN verilen gruplarda davranış testlerinde depresyon benzeri davranışın gerilediğini/iyileştirdiğini söyleyebiliriz. Ancak sonuçlarımızda erken veya geç SFN uygulaması arasında fark yoktu. Her iki dönemde de SFN'nin depresyon benzeri davranışı iyileştirdiğini söyleyebiliriz. Bu sonuç, SFN'nin hem profilaktik hem de terapötik bir etkisi olabileceğini düşündürmektedir.

* MWM testinde SFN verilen sosyal izole gruplar platformu daha hızlı buldular. Aynı zamanda sosyal izole grupların SFN ile tedavisinden sonra hipokampal BDNF ve nöron sayılarında artış görüldü. Bu da SFN tedavisinin öğrenme ve belleği olumlu yönde etkilediği, kognitif fonksiyonları arttırdığını göstermektedir.

* Sosyal izole grupların SFN ile tedavisinden sonra proinflamatuvar sitokinlerden TNF- α hipokampusta, IL-6 hem hipokampus hem de PFC'te azaldı. Oksidatif stres belirteci olan MDA, PFC ve hipokampusta azaldı. SFN uygulaması ile beyinde proinflamatuvar sitokinlerin ve oksidatif stresin azalmasında SFN önemli bir aracı olabilir.

Bu sonuçlara göre kronik sosyal izolasyona maruz kalan gruplarda inflamasyon ve oksidatif stresin artmasına bağlı olarak depresyon benzeri davranışın görüldüğü; öğrenme ve bellek aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir. Sosyal izole grupların SFN ile tedavi edilmesinin depresyon benzeri davranışı azalttığı ve bilişsel fonksiyonları arttırarak nöroplastisiteye olumlu katkıda bulunduğu söylenebilir. Sosyal izolasyon ile artan depresyon benzeri davranışlar, bilişsel fonksiyonlarda azalma ve stresin vücutta yarattığı hücresel yıkım daha büyük hastalıkların başlangıcı olabilir. Kronik stresin yarattığı hasarların en aza indirilmesi, depresyon benzeri davranışların ve gerileyen kognitif fonksiyonların düzeltilmesi için SFN kullanımının beslenmeye eklenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Cacioppo JT, Cacioppo S, Capitanio JP, Cole SW. The Neuroendocrinology of Social Isolation. *Annual review of psychology*. 2015; 66: 733–767.
2. Brandt L, Liu S, Heim C, Heinz A. The effects of social isolation stress and discrimination on mental health. *Translational Psychiatry*. 2022 Sep 21;12(1):398.
3. Orben A, Tomova L, Blakemore SJ. The effects of social deprivation on adolescent development and mental health. *The Lancet, Child and Adolescent Health*. 2020;4(8):634-40.
4. Fone KC, Porkess MV. Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2008 Aug;32(6):1087-102.
5. Buwalda B, Geerdink M, Vidal J, Koolhaas JM. Social behavior and social stress in adolescence: a focus on animal models. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2011 Aug;35(8):1713-21.
6. Mumtaz F, Khan MI, Zubair M, Dehpour AR. Neurobiology and consequences of social isolation stress in animal model-A comprehensive review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2018 Sep;105:1205-1222.
7. Tatu L, Vuillier F. Structure and vascularization of the human hippocampus. *Frontiers of Neurology and Neuroscience*. 2014;34:18-25.
8. Hueston CM, Cryan JF, Nolan YM. Stress and adolescent hippocampal neurogenesis: diet and exercise as cognitive modulators. *Translational Psychiatry*. 2017 Apr 4;7(4):e1081.
9. Haber SN, Liu H, Seidlitz J, Bullmore E. Prefrontal connectomics: from anatomy to human imaging. *Neuropsychopharmacology*. 2022 Jan;47(1):20-40.
10. He J, Crews FT. Neurogenesis decreases during brain maturation from adolescence to adulthood. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2007 Feb;86(2):327-33.

11. Panjwani AA, Liu H, Fahey JW. Crucifers and related vegetables and supplements for neurologic disorders: what is the evidence? *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2018 Nov;21(6):451-457.
12. Vanduchova A, Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Isothiocyanate from Broccoli, Sulforaphane, and Its Properties. *Journal of Medicinal Food*. 2019 Feb;22(2):121-126.
13. Jazwa A, Rojo AI, Innamorato NG, Hesse M, Fernández-Ruiz J, Cuadrado A. Pharmacological targeting of the transcription factor Nrf2 at the basal ganglia provides disease modifying therapy for experimental parkinsonism. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2011 Jun 15;14(12):2347-60.
14. Zhang, Y., Talalay, P., Cho, C. G., & Posner, G. H. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992 Mar 15;89(6):2399-403.
15. Su ZY, Zhang C, Lee JH, Shu L, Wu TY, Khor TO, Conney AH, Lu YP, Kong AN. Requirement and epigenetics reprogramming of Nrf2 in suppression of tumor promoter TPA-induced mouse skin cell transformation by sulforaphane. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*. 2014 Mar;7(3):319-29.
16. Bergström P, Andersson HC, Gao Y, Karlsson JO, Nodin C, Anderson MF, Nilsson M, Hammarsten O. Repeated transient sulforaphane stimulation in astrocytes leads to prolonged Nrf2-mediated gene expression and protection from superoxide-induced damage. *Neuropharmacology*. 2011 Feb-Mar;60(2-3):343-53.
17. Zheng W, Li X, Zhang T, Wang J. Biological mechanisms and clinical efficacy of sulforaphane for mental disorders. *General Psychiatry*. 2022 Apr 5;35(2):e100700.
18. Chen ZY, Jing D, Bath KG, Ieraci A, Khan T, Siao CJ, Herrera DG, Toth M, Yang C, McEwen BS, Hempstead BL, Lee FS. Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior. *Science*. 2006 Oct 6;314(5796):140-3.
19. Cao W, Duan J, Wang X, Zhong X, Hu Z, Huang F, Wang H, Zhang J, Li F, Zhang J, Luo X, Li CQ. Early enriched environment induces an increased

- conversion of proBDNF to BDNF in the adult rat's hippocampus. *Behavioural Brain Research*. 2014 May 15;265:76-83.
20. Zaletel I, Filipović D, Puškaš N. Hippocampal BDNF in physiological conditions and social isolation. *Reviews in the Neurosciences*. 2017 Jul 26;28(6):675-692.
 21. Saad N, Raviv D, Mizrachi Zer-Aviv T, Akirav I. Cannabidiol Modulates Emotional Function and Brain-Derived Neurotrophic Factor Expression in Middle-Aged Female Rats Exposed to Social Isolation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023 Oct 23;24(20):15492.
 22. Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends in Cell Biology*. 2001 Sep;11(9):372-7.
 23. Alshammari TK, Alghamdi H, Alkhader LF, Alqahtani Q, Alrasheed NM, Yacoub H, Alnaem N, AlNakiyah M, Alshammari MA. Analysis of the molecular and behavioral effects of acute social isolation on rats. *Behavioural Brain Research*. 2020 Jan 13;377:112191.
 24. Belardo C, Alessio N, Pagano M, De Dominicis E, Infantino R, Perrone M, Iannotta M, Galderisi U, Rinaldi B, Scuteri D, Bagetta G, Palazzo E, Maione S, Luongo L. PEA-OXA ameliorates allodynia, neuropsychiatric and adipose tissue remodeling induced by social isolation. *Neuropharmacology*. 2022 May 1;208:108978.
 25. Kaur S, Bansal Y, Kumar R, Bansal G. A panoramic review of IL-6: Structure, pathophysiological roles and inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2020 Mar 1;28(5):115327.
 26. Makinodan M, Ikawa D, Miyamoto Y, Yamauchi J, Yamamuro K, Yamashita Y, Toritsuka M, Kimoto S, Okumura K, Yamauchi T, Fukami SI, Yoshino H, Wanaka A, Kishimoto T. Social isolation impairs remyelination in mice through modulation of IL-6. *Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB Journal)*. 2016 Dec;30(12):4267-4274.
 27. de Kloet ER, Joëls M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 2005 Jun;6(6):463-75.

28. Pacák K, Palkovits M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocrine Reviews*. 2001 Aug;22(4):502-48.
29. Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Analytical Biochemistry*. 2017 May 1;524:13-30.
30. Friedman J. Why is the nervous system vulnerable to oxidative stress? In: Gadoth N, Goebel HH (eds.) *Oxidative stress and free radical damage in neurology*. 2011. Humana Press, Clifton, p 19–27.
31. Lei XG. In vivo antioxidant role of glutathione peroxidase: evidence from knockout mice. *Methods in Enzymology*. 2002;347:213-25.
32. Sahin E, Gümüslü S. Alterations in brain antioxidant status, protein oxidation and lipid peroxidation in response to different stress models. *Behavioural Brain Research*. 2004 Dec 6;155(2):241-8.
33. Zlatković J, Todorović N, Bošković M, Pajović SB, Demajo M, Filipović D. Different susceptibility of prefrontal cortex and hippocampus to oxidative stress following chronic social isolation stress. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2014 Aug;393(1-2):43-57.
34. Wu S, Gao Q, Zhao P, Gao Y, Xi Y, Wang X, Liang Y, Shi H, Ma Y. Sulforaphane produces antidepressant- and anxiolytic-like effects in adult mice. *Behavioural Brain Research*. 2016 Mar 15;301:55-62.
35. Zhang JC, Yao W, Dong C, Yang C, Ren Q, Ma M, Han M, Wu J, Ushida Y, Suganuma H, Hashimoto K. Corrigendum to "Prophylactic Effects of Sulforaphane on Depression-Like Behavior and Dendritic Changes in Mice After Inflammation" [*Journal of Nutritional Biochemistry*; 39(2017); 134-144]. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2021 Mar;89:108562.
36. Hayward R. Stress. *The Lancet*. 2005 Jun 11-17;365(9476):2001.
37. McEwen BS, Gianaros PJ. Stress- and allostasis-induced brain plasticity. *Annual Review of Medicine*. 2011;62:431-45.
38. Wade TJ, Cairney J, Pevalin DJ. Emergence of gender differences in depression during adolescence: national panel results from three countries.

- Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry. 2002;41(2):190- 198.
39. Kim, Woonhee, and ChiHye Chung. “Brain-wide cellular mapping of acute stress-induced activation in male and female mice. Official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB Journal) vol. 35,12 (2021): e22041.
 40. Nicolaides NC, Kyratzi E, Lamprokostopoulou A, Chrousos GP, Charmandari E. Stress, the stress system and the role of glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation*. 2015;22(1-2):6-19.
 41. Oyola MG, Handa RJ. Hypothalamic-pituitary-adrenal and hypothalamic-pituitary-gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity. *Stress*. 2017 Sep;20(5):476-494.
 42. Sunwoo SH, Lee JS, Bae S, Shin YJ, Kim CS, Joo SY, Choi HS, Suh M, Kim SW, Choi YJ, Kim TI. Chronic and acute stress monitoring by electrophysiological signals from adrenal gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2019 Jan 22;116(4):1146-1151.
 43. Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *New England Journal of Medicine*. 1995 May 18;332(20):1351-62.
 44. Chrousos GP, Calabrese JR, Avgerinos P, Kling MA, Rubinow D, Oldfield EH, Schuermeyer T, Kellner CH, Cutler GB Jr, Loriaux DL, et al. Corticotropin releasing factor: basic studies and clinical applications. *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 1985;9(4):349-59.
 45. Smith MA, Kling MA, Whitfield HJ, Brandt HA, Demitrack MA, Geraciotti TD, Chrousos GP, Gold PW. Corticotropin-releasing hormone: from endocrinology to psychobiology. *Hormone Research*. 1989;31(1-2):66-71.
 46. Bornstein SR, Chrousos GP. Clinical review 104: Adrenocorticotropin (ACTH)- and non-ACTH-mediated regulation of the adrenal cortex: neural and immune inputs. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999 May;84(5):1729-36.

47. Hammes SR, Levin ER. Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocrine Reviews*. 2007 Dec;28(7):726-41.
48. Turnbull AV, Rivier C. Corticotropin-Releasing Factor (CRF) and Endocrine Responses to Stress: CRF Receptors, Binding Protein, and Related Peptides. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1997;215(1):1-10.
49. Antoun M, Edwards KM, Sweeting J, Ding D. The acute physiological stress response to driving: A systematic review. *PLoS One*. 2017;12(10):e0185517.
50. Chrousos GP, Vingerhoeds A, Brandon D, Eil C, Pugeat M, DeVroede M, et al. Primary cortisol resistance in man. A glucocorticoid receptor-mediated disease. *The Journal of Clinical Investigation*. 1982;69(6):1261-9.
51. Felger JC, Haroon E, Patel TA, Goldsmith DR, Wommack EC, Woolwine BJ, et al. What does plasma CRP tell us about peripheral and central inflammation in depression? *Molecular psychiatry*. 2020 Jun;25(6):1301-1311.
52. Fries GR, Saldana VA, Finnstein J, Rein T. Molecular pathways of major depressive disorder converge on the synapse. *Molecular psychiatry*. 2023 Jan;28(1):284-297.
53. Roh JS, Sohn DH. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Network*. 2018 Aug 13;18(4):e27.
54. Hassamal S. Chronic stress, neuroinflammation, and depression: an overview of pathophysiological mechanisms and emerging anti-inflammatories. *Frontiers in Psychiatry*. 2023 May 11;14:1130989.
55. Araya-Callís C, Hiemke C, Abumaria N, Flugge G. Chronic psychosocial stress and citalopram modulate the expression of the glial proteins GFAP and NDRG2 in the hippocampus. *Psychopharmacology (Berl)*. 2012 Nov;224(1):209-22.
56. Mahar I, Bambico FR, Mechawar N, Nobrega JN. Stress, serotonin, and hippocampal neurogenesis in relation to depression and antidepressant effects. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2014 Jan;38:173-92.

57. Dahlstroem A, Fuxe K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta physiologica Scandinavica. Supplementum* 1964;SUPPL 232:1-55.
58. Blier P, de Montigny C. Serotonin and drug-induced therapeutic responses in major depression, obsessive-compulsive and panic disorders. *Neuropsychopharmacology*. 1999 Aug;21(2 Suppl):91S-98S.
59. Ressler KJ, Nemeroff CB. Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders. *Depression and Anxiety*. 2000;12 Suppl 1:2-19.
60. Tanti A, Westphal WP, Girault V, Brizard B, Devers S, Leguisquet AM, Surget A, Belzung C. Region-dependent and stage-specific effects of stress, environmental enrichment, and antidepressant treatment on hippocampal neurogenesis. *Hippocampus*. 2013 Sep;23(9):797-811.
61. Bambico FR, Nguyen NT, Gobbi G. Decline in serotonergic firing activity and desensitization of 5-HT_{1A} autoreceptors after chronic unpredictable stress. *European Neuropsychopharmacology*. 2009 Mar;19(3):215-28.
62. Sunwoo SH, Lee JS, Bae S, Shin YJ, Kim CS, Joo SY, Choi HS, Suh M, Kim SW, Choi YJ, Kim TI. Chronic and acute stress monitoring by electrophysiological signals from adrenal gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2019 Jan 22;116(4):1146-1151.
63. Hollis F, Pope BS, Gorman-Sandler E, Wood SK. Neuroinflammation and Mitochondrial Dysfunction Link Social Stress to Depression. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*. 2022;54:59-93.
64. Obrador E, Salvador R, López-Blanch R, Jihad-Jebbar A, Vallés SL, Estrela JM. Oxidative Stress, Neuroinflammation and Mitochondria in the Pathophysiology of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Sep 22;9(9):901.
65. Moghaddam MH, Bayat AH, Eskandari N, Abdollahifar MA, Fotouhi F, Forouzannia A, Rafiei R, Hatari S, Seraj A, Shahidi AMEJ, Ghorbani Z, Peyvandi AA, Aliaghaei A. Elderberry diet ameliorates motor function and

- prevents oxidative stress-induced cell death in rat models of Huntington disease. *Brain Research*. 2021 Jul 1;1762:147444.
66. Solleiro-Villavicencio H, Rivas-Arancibia S. Effect of Chronic Oxidative Stress on Neuroinflammatory Response Mediated by CD4⁺T Cells in Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2018 Apr 27;12:114.
 67. Madore C, Yin Z, Leibowitz J, Butovsky O. Microglia, Lifestyle Stress, and Neurodegeneration. *Immunity*. 2020 Feb 18;52(2):222-240.
 68. Engelhardt B, Vajkoczy P, Weller RO. The movers and shapers in immune privilege of the CNS. *Nature Immunology*. 2017 Feb;18(2):123-131.
 69. Czeh M, Gressens P, Kaindl AM. The yin and yang of microglia. *Developmental Neuroscience*. 2011;33(3-4):199-209.
 70. Ślusarczyk J, Trojan E, Głombik K, Piotrowska A, Budziszewska B, Kubera M, Popiołek-Barczyk K, Lasoń W, Mika J, Basta-Kaim A. Targeting the NLRP3 Inflammasome-Related Pathways via Tianeptine Treatment-Suppressed Microglia Polarization to the M1 Phenotype in Lipopolysaccharide-Stimulated Cultures. *International Journal of Molecular Sciences* . 2018 Jul 5;19(7):1965.
 71. Lively S, Schlichter LC. Microglia Responses to Pro-inflammatory Stimuli (LPS, IFN γ +TNF α) and Reprogramming by Resolving Cytokines (IL-4, IL-10). *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2018 Jul 24;12:215.
 72. Franco R, Fernández-Suárez D. Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Progress in Neurobiology*. 2015 Aug;131:65-86.
 73. Tang Y, Le W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology*. 2016 Mar;53(2):1181-1194.
 74. Yuan J, Ge H, Liu W, Zhu H, Chen Y, Zhang X, Yang Y, Yin Y, Chen W, Wu W, Yang Y, Lin J. M2 microglia promotes neurogenesis and oligodendrogenesis from neural stem/progenitor cells via the PPAR γ signaling pathway. *Oncotarget*. 2017 Mar 21;8(12):19855-19865.

75. Hoogland IC, Houbolt C, van Westerloo DJ, van Gool WA, van de Beek D. Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. *Journal of Neuroinflammation*. 2015 Jun 6;12:114.
76. Farooq RK, Tanti A, Ainouche S, Roger S, Belzung C, Camus V. A P2X7 receptor antagonist reverses behavioural alterations, microglial activation and neuroendocrine dysregulation in an unpredictable chronic mild stress (UCMS) model of depression in mice. *Psychoneuroendocrinology*. 2018 Nov;97:120-130.
77. Zhai X, Liu J, Ni A, Ye J. MiR-497 promotes microglia activation and proinflammatory cytokines production in chronic unpredictable stress-induced depression via targeting FGF2. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 2020 Dec;110:101872.
78. Subedi L, Lee JH, Yumnam S, Ji E, Kim SY. Anti-Inflammatory Effect of Sulforaphane on LPS-Activated Microglia Potentially through JNK/AP-1/NF- κ B Inhibition and Nrf2/HO-1 Activation. *Cells*. 2019 Feb 22;8(2):194.
79. Friedman NP, Robbins TW. The role of prefrontal cortex in cognitive control and executive function. *Neuropsychopharmacology*. 2022 Jan;47(1):72-89
80. Miller EK. The prefrontal cortex and cognitive control. *Nature Reviews. Neuroscience*. 2000 Oct;1(1):59-65.
81. Uylings HB, Groenewegen HJ, Kolb B. Do rats have a prefrontal cortex? *Behavioural Brain Research*. 2003 Nov 30;146(1-2):3-17.
82. Wellman CL, Bollinger JL, Moench KM. Effects of stress on the structure and function of the medial prefrontal cortex: Insights from animal models. *International Review of Neurobiology*. 2020;150:129-153.
83. Broadbent DE, Cooper PF, FitzGerald P, Parkes KR. The Cognitive Failures Questionnaire (CFQ) and its correlates. *The British Journal of Clinical Psychology*. 1982 Feb;21(1):1-16.
84. Minor TR, Jackson RL, Maier SF. Effects of task-irrelevant cues and reinforcement delay on choice-escape learning following inescapable shock: evidence for a deficit in selective attention. *Journal of Experimental Psychology. Animal Behavior Processes*. 1984 Oct;10(4):543-56.

85. McEwen BS. Neurobiological and Systemic Effects of Chronic Stress. *Chronic Stress* (Thousand Oaks). 2017 Jan-Dec;1:2470547017692328.
86. Tsujimoto S. The prefrontal cortex: functional neural development during early childhood. *The Neuroscientist*. 2008 Aug;14(4):345-58.
87. Urban KR, Geng E, Bhatnagar S, Valentino RJ. Age- and sex-dependent impact of repeated social stress on morphology of rat prefrontal cortex pyramidal neurons. *Neurobiology of Stress*. 2019 Apr 13;10:100165.
88. Liston C, Miller MM, Goldwater DS, Radley JJ, Rocher AB, Hof PR, Morrison JH, McEwen BS. Stress-induced alterations in prefrontal cortical dendritic morphology predict selective impairments in perceptual attentional set-shifting. *The Journal of Neuroscience*. 2006 Jul 26;26(30):7870-4.
89. Eiland L, Ramroop J, Hill MN, Manley J, McEwen BS. Chronic juvenile stress produces corticolimbic dendritic architectural remodeling and modulates emotional behavior in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2012 Jan;37(1):39-47.
90. Leussis MP, Andersen SL. Is adolescence a sensitive period for depression? Behavioral and neuroanatomical findings from a social stress model. *Synapse*. 2008 Jan;62(1):22-30.
91. Radley JJ, Rocher AB, Janssen WG, Hof PR, McEwen BS, Morrison JH. Reversibility of apical dendritic retraction in the rat medial prefrontal cortex following repeated stress. *Experimental Neurology*. 2005 Nov;196(1):199-203.
92. Hiser J, Koenigs M. The Multifaceted Role of the Ventromedial Prefrontal Cortex in Emotion, Decision Making, Social Cognition, and Psychopathology. *Biological Psychiatry*. 2018 Apr 15;83(8):638-647.
93. Chiba S, Numakawa T, Ninomiya M, Richards MC, Wakabayashi C, Kunugi H. Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 2012 Oct 1;39(1):112-9.
94. Knierim JJ. The hippocampus. *Current Biology*. 2015 Dec 7;25(23):R1116-21.

95. Moser EI, Kropff E, Moser MB. Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. *Annual Review of Neuroscience*. 2008;31:69-89.
96. Cobar LF, Yuan L, Tashiro A. Place cells and long-term potentiation in the hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory*. 2017 Feb;138:206-214.
97. Leblanc H, Ramirez S. Linking Social Cognition to Learning and Memory. *The Journal of Neuroscience*. 2020 Nov 11;40(46):8782-8798.
98. Waters RP, Rivalan M, Bangasser DA, Deussing JM, Ising M, Wood SK, Holsboer F, Summers CH. Evidence for the role of corticotropin-releasing factor in major depressive disorder. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2015 Nov;58:63-78.
99. Fee C, Banasr M, Sibille E. Somatostatin-Positive Gamma-Aminobutyric Acid Interneuron Deficits in Depression: Cortical Microcircuit and Therapeutic Perspectives. *Biological Psychiatry*. 2017 Oct 15;82(8):549-559.
100. Wohleb ES, Franklin T, Iwata M, Duman RS. Integrating neuroimmune systems in the neurobiology of depression. *Nature Reviews. Neuroscience*. 2016 Aug;17(8):497-511.
101. Koo JW, Chaudhury D, Han MH, Nestler EJ. Role of Mesolimbic Brain-Derived Neurotrophic Factor in Depression. *Biological Psychiatry*. 2019 Nov 15;86(10):738-748.
102. Duman RS, Sanacora G, Krystal JH. Altered Connectivity in Depression: GABA and Glutamate Neurotransmitter Deficits and Reversal by Novel Treatments. *Neuron*. 2019 Apr 3;102(1):75-90.
103. Duman RS, Aghajanian GK. Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets. *Science*. 2012 Oct 5;338(6103):68-72.
104. Squire LR, Barondes SH. Memory impairment during prolonged training in mice given inhibitors of cerebral protein synthesis. *Brain Research*. 1973 Jun 29;56:215-25.
105. Malenka RC, Nicoll RA. Long-term potentiation--a decade of progress? *Science*. 1999 Sep 17;285(5435):1870-4.
106. Frey U, Morris RG. Synaptic tagging: implications for late maintenance of hippocampal long-term potentiation. *Trends in Neurosciences*. 1998 May;21(5):181-8.

107. Poo MM. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nature Reviews. Neuroscience*. 2001 Jan;2(1):24-32.
108. Lessmann V, Gottmann K, Heumann R. BDNF and NT-4/5 enhance glutamatergic synaptic transmission in cultured hippocampal neurones. *Neuroreport*. 1994 Dec 30;6(1):21-5.
109. Wang G, An T, Lei C, Zhu X, Yang L, Zhang L, Zhang R. Antidepressant-like effect of ginsenoside Rb1 on potentiating synaptic plasticity via the miR-134-mediated BDNF signaling pathway in a mouse model of chronic stress-induced depression. *Journal of Ginseng Research*. 2022 May;46(3):376-386.
110. Blanchard RJ, McKittrick CR, Blanchard DC. Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiology & Behavior*. 2001 Jun;73(3):261-71.
111. Belzung C, Lemoine M. Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. *Biology of Mood & Anxiety Disorders*. 2011 Nov 7;1(1):9.
112. Beery AK, Zucker I. Sex bias in neuroscience and biomedical research. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2011 Jan;35(3):565-72.
113. Yoon DY, Mansukhani NA, Stubbs VC, Helenowski IB, Woodruff TK, Kibbe MR. Sex bias exists in basic science and translational surgical research. *Surgery*. 2014 Sep;156(3):508-16.
114. Blanchard DC, Griebel G, Blanchard RJ. Gender bias in the preclinical psychopharmacology of anxiety: male models for (predominantly) female disorders. *Journal of Psychopharmacology*. 1995 Jan;9(2):79-82.
115. Blanchard DC, Spencer RL, Weiss SM, Blanchard RJ, McEwen B, Sakai RR. Visible burrow system as a model of chronic social stress: behavioral and neuroendocrine correlates. *Psychoneuroendocrinology*. 1995;20(2):117-34.
116. Willner P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*. 2005;52(2):90-110.
117. Bourin M, Petit-Demoulière B, Dhonnchadha BN, Hascöet M. Animal models of anxiety in mice. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 2007 Dec;21(6):567-74.

118. Henssler J, Stock F, van Bohemen J, Walter H, Heinz A, Brandt L. Mental health effects of infection containment strategies: quarantine and isolation-a systematic review and meta-analysis. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*. 2021 Mar;271(2):223-234.
119. Tomova L, Wang KL, Thompson T, Matthews GA, Takahashi A, Tye KM, Saxe R. Acute social isolation evokes midbrain craving responses similar to hunger. *Nature Neuroscience*. 2020 Dec;23(12):1597-1605.
120. Smith KE, Pollak SD. Early life stress and perceived social isolation influence how children use value information to guide behavior. *Child Development*. 2022 May;93(3):804-814.
121. Heim CM, Entringer S, Buss C. Translating basic research knowledge on the biological embedding of early-life stress into novel approaches for the developmental programming of lifelong health. *Psychoneuroendocrinology*. 2019 Jul;105:123-137.
122. Tottenham N. Social scaffolding of human amygdala-mPFC circuit development. *Social Neuroscience*. 2015;10(5):489-99.
123. Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology*. 1997 Dec;134(4):319-29.
124. Joëls M, Karst H, Krugers HJ, Lucassen PJ. Chronic stress: implications for neuronal morphology, function and neurogenesis. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2007 Aug-Sep;28(2-3):72-96.
125. De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joëls M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocrine Reviews*. 1998 Jun;19(3):269-301.
126. Djordjevic J, Djordjevic A, Adzic M, Radojcic MB. Effects of chronic social isolation on Wistar rat behavior and brain plasticity markers. *Neuropsychobiology*. 2012;66(2):112-9.
127. Djordjevic A, Adzic M, Djordjevic J, Radojcic MB. Chronic social isolation suppresses proplastic response and promotes proapoptotic signalling in prefrontal cortex of Wistar rats. *Journal of Neuroscience Research*. 2010 Aug 15;88(11):2524-33.

128. Yamamuro K, Yoshino H, Ogawa Y, Makinodan M, Toritsuka M, Yamashita M, Corfas G, Kishimoto T. Social Isolation During the Critical Period Reduces Synaptic and Intrinsic Excitability of a Subtype of Pyramidal Cell in Mouse Prefrontal Cortex. *Cerebral Cortex*. 2018 Mar 1;28(3):998-1010.
129. Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annual Review of Neuroscience*. 2001;24:677-736.
130. Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *The EMBO Journal*. 1982;1(5):549-53.
131. Andreska T, Aufmkolk S, Sauer M, Blum R. High abundance of BDNF within glutamatergic presynapses of cultured hippocampal neurons. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2014 Apr 11;8:107.
132. Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, Savas JN, Yates JR 3rd, Lafaille JJ, Hempstead BL, Littman DR, Gan WB. Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell*. 2013 Dec 19;155(7):1596-609.
133. Vilar M, Mira H. Regulation of Neurogenesis by Neurotrophins during Adulthood: Expected and Unexpected Roles. *Frontiers in Neuroscience*. 2016 Feb 9;10:26.
134. Hempstead BL. Brain-Derived Neurotrophic Factor: Three Ligands, Many Actions. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*. 2015;126:9-19.
135. Wang M, Xie Y, Qin D. Proteolytic cleavage of proBDNF to mBDNF in neuropsychiatric and neurodegenerative diseases. *Brain research bulletin*. 2021 Jan;166:172-184.
136. Colucci-D'Amato L, Speranza L, Volpicelli F. Neurotrophic Factor BDNF, Physiological Functions and Therapeutic Potential in Depression, Neurodegeneration and Brain Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020 Oct 21;21(20):7777.
137. Al Omran AJ, Watanabe S, Hong EC, Skinner SG, Zhang M, Zhang J, Shao XM, Liang J. Dihydromyricetin ameliorates social isolation-induced anxiety by modulating mitochondrial function, antioxidant enzymes, and BDNF. *Neurobiology of Stress*. 2022 Oct 30;21:100499.

138. Borges JV, Pires VN, de Freitas BS, Rübensam G, Vieira VC, de Souza Dos Santos C, Schröder N, Bromberg E. Behavior, BDNF and epigenetic mechanisms in response to social isolation and social support in middle aged rats exposed to chronic stress. *Behavioural Brain Research*. 2023 Mar 12;441:114303.
139. Liu N, Wang Y, An AY, Banker C, Qian YH, O'Donnell JM. Single housing-induced effects on cognitive impairment and depression-like behavior in male and female mice involve neuroplasticity-related signaling. *The European journal of neuroscience*. 2020 Jul;52(1):2694-2704.
140. Salihu SA, Ghafari H, Ahmadimanesh M, Gortany NK, Shafaroodi H, Ghazi-Khansari M. Glatiramer acetate attenuates depressive/anxiety-like behaviors and cognitive deficits induced by post-weaning social isolation in male mice. *Psychopharmacology*. 2021 Aug;238(8):2121-2132.
141. Borges JV, Pires VN, de Freitas BS, Rübensam G, Vieira VC, de Souza Dos Santos C, Schröder N, Bromberg E. Behavior, BDNF and epigenetic mechanisms in response to social isolation and social support in middle aged rats exposed to chronic stress. *Behavioural brain research*. 2023 Mar 12;441:114303.
142. Saad N, Raviv D, Mizrachi Zer-Aviv T, Akirav I. Cannabidiol Modulates Emotional Function and Brain-Derived Neurotrophic Factor Expression in Middle-Aged Female Rats Exposed to Social Isolation. *International journal of molecular sciences*. 2023 Oct 23;24(20):15492.
143. Tang Z, Ye G, Chen X, Pan M, Fu J, Fu T, Liu Q, Gao Z, Baldwin DS, Hou R. Peripheral proinflammatory cytokines in Chinese patients with generalised anxiety disorder. *Journal of affective disorders*. 2018 Jan 1;225:593-598.
144. You Z, Luo C, Zhang W, Chen Y, He J, Zhao Q, Zuo R, Wu Y. Pro- and anti-inflammatory cytokines expression in rat's brain and spleen exposed to chronic mild stress: involvement in depression. *Behavioural brain research*. 2011 Nov 20;225(1):135-41.
145. Wohleb ES, Hanke ML, Corona AW, Powell ND, Stiner LM, Bailey MT, Nelson RJ, Godbout JP, Sheridan JF. β -Adrenergic receptor antagonism

- prevents anxiety-like behavior and microglial reactivity induced by repeated social defeat. *The Journal of neuroscience*. 2011 Apr 27;31(17):6277-88.
146. Camara ML, Corrigan F, Jaehne EJ, Jawahar MC, Anscomb H, Baune BT. Effects of centrally administered etanercept on behavior, microglia, and astrocytes in mice following a peripheral immune challenge. *Neuropsychopharmacology*. 2015 Jan;40(2):502-12.
 147. Idriss, H. T., & Naismith, J. H. (2000). TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microscopy research and technique*, 50(3), 184–195.
 148. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1975 Sep;72(9):3666-70.
 149. O'Connor KA, Johnson JD, Hansen MK, Wieseler Frank JL, Maksimova E, Watkins LR, Maier SF. Peripheral and central proinflammatory cytokine response to a severe acute stressor. *Brain Research*. 2003 Nov 21;991(1-2):123-32.
 150. Ohgidani M, Kato TA, Sagata N, Hayakawa K, Shimokawa N, Sato-Kasai M, Kanba S. TNF- α from hippocampal microglia induces working memory deficits by acute stress in mice. *Brain, behavior, and immunity*. 2016 Jul;55:17-24.
 151. Kang S, Narazaki M, Metwally H, Kishimoto T. Historical overview of the interleukin-6 family cytokine. *The Journal of experimental medicine*. 2020 May 4;217(5):e20190347.
 152. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2014 Sep 4;6(10):a016295.
 153. Kelly KM, Smith JA, Mezuk B. Depression and interleukin-6 signaling: A Mendelian Randomization study. *Brain, behavior, and immunity*. 2021 Jul;95:106-114.
 154. Monje ML, Toda H, Palmer TD. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science*. 2003 Dec 5;302(5651):1760-5.

155. Vallières L, Campbell IL, Gage FH, Sawchenko PE. Reduced hippocampal neurogenesis in adult transgenic mice with chronic astrocytic production of interleukin-6. *The Journal of neuroscience*. 2002 Jan 15;22(2):486-92.
156. Wu X, Ding Z, Fan T, Wang K, Li S, Zhao J, Zhu W. Childhood social isolation causes anxiety-like behaviors via the damage of blood-brain barrier in amygdala in female mice. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2022 Aug 16;10:943067.
157. Sullens DG, Gilley K, Jensen K, Vichaya E, Dolan SL, Sekeres MJ. Social isolation induces hyperactivity and exploration in aged female mice. *PLoS One*. 2021 Feb 3;16(2):e0245355.
158. Kemp GM, Altimimi HF, Nho Y, Heir R, Klyczek A, Stellwagen D. Sustained TNF signaling is required for the synaptic and anxiety-like behavioral response to acute stress. *Molecular psychiatry*. 2022 Nov;27(11):4474-4484.
159. Henriquez AR, Snow SJ, Jackson TW, House JS, Alewel DI, Schladweiler MC, Valdez MC, Freeborn DL, Miller CN, Grindstaff R, Kodavanti PRS, Kodavanti UP. Social isolation exacerbates acute ozone inhalation induced pulmonary and systemic health outcomes. *Toxicology and applied pharmacology*. 2022 Dec 15;457:116295.
160. Miller MW, Sadeh N. Traumatic stress, oxidative stress and post-traumatic stress disorder: neurodegeneration and the accelerated-aging hypothesis. *Molecular psychiatry*. 2014 Nov;19(11):1156-62.
161. Maes M, Galecki P, Chang YS, Berk M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2011 Apr 29;35(3):676-92.
162. Inal ME, Kanbak G, Sunal E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clinica chimica acta*. 2001 Mar;305(1-2):75-80.

163. Barber AA, Bernheim F. Lipid peroxidation: its measurement, occurrence, and significance in animal tissues. *Advances in gerontological research*. 1967;2:355-403.
164. Rizvi SI, Maurya PK. Markers of oxidative stress in erythrocytes during aging in humans. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007 Apr;1100:373-82.
165. Maruyama W, Shaomoto-Nagai M, Kato Y, Hisaka S, Osawa T, Naoi M. Role of lipid peroxide in the neurodegenerative disorders. *Sub-cellular biochemistry*. 2014;77:127-36.
166. Palta P, Samuel LJ, Miller ER 3rd, Szanton SL. Depression and oxidative stress: results from a meta-analysis of observational studies. *Psychosomatic medicine*. 2014 Jan;76(1):12-9.
167. Gu F, Chauhan V, Chauhan A. Glutathione redox imbalance in brain disorders. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2015 Jan;18(1):89-95.
168. Németh I, Orvos H, Boda D. Blood glutathione redox status in gestational hypertension. *Free radical biology & medicine*. 2001 Apr 1;30(7):715-21.
169. Kumar P, Maurya PK. L-cysteine efflux in erythrocytes as a function of human age: correlation with reduced glutathione and total anti-oxidant potential. *Rejuvenation Research*. 2013 Jun;16(3):179-84.
170. Schairer DO, Chouake JS, Kutner AJ, Makdisi J, Nosanchuk JD, Friedman AJ. Evaluation of the antibiotic properties of glutathione. *Journal of drugs in dermatology*. 2013 Nov;12(11):1272-7.
171. Lapidus KA, Gabbay V, Mao X, Johnson A, Murrough JW, Mathew SJ, Shungu DC. In vivo (1)H MRS study of potential associations between glutathione, oxidative stress and anhedonia in major depressive disorder. *Neuroscience letters*. 2014 May 21;569:74-9.
172. Morris G, Anderson G, Dean O, Berk M, Galecki P, Martin-Subero M, Maes M. The glutathione system: a new drug target in neuroimmune disorders. *Molecular neurobiology*. 2014 Dec;50(3):1059-84. ,
173. Zlatković J, Todorović N, Bošković M, Pajović SB, Demajo M, Filipović D. Different susceptibility of prefrontal cortex and hippocampus to oxidative

- stress following chronic social isolation stress. *Molecular and cellular biochemistry*. 2014 Aug;393(1-2):43-57.
174. Madden KS, Szpunar MJ, Brown EB. Early impact of social isolation and breast tumor progression in mice. *Brain, behavior, and immunity*. 2013 Mar;30 Suppl(Suppl):S135-41.
 175. Baghaei Naeini F, Hassanpour S, Asghari A. Resveratrol exerts anxiolytic-like effects through anti-inflammatory and antioxidant activities in rats exposed to chronic social isolation. *Behavioural brain research*. 2023 Feb 13;438:114201.
 176. Woodhouse S.S., Dykas M.J., Cassidy J. Loneliness and peer relations in adolescence. *Social Development*. 2012;21:273–293.
 177. Tan T, Wang W, Liu T, Zhong P, Conrow-Graham M, Tian X, Yan Z. Neural circuits and activity dynamics underlying sex-specific effects of chronic social isolation stress. *Cell reports*. 2021 Mar 23;34(12):108874.
 178. Sun L, Min L, Zhou H, Li M, Shao F, Wang W. Adolescent social isolation affects schizophrenia-like behavior and astrocyte biomarkers in the PFC of adult rats. *Behavioural brain research*. 2017 Aug 30;333:258-266.
 179. Wang ZJ, Shwani T, Liu J, Zhong P, Yang F, Schatz K, Zhang F, Pralle A, Yan Z. Molecular and cellular mechanisms for differential effects of chronic social isolation stress in males and females. *Molecular psychiatry*. 2022 Jul;27(7):3056-3068.
 180. Spear LP. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2000 Jun;24(4):417-63.
 181. Amaral DG, Witter MP. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*. 1995;69(3):237-67.
 182. Hueston CM, Cryan JF, Nolan YM. Adolescent social isolation stress unmasks the combined effects of adolescent exercise and adult inflammation on hippocampal neurogenesis and behavior. *Neuroscience*. 2017 Dec 4;365:226-236.
 183. Amiri S, Haj-Mirzaian A, Amini-Khoei H, Shirzadian A, Rahimi-Balaei M, Razmi A, Bergen H, Rastegar M, Kordjazy N, Haj-Mirzaian A, Ejtemai-Mehr

- S, Dehpour AR. Lithium attenuates the proconvulsant effect of adolescent social isolation stress via involvement of the nitrenergic system. *Epilepsy & Behavior*. 2016 Aug;61:6-13.
184. Wang HL, Sun YX, Liu X, Wang H, Ma YN, Su YA, Li JT, Si TM. Adolescent stress increases depression-like behaviors and alters the excitatory-inhibitory balance in aged mice. *Chinese medical journal*. 2019 Jul 20;132(14):1689-1699.
 185. Schepici G, Bramanti P, Mazzon E. Efficacy of Sulforaphane in Neurodegenerative Diseases. *International journal of molecular sciences*. 2020 Nov 16;21(22):8637.
 186. Uddin MS, Mamun AA, Jakaria M, Thangapandiyan S, Ahmad J, Rahman MA, Mathew B, Abdel-Daim MM, Aleya L. Emerging promise of sulforaphane-mediated Nrf2 signaling cascade against neurological disorders. *The Science of the total environment*. 2020 Mar 10;707:135624.
 187. Egner PA, Chen JG, Wang JB, Wu Y, Sun Y, Lu JH, Zhu J, Zhang YH, Chen YS, Friesen MD, Jacobson LP, Muñoz A, Ng D, Qian GS, Zhu YR, Chen TY, Botting NP, Zhang Q, Fahey JW, Talalay P, Groopman JD, Kensler TW. Bioavailability of Sulforaphane from two broccoli sprout beverages: results of a short-term, cross-over clinical trial in Qidong, China. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*. 2011 Mar;4(3):384-95.
 188. Zhang Y, Tang L. Discovery and development of sulforaphane as a cancer chemopreventive phytochemical. *Acta pharmacologica Sinica*. 2007 Sep;28(9):1343-54.
 189. Munday R, Mhaweche-Fauceglia P, Munday CM, Paonessa JD, Tang L, Munday JS, Lister C, Wilson P, Fahey JW, Davis W, Zhang Y. Inhibition of urinary bladder carcinogenesis by broccoli sprouts. *Cancer Research*. 2008 Mar 1;68(5):1593-600.
 190. Kassahun K, Davis M, Hu P, Martin B, Baillie T. Biotransformation of the naturally occurring isothiocyanate sulforaphane in the rat: identification of phase I metabolites and glutathione conjugates. *Chemical research in toxicology*. 1997 Nov;10(11):1228-33.

191. Conaway CC, Krzeminski J, Amin S, Chung FL. Decomposition rates of isothiocyanate conjugates determine their activity as inhibitors of cytochrome p450 enzymes. *Chemical research in toxicology*. 2001 Sep;14(9):1170-6.
192. Liebman SE, Le TH. Eat Your Broccoli: Oxidative Stress, NRF2, and Sulforaphane in Chronic Kidney Disease. *Nutrients*. 2021 Jan 18;13(1):266.
193. He F, Ru X, Wen T. NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *International journal of molecular sciences*. 2020 Jul 6;21(13):4777.
194. Yagishita Y, Fahey JW, Dinkova-Kostova AT, Kensler TW. Broccoli or Sulforaphane: Is It the Source or Dose That Matters? *Molecules*. 2019 Oct 6;24(19):3593.
195. Houghton CA. Sulforaphane: Its "Coming of Age" as a Clinically Relevant Nutraceutical in the Prevention and Treatment of Chronic Disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2019 Oct 14;2019:2716870.
196. Hanlon N, Coldham N, Gielbert A, Kuhnert N, Sauer MJ, King LJ, Ioannides C. Absolute bioavailability and dose-dependent pharmacokinetic behaviour of dietary doses of the chemopreventive isothiocyanate sulforaphane in rat. *The British journal of nutrition*. 2008 Mar;99(3):559-64.
197. Cha DS, Carmona NE, Subramaniapillai M, Mansur RB, Lee Y, Hon Lee J ve ark. Cognitive impairment as measured by the THINC-integrated tool (THINCit): Association with psychosocial function in major depressive disorder. *Journal of affective disorders*. 2017; 222: 14–20.
198. Pechtel P, Pizzagalli DA. Effects of early life stress on cognitive and affective function: An integrated review of human literature. *Psychopharmacology (Berl)*. 2011; 214(1): 55–70.
199. Park HS, Hwang ES, Choi GY, Kim HB, Park KS, Sul JY, Hwang Y, Choi GW, Kim BI, Park H, Maeng S, Park JH. Sulforaphane enhances long-term potentiation and ameliorate scopolamine-induced memory impairment. *Physiology & behavior*. 2021 Sep 1;238:113467.
200. Chen YC, Huang YH, Song L, Tong XH, Li JF, Lin S, Chen X, Zhang JC, Zhang ZL, Zeng QY. Lipopolysaccharide-induced endotoxaemia during adolescence promotes stress vulnerability in adult mice via deregulation of

- nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in the medial prefrontal cortex. *Psychopharmacology (Berl)*. 2023 Apr;240(4):713-724.
201. Yao W, Lin S, Su J, Cao Q, Chen Y, Chen J, Zhang Z, Hashimoto K, Qi Q, Zhang JC. Activation of BDNF by transcription factor Nrf2 contributes to antidepressant-like actions in rodents. *Translational psychiatry*. 2021 Feb 24;11(1):140.
 202. Kim J, Lee S, Choi BR, Yang H, Hwang Y, Park JH, LaFerla FM, Han JS, Lee KW, Kim J. Sulforaphane epigenetically enhances neuronal BDNF expression and TrkB signaling pathways. *Molecular nutrition & food research*. 2017 Feb;61(2).
 203. Gao J, Xiong B, Zhang B, Li S, Huang N, Zhan G, Jiang R, Yang L, Wu Y, Miao L, Zhu B, Yang C, Luo A. Sulforaphane Alleviates Lipopolysaccharide-induced Spatial Learning and Memory Dysfunction in Mice: The Role of BDNF-mTOR Signaling Pathway. *Neuroscience*. 2018 Sep 15;388:357-366.
 204. Yao W, Zhang JC, Ishima T, Dong C, Yang C, Ren Q, Ma M, Han M, Wu J, Suganuma H, Ushida Y, Yamamoto M, Hashimoto K. Role of Keap1-Nrf2 signaling in depression and dietary intake of glucoraphanin confers stress resilience in mice. *Scientific reports*. 2016 Jul 29;6:30659.
 205. Öztürk ÇÇ, Ataoğlu SN, Arvas A, Tokol H, Yaprak H, Gürel S, Levent HN, Akakın D, Şahin A, Çakır B, Kasımay Ö. Weekend warrior exercise model for protection from chronic mild stress-induced depression and ongoing cognitive impairment. *Acta neurobiologiae experimentalis*. 2023;83(1):10-24.
 206. Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. *Methods in Molecular Biology*. 2019;1916:99-103.
 207. Can A, Dao DT, Terrillion CE, Piantadosi SC, Bhat S, Gould TD. The tail suspension test. *Journal of Visualized Experiments*. 2012 Jan 28;(59):e3769.
 208. Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *European Journal of Pharmacology*. 1978 Feb 15;47(4):379-91.

209. Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. "Behavioural despair" in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine. *European Journal of Pharmacology*. 1978 Oct 1;51(3):291-4.
210. Morris RGM. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation*. 1981;12(2):239-60.
211. Bromley-Brits K, Deng Y, Song W. Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice. *Journal of Visualized Experiments*. 2011 Jul 20;(53):2920.
212. McDonald RJ, Hong NS, Devan BD. The challenges of understanding mammalian cognition and memory-based behaviours: an interactive learning and memory systems approach. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2004 Nov;28(7):719-45.
213. Othman MZ, Hassan Z, Che Has AT. Morris water maze: a versatile and pertinent tool for assessing spatial learning and memory. *Experimental Animals*. 2022 Aug 5;71(3):264-280.
214. Farbstein D, Hollander N, Peled O, Apter A, Fennig S, Haberman Y, Gitman H, Yaniv I, Shkalim V, Pick CG, Benaroya-Milshtein N. Social isolation in mice: behavior, immunity, and tumor growth. *Stress*. 2021 Mar;24(2):229-238.
215. Rodgers RJ, Dalvi A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neuroscience of Biobehavioural Reviews*. 1997;21(6):801-10.
216. Dang R, Wang M, Li X, Wang H, Liu L, Wu Q, Zhao J, Ji P, Zhong L, Licinio J, Xie P. Edaravone ameliorates depressive and anxiety-like behaviors via Sirt1/Nrf2/HO-1/Gpx4 pathway. *Journal of neuroinflammation*. 2022 Feb 7;19(1):41.
217. Detke MJ, Rickels M, Lucki I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology*. 1995 Sep;121(1):66-72.
218. Detke MJ, Lucki I. Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. *Behavioural brain research*. 1996;73(1-2):43-6.

219. Zain MA, Pandey V, Majeed ABA, Wong WF, Mohamed Z. Chronic restraint stress impairs sociability but not social recognition and spatial memory in C57BL/6J mice. *Experimental Animals*. 2019 Feb 26;68(1):113-124.
220. Jianhua F, Wei W, Xiaomei L, Shao-Hui W. Chronic social defeat stress leads to changes of behaviour and memory-associated proteins of young mice. *Behavioural brain research*. 2017 Jan 1;316:136-144.
221. Tang R, Cao QQ, Hu SW, He LJ, Du PF, Chen G, Fu R, Xiao F, Sun YR, Zhang JC, Qi Q. Sulforaphane activates anti-inflammatory microglia, modulating stress resilience associated with BDNF transcription. *Acta pharmacologica Sinica*. 2022 Apr;43(4):829-839.
222. Townsend BE, Johnson RW. Sulforaphane induces Nrf2 target genes and attenuates inflammatory gene expression in microglia from brain of young adult and aged mice. *Experimental gerontology*. 2016 Jan;73:42-8.
223. Santín-Márquez R, Hernández-Arciga U, Salas-Venegas V, Toledo-Pérez R, López-Cervantes SP, Librado-Osorio R, Luna-López A, López-Díazguerrero NE, Gómez-González B, Königsberg M. Long-term sulforaphane-treatment restores redox homeostasis and prevents cognitive decline in middle-aged female and male rats, but cannot revert previous damage in old animals. *Biogerontology*. 2022 Oct;23(5):587-613.
224. Zhang R, Zhang J, Fang L, Li X, Zhao Y, Shi W, An L. Neuroprotective effects of sulforaphane on cholinergic neurons in mice with Alzheimer's disease-like lesions. *International journal of molecular sciences*. 2014 Aug 18;15(8):14396-410.
225. Colyn L, Venzala E, Marco S, Perez-Otaño I, Tordera RM. Chronic social defeat stress induces sustained synaptic structural changes in the prefrontal cortex and amygdala. *Behavioural brain research*. 2019 Nov 5;373:112079.
226. Song MK, Lee JH, Kim YJ. Effect of chronic handling and social isolation on emotion and cognition in adolescent rats. *Physiology & behavior*. 2021 Aug 1;237:113440.
227. Maggio N, Segal M. Persistent changes in ability to express long-term potentiation/depression in the rat hippocampus after juvenile/adult stress. *Biological psychiatry*. 2011 Apr 15;69(8):748-53.

8. EKLER

EK 1: HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURULU KARARI

 DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

Gündem No/Toplantı No/Yıl : 02/04/2023 35340 (kurul: 0000-232-4102034)

Toplantı Tarihi : 22 Şubat 2023

Sayın, Doç. Dr. Ayfer DAYI
DEÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

13/2023 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Kronik Sosyal İzolasyon Stresine Maruz kalan Adölesan Erkek Farelerde Sülfonafanin, Bilişsel Fonksiyonlar, Davranış ve Hipokampus - Prefrontal Korteks BDNF, TNF- α , IL/6, MDA, Glutasyon Seviyelerine Etkileri" isimli; Yeşim Cemre ATARÖĞLU, Müge KIRAY, Burcu AÇIKGÖZ, Bahar DALKIRAN'ın araştırmacı olduğu, 35 adet Balb/C erkek fare talep edilen projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

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

EK 2: ARBİS ÖZGEÇMİŞ



YEŞİM CEMRE ATAROĞLU

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi

Telefon

E-posta

İnternet Sayfası

Öğrenim Bilgileri

01 Eylül 2021 - Şu Anda (3 yıl)

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

Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.81 / 4.0

16 Ağustos 2016 - 22 Temmuz 2020 (4 yıl)

Lisans, Anadal/Normal Öğretim, TRAKYA ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ, BESLENME VE DİYETETİK PR.

Diploma Numarası: 355

Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.27 / 4.0

Yabancı Dil Bilgileri

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

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Görev	ARDEB	BİDEB	BİLİM TOPLUM	UİDB	TEYDEB	Toplam
Hakemlik/Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0
Moderatorlük Sayısı	0	0	0	0	0	0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0
Raportörlük Sayısı	0	0	0	0	0	0
Katılmadığı Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0

