

T.C.
ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

KRONİK SEREBRAL HİPOPERFÜZYON OLUŞTURULAN
OVEREKTOMİZE DIŞI SIÇANLARDA
MİNERALOKORTİKOID RESEPTÖR ANTAGONİSTİNİN
HİPOKAMPAL FONKSİYONLAR ÜZERİNE ETKİLERİ

MERYEM ERGENÇ

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. HALE SAYAN ÖZAÇMAK

ZONGULDAK

2025

T.C.
ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

**KRONİK SEREBRAL HİPOPERFÜZYON OLUŞTURULAN
OVEREKTOMİZE DİŞİ SIÇANLARDA
MİNERALOKORTİKOİD RESEPTÖR ANTAGONİSTİNİN
HİPOKAMPAL FONKSİYONLAR ÜZERİNE ETKİLERİ**

MERYEM ERGENÇ

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. HALE SAYAN ÖZAÇMAK

Bu Tez Çalışması Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Tarafından Desteklenmiştir (BAP No: 2020-2625-9946-02)

ZONGULDAK

2025

ÖNSÖZ

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı'nda sürdürdüğüm doktora eğitimim sürecinde ve tez projemin her aşamasında, bilimsel desteklerinin yanı sıra anlayışlarını, sevgilerini, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen sayın hocalarıma; başta öğrencisi olmaktan onur duyduğum çok değerli anabilim dalı başkanı ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Hale SAYAN ÖZAÇMAK'a bilgi ve tecrübeleriyle her daim desteğini esirgemeyen kıymetli hocalarım Sayın Prof. Dr. Veysel Haktan ÖZAÇMAK'a ve Sayın Doç. Dr. İnci TURAN'a en içten teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmamın histopatolojik değerlendirmesinde desteklerini sunan Sayın Prof. Dr. Figen BARUT'a, istatistiksel değerlendirmelerinde bana yardımcı olan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Çağatay BÜYÜKUYSAL'a ve deney aşamasında desteklerini aldığım Uzm. Dr. Nazan ELMA, Öğr. Gör. Salih ERDEM'e, Vet. Hekim Candan SAĞLAM'a ve eğitimim boyunca aynı ortamı paylaştığım tüm asistan arkadaşlarıma ve dekanlık personeline teşekkürlerimi sunarım.

Tüm bu süreçte anlayışıyla, sabrıyla, sevgisiyle ve saygısıyla beni her zaman motive eden, bana inanan, destekleyen sevgili eşim Op. Dr. Ekrem ERGENÇ'e, varlıklarında huzur bulduğum çocuklarım Eren ve Beren'e teşekkür ederim. İyi ki varsınız...

Meryem ERGENÇ
ZONGULDAK, 2025

ÖZET

Meryem ERGENÇ, Kronik Serebral Hipoperfüzyon Oluşturulan Overektomize Dişi Sıçanlarda Mineralokortikoid Reseptör Antagonistinin Hipokampal Fonksiyonlar Üzerine Etkileri, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Zonguldak, 2025.

Kronik serebral hipoperfüzyon (KSH), yaşlanan nüfusla birlikte insidansı giderek artan ve özellikle postmenopozal kadınları daha çok etkileyen vasküler demansın esas nedenidir ve bilişsel bozukluk için önemli bir predispozan faktördür. Mevcut çalışmada KSH’de hipokampal fonksiyonlardaki bozulmaya farklı dozlarda uygulanan mineralokortikoid reseptör antagonisti spironolaktonun etkisini araştırmayı, olası etki mekanizmalarını açıklamayı amaçladık. Çalışmamızda ağırlıkları 130-190gr arasında değişen 2 aylık 48 adet dişi WistarAlbino cinsi sıçan kullanıldı. Sıçanlar vücut ağırlıkları dikkate alınarak rastgele ve her grupta 12 sıçan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Bu gruplar 1) Kontrol, 2) KSH, 3) KSH+SPI25, 4) KSH+SPI50. Tüm hayvanların cerrahi olarak bilateral over dokuları çıkarıldı ve menopozun yerleşmesi için 5 hafta beklenildi. KSH modifiye bir model kullanılarak önce sağ, bir hafta sonra sol ortak karotis arterlerin ligasyonu ile oluşturuldu. Spironolakton 25mg/kg ve 50mg/kg olacak şekilde sırasıyla 3. ve 4. grup hayvanlarına oral gavaj yoluyla 21 gün boyunca uygulandı. KSH’nin ve spironolaktonun öğrenme ve hafıza performansları üzerindeki etkilerini değerlendirmek için Morris su labirenti testi kullanıldı. Deney sonunda hayvanların kan basınçlarına ve kalp hızlarına bakıldı ve feda edildi. Hipokampal CA1 ve CA3 bölgelerindeki sağlam nöron sayıları histopatolojik H&E boyama ile uzman bir patolog tarafından değerlendirildi. Ayrıca beyin dokusundan MDA, protein karbonilleri, katalaz, GSH düzeyleri ve hipokampal dokudan NRF2, IL-1B, TNF-A, NLRP3, JAK2, STAT3, BDNF, CREB, CaMKII, GLT-1, AChE düzeyleri belirlendi. Morris su labirenti testi sonuçlarına bakıldığında öğrenmenin göstergesi olan platformu bulma süresinin KSH ile uzadığı ve hafızanın göstergesi olan son gün hedef kadranda geçirilen sürenin KSH ile kısaldığı gözlemlendi. Spironolakton tedavisinin KSH’nin öğrenme ve hafıza üzerindeki olumsuz etkilerini azalttığı, beyin MDA ve protein karbonilleri düzeylerini azaltırken katalaz ve GSH düzeylerinde artışa neden olduğu görüldü. Ayrıca hipokampal NRF2, CREB, CaMKII düzeylerinde artışa GLT-1 ve AChE düzeylerinde azalmaya neden olduğu belirlendi. IL-1 β , TNF- α , NLRP3, JAK2, STAT3, BDNF düzeylerinde verilen her iki dozun da etki etmediği gözlemlendi.

Mevcut çalışmadan elde ettiğimiz bulgulara göre spironolaktonun özellikle 50mg/kg dozunun kan basıncını düşürmedeki etkisinden bağımsız olarak oksidatif hasarı, sinaptik disfonksiyonu, nörotransmisyon sistemlerdeki bozulmayı iyileştirebileceğini göstermiştir. Ayrıca hem CA1 hem de CA3 bölgelerindeki sağlam nöron sayılarını ve hipokampal fonksiyonları koruyarak bilişsel düşüşü hafifletmede etkili olabileceğini göstermektedir. Bu alışma literatürdeki KSH'de hipokampal fonksiyonlardaki bozulmaya ve bilişsel düşüşe spironolaktonun etkilerini ve olası mekanizmaları inceleyen ilk çalışmadır.

Anahtar Kelimeler: Kronik serebral hipoperfüzyon, Menopoz, Oksidatif hasar, AChE, GLT-1, CREB, CaMKII, Spironolakton, Hipokampüs

ABSTRACT

Meryem ERGENÇ, The Effects of Mineralocorticoid Receptor Antagonist on Hippocampal Functions in Ovariectomized Female Rats with Chronic Cerebral Hypoperfusion, Zonguldak Bülent Ecevit University, Institute of Health Sciences, Department of Physiology, PhD Thesis, Zonguldak, 2025.

Chronic cerebral hypoperfusion (CCH) is a primary cause of vascular dementia, the incidence of which is increasing in the aging population, particularly affecting postmenopausal women. It is considered a major predisposing factor for cognitive impairment. The aim of the present study was to investigate the effects of the mineralocorticoid receptor antagonist spironolactone, administered at different doses, on hippocampal dysfunction induced by CCH, and to elucidate possible underlying mechanisms. A total of 48 female Wistar Albino rats (2 months old, weighing 130–190 g) were used. Based on body weight, the rats were randomly divided into four groups with 12 rats in each: (1) CONTROL, (2) CCH, (3) CCH+SPI25, and (4) CCH+SPI50. All animals underwent bilateral ovariectomy to induce menopause, and were kept for 5 weeks post-surgery to allow menopausal state to stabilize. CCH was induced using a modified two-step procedure by ligating the right common carotid artery followed one week later by the left. Spironolactone was administered orally by gavage at doses of 25 mg/kg and 50 mg/kg daily for 21 days in groups 3 and 4, respectively. To assess the effects of CCH and spironolactone on learning and memory, the Morris water maze test was employed. At the end of the experiment, blood pressure and heart rate measurements were taken, and the animals were sacrificed. Neuronal density in the CA1 and CA3 regions of the hippocampus was evaluated by a pathologist using hematoxylin and eosin (H&E) staining. Additionally, biochemical analyses were conducted to determine levels of malondialdehyde (MDA), protein carbonyls, catalase, and glutathione (GSH) in brain tissue, as well as hippocampal levels of NRF2, IL-1 β , TNF- α , NLRP3, JAK2, STAT3, BDNF, CREB, CaMKII, GLT-1, and AChE.

Results from the Morris water maze test revealed prolonged latency to find the platform and reduced time spent in the target quadrant in CCH animals, indicating impaired learning and memory. Spironolactone treatment ameliorated these cognitive deficits. It significantly reduced MDA and protein carbonyl levels, while increasing catalase and GSH levels. Furthermore, spironolactone elevated hippocampal levels of NRF2, CREB, and CaMKII, while decreasing GLT-1 and AChE levels. No significant

changes were observed in IL-1 β , TNF- α , NLRP3, JAK2, STAT3, or BDNF levels with either dose. Findings from this study suggest that especially the 50 mg/kg dose of spironolactone may alleviate oxidative damage, synaptic dysfunction, and impairments in neurotransmission systems independently of its blood pressure-lowering effects. It also appears to preserve the number of viable neurons in both CA1 and CA3 regions, thereby enhancing hippocampal function and mitigating cognitive decline. This is the first study in the literature to examine the potential effects and mechanisms of spironolactone on hippocampal dysfunction and cognitive deterioration in a CCH model.

Keywords: Chronic cerebral hypoperfusion, Menopause, Oxidative damage, AChE, GLT-1, CREB, CaMKII, Spironolactone, Hippocampus

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL ve ONAY:	iii
ÖNSÖZ	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
ŞEKİL DİZİNİ	xv
TABLO DİZİNİ.....	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Kronik Serebral Hipoperfüzyon ve Vasküler Demans	5
2.2. Kronik Serebral Hipoperfüzyon ve Sıçan Modeli.....	7
2.3. Kronik Serebral Hipoperfüzyon ve Patofizyoloji	9
2.2.1. Kronik serebral hipoperfüzyon ve oksidatif stres	10
2.2.1.1. Kronik serebral hipoperfüzyon ve lipid peroksidasyonu	12
2.2.1.2. Kronik serebral hipoperfüzyon ve protein oksidasyonu	13
2.2.1.3. Kronik serebral hipoperfüzyon ve antioksidan sistem	13
2.2.1.4. Kronik serebral hipoperfüzyon ve Nrf2	14
2.2.2. Kronik serebral hipoperfüzyon ve nöroinflamasyon.....	16
2.2.2.1. Kronik serebral hipoperfüzyon ve NLRP3	18
2.2.2.2. Kronik serebral hipoperfüzyon ve JAK/STAT yolağı	20
2.2.3. KSH ve sinaptik disfonksiyon.....	21
2.2.3.1. Kronik serebral hipoperfüzyon ve BDNF	22
2.2.3.2. Kronik serebral hipoperfüzyon ve CREB	24
2.2.3.3. Kronik serebral hipoperfüzyon ve CaMKII	24
2.2.4. Kronik serebral hipoperfüzyon ve glutamaterjik sistem	26
2.2.5. Kronik serebral hipoperfüzyon ve kolinerjik sistem.....	29
2.3. Hipokampusün Anatomik Yapısı ve Fonksiyonel Bağlantıları	32
2.3.1. KSH ve hipokampal fonksiyonlar	35
2.4. Menopoz.....	37

2.4.1. Menopoz fizyolojisi	38
2.4.2. Kronik serebral hipoperfüzyon ve menopoz	41
2.5. Aldosteron ve Mineralokortikoid Reseptörleri.....	42
2.6. Spironolakton	45
3. GEREÇ VE YÖNTEM	48
3.1. Deney Hayvanları.....	48
3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması	48
3.2.1. Cerrahi girişim	50
3.2.1.1. Cerrahi menopoz modelinin oluşturulması	50
3.2.1.2. KSH oluşturulması	51
3.3. Vücut Ağırlıklarının Ölçülmesi.....	52
3.4. Morris Su Labirenti	52
3.5. Kalp Hızı ve Ortalama Arteriyel Kan Basıncı Ölçümü.....	53
3.6. Doku Örneklerinin Alınması	54
3.7. Değerlendirilen Parametreler	54
3.7.1. NRF2, NLRP3, IL-1 β , TNF-a, JAK2, STAT3, CREB, CaMKII, GLT-1, ve BDNF düzeylerinin belirlenmesi	54
3.7.2. 0.01M, pH=7.4 fosfat tampon solüsyonunun (PBS) hazırlanması	56
3.7.3. Doku homojenatlarının hazırlanması	56
3.7.4. Lipid peroksidasyonunun, protein karbonil gruplarının ve katalaz enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	57
3.7.4.1. İçerisinde 140mM KCl bulunan 20mM, pH=7.4 PBS hazırlanması	57
3.7.4.2. Protein miktarının belirlenmesi	58
3.7.4.3. MDA düzeyinin belirlenmesi	59
3.7.4.4. Protein karbonil gruplarının belirlenmesi	60
3.7.4.5. Katalaz enzim aktivitesinin belirlenmesi	61
3.7.5. GSH düzeyinin belirlenmesi	62
3.7.6. AChE enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	62
3.8. Histopatolojik İnceleme	63
3.9. İstatistiksel Analiz	64
4. BULGULAR.....	65
4.1. Vücut Ağırlığı Sonuçları	65
4.2. Beyin/Vücut Ağırlığı Oranı Sonuçları	68
4.3. Kan Basıncı ve Kalp Hızı Sonuçları	69

4.4. Morris Su Labirent Testi Sonuçları	71
4.4.1. Platformu bulma süreleri.....	71
4.4.2. Probe trail sonuçları	73
4.5. Oksidatif Stres Parametreleri Sonuçları	74
4.5.1. Beyin Dokusu Protein Miktar Tayini Standart Eğrisi	74
4.5.2. Beyin MDA sonuçları	75
4.5.3. Beyin protein karbonilleri sonuçları.....	77
4.5.4. Beyin katalaz aktivitesi sonuçları.....	78
4.5.5. GSH sonuçları	80
4.6. Hipokampus Nrf2 Sonuçları	82
4.7. Hipokampus TNF- α Sonuçları	83
4.8. Hipokampus IL-1 β Sonuçları.....	84
4.9. Hipokampus NLRP 3 Sonuçları.....	85
4.10. Hipokampus JAK 2 Sonuçları.....	86
4.11. Hipokampus STAT3 Sonuçları.....	88
4.12. Hipokampus BDNF Sonuçları	89
4.13. Hipokampus CREB Sonuçları.....	90
4.14. Hipokampus CaMKII Sonuçları	92
4.15. Hipokampus GLT-1 Sonuçları.....	94
4.16. Hipokampus AChE Aktivitesi Sonuçları.....	96
4.17. Histopatolojik Sonuçlar.....	98
4.17.1. Hipokampal CA1 ve CA3 Bölgelerindeki Sağlam Nöron Sayılarının Sonuçları.....	98
4.17.2. Hipokampal CA1 ve CA3 bölgesinin histopatolojik görünümü.....	102
5. TARTIŞMA	107
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	119
7. KAYNAKLAR.....	120
8. EKLER	139
Ek 1: Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı	139
9. ÖZGEÇMİŞ.....	140

SİMGELER VE KISALTMALAR

2VO	2 Damar Oklüzyonu
4-HNE	4-Hidroksi-2-Nonenal
8-OHdG	8-Hidroksi-2-Deoksiguanozin
AA	Askorbik Asit
ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolinesteraz
AH	Alzheimer Hastalığı
ALS	Amyotrofik Lateral Skleroz
AMPA	A-Amino-3-Hidroksi-5-Metil-4-İzoksazolpropiyonik Asit
ACE	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
AP-1	Aktivatör Protein-1
ARE	Antioksidan Yanıt Elemanı
Aβ	Amiloid Beta
Bach1	BTB Domain ve CNC Homolog 1
BCCAO	Bilateral Ortak Karotis Arterlerin Oklüzyonu
BDNF	Beyinden Türetilen Nörotrofik Faktör
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
CA	Cornu Ammonis
CaMKII	Ca ²⁺ / Kalmodulin Bağımlı Protein Kinaz II
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
CAT	Katalaz
c-Fos	Hücrel Fos Proto-Onkojeni
ChAT	Kolin Asetiltransferaz
COX-2	Siklooksijenaz-2
CREB	cAMP Yanıt Elemanı Bağlayıcı Proteini
DM	Diabetes Mellitus
E1	Östron
E2	Östradiol
E3	Östriol
ERK	Ekstrasellüler Sinyal Düzenleyici Kinaz
FOXO1	Forkhead Kutusu Protein O1
FSH	Folikül Stimulan Hormon

G6PD	Glikoz-6-Fosfat Dehidrogenaz
GABA	Gama Aminobütirik Asit
GLAST	Glutamat / Aspartat Taşıyıcı
GLT-1	Astrositik Glutamat Taşıyıcı-1
GPx	Glutasyon Peroksidaz
GSH	İndirgenmiş Glutasyon
GST	Glutasyon-S-Transferaz
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
HO-1	Heme Oksijenaz-1
IFN-γ	İnterferon Gama
IL	İnterlökin
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
JAK	Janus kinaz
Jun	Hücresel Jun Proto-Onkojeni
KBB	Kan Beyin Bariyeri
Keap1	Kelch Benzeri ECH ile İlişkili Protein 1
KSH	Kronik serebral hipoperfüzyon
LTP	Uzun Süreli Potansiyasyon
MAP-2	Mikrotübül ile İlişkili Protein 2
MAPK	Mitojen-Aktive Protein Kinazı
MBP	Miyelin Bazık Proteini
MDA	Malondialdehit
MMP-9	Matriks Metalloproteinaz-9
MR	Mineralokortikoid Reseptör
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NF-κB	Nükleer Faktör Kappa B
NGF	Sinir Büyüme Faktörü
NLRP3	NOD Benzeri Reseptör Ailesi Pirin Domain İçeren Protein 3
NMDA	N-Metil-D-Aspartat
NOD	Nükleotid Bağlayıcı Oligomerizasyon Alanı
NQO1	NAD(P)H: Kinon Oksidoredüktaz 1
Nrf2	Nükleer Faktör Eritroid 2 ile İlişkili Faktör 2
O₂⁻	Süperoksit Anyonları

-OH	Hidroksil Radikali
OVX	Overektomi
ox-LDL	Okside Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler
PD	Parkinson Hastalığı
PFC	Prefrontal Korteks
PI3K	Fosfoinozid 3-Kinaz
PSD-95	Postsinaptik Yoğunluk Proteinlerinden
RAAS	Renin, Anjiyotensin, Aldosteron Sistemi
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SKA	Serebral Kan Akımı
SOD	Süperoksit Dismutaz
STAT	Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü
StRE	DNA'daki Stres Yanıt Elemanı
TCA	Trikarboksilik Asit
TNF-α	Tümör Nekroz Faktörü α
TrkB	Tropomiyosin Reseptör Kinaz B
VaD	Vasküler Demans
VBB	Vasküler Bilişsel Bozukluk
VGLUT	Veziküler Glutamat Taşıyıcıları

ŞEKİL DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1: Demansla ilişkili Farklı Serebrovasküler Patolojiler.	7
2: Kemirgenlerde vasküler bilişsel bozukluk modellerinin şematik diyagramı.....	8
3: KSH kaynaklı biyokimyasal değişiklikler ve VaD'deki fizyopatolojik mekanizmalar.	10
4: Antioksidan enzimlerin izlediği mekanizma.....	14
5: Nrf2 sinyal yolağı	15
6: Kanonik NLRP3 inflammasom aktivasyonu, iki aşamalı bir modelle açıklanır: ..	19
7: JAK2/STAT3 sinyal yolu, sitokinlerin reseptörlerine bağlanmasıyla tetiklenir.	20
8: BDNF/TrkB sinyal yolağı.	23
9: CaMKII ve NMDAR bağımlı bilişsel işlevlere katkısı.....	26
10: Glutamat-glutamin döngüsü.....	28
11: İnsan beynindeki ana glutamaterjik, kolinerjik ve dopaminerjik nörodevrelerin şeması ve bunların birleşmesi.	30
12: Asetilkolin nörotransmisyonunu içeren biyolojik yönlerin şematik gösterimi	31
13: Hipokampus ve öğrenme ve bellekte yer alan beyin bölgelerinin başlıca anatomisi.	33
14: Hipokampüse ait tabakalar ve bilginin işlenmesinde rol oynayan trisinaptik yol	34
15: Hipotalamo-pituiter-ovaryan aksının şematik gösterimi.....	38
16: Beyin bölgelerinde östrojen ve progesteron reseptörlerin dağılımı	40
17: Aldosteron ve inflamatuvar mediatörlerin üretimi.....	44
18: Deney prosedürü şekilsel özeti.	49
19: Over dokusunun çıkarılması.	50
20: Sol karotis arterin ligasyonu.	52
21: a: İlk 5 gün öğrenme aşamasında labirentin görünümü. b: Son gün test aşamasında labirentin görünümü.	53
22: Stop solüsyonu eklerken anlık gerçekleşen renk değişimi.....	55

23: Protein miktar tayini için standart eğri.....	57
24: Tüm grupların haftalık vücut ağırlıklarındaki değişimin grup içi karşılaştırmaları.....	67
25: Tüm grupların haftalık vücut ağırlıklarındaki yüzde değişimin gruplar arası karşılaştırmaları.....	68
26: Tüm grupların beyin ağırlıklarının vücut ağırlıklarına yüzde oranlarının karşılaştırmaları.....	69
27: Kan basınçlarının gruplar arası karşılaştırmaları.	70
28: Kalp hızının gruplar arası karşılaştırmaları.....	70
29: Tüm grupların grup içi günlük platformu bulma sürelerinin karşılaştırmaları. ...	72
30: Gruplar arası günlük platformu bulma sürelerinin karşılaştırmaları.....	73
31: Gruplar arası hedef kadranda geçirilen süre karşılaştırmaları.	74
32: Tüm hayvanların beyin dokusu protein miktar tayini için elde edilen standart eğri .	75
33: MDA düzeylerinin tayini için elde edilen standart eğri.	76
34: Gruplar arası beyin dokusu MDA düzeyi karşılaştırmaları.	77
35: Gruplar arası beyin dokusu protein karbonilleri düzeyi karşılaştırmaları.....	78
36: Gruplar arası beyin dokusu katalaz aktivitesi düzeyi karşılaştırmaları.....	79
37: Gruplar arası beyin dokusu GSH düzeyi karşılaştırmaları.	81
38: Gruplar arası hipokampus Nrf2 düzeyi karşılaştırmaları.....	82
39: Gruplar arası hipokampus TNF- α düzeyi karşılaştırmaları.	83
40: Gruplar arası hipokampus IL-1 β düzeyi karşılaştırmaları.	84
41: Gruplar arası hipokampus NLRP 3 düzeyi karşılaştırmaları.	85
42: Gruplar arası hipokampus JAK 2 düzeyi karşılaştırmaları.	87
43: Gruplar arası hipokampus STAT 3 düzeyi karşılaştırmaları.	88
44: Gruplar arası hipokampus BDNF düzeyi karşılaştırmaları.....	90
45: Gruplar arası hipokampus CREB düzeyi karşılaştırmaları.	91
46: Gruplar arası hipokampus CaMKII düzeyi karşılaştırmaları.	93
47: Gruplar arası hipokampus GLT-1 düzeyi karşılaştırmaları.	95

48: Tüm hayvanların hipokampus protein miktar tayini için elde edilen standart eğri ...	96
49: Gruplar arası hipokampus AChE düzeyi karşılaştırmaları.....	97
50: Gruplar arası hipokampal CA1 bölgesi alan başına sağlam hücre sayısının karşılaştırmaları.....	99
51: Gruplar arası hipokampal CA3 bölgesi alan başına sağlam hücre sayısının karşılaştırmaları.....	100
52: Kontrol grubuna ait hipokampal CA1 bölgesinin histopatolojik görünümü	103
53: Kontrol grubuna ait hipokampal CA3 bölgesinin histopatolojik görünümü	103
54: KSH grubuna ait hipokampal CA1 bölgesinin histopatolojik görünümü	104
55: KSH grubuna ait hipokampal CA3 bölgesinin histopatolojik görünümü	104
56: KSH+SPI25 grubuna ait hipokampal CA1 bölgesinin histopatolojik görünümü	105
57: KSH+SPI25 grubuna ait hipokampal CA3 bölgesinin histopatolojik görünümü	105
58: KSH+SPI50 grubuna ait hipokampal CA1 bölgesinin histopatolojik görünümü	106
59: KSH+SPI50 grubuna ait hipokampal CA3 bölgesinin histopatolojik görünümü	106

TABLO DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
1. Deneysel KSH'da kullanılan oksidatif stres biyobelirteçlerin bir özeti	12
2: Pro inflamatuvar ve anti inflamatuvar sitokinler	17
3: Haftalık vücut ağırlıklarının grup içi karşılaştırmaları	66
4: Vücut ağırlıklarının haftalık yüzde değişimleri	67
5: Beyin/Vücut Ağırlığı yüzde oranları.....	68
6: Tüm grupların kan basıncı ve kalp hızı değerleri	69
7: Grup içi günlük platformu bulma süreleri karşılaştırmaları.....	71
8: Gruplar arası günlük platformu bulma sürelerinin karşılaştırmaları.....	73
9: Gruplar arası hedef kadranda geçirilen sürenin karşılaştırmaları	74
10: BSA konsantrasyonları ve Absorbans değerleri.....	75
11: MDA konsantrasyonları ve Absorbans değerleri	76
12: Beyin MDA düzeyleri gruplar arası karşılaştırmaları	77
13: Beyin protein karbonilleri düzeyi gruplar arası karşılaştırmaları	78
14: Beyin dokusu katalaz aktivitesi düzeyi gruplar arası karşılaştırmaları.....	79
15: Beyin dokusu katalaz aktivitesi ve deneyle ilgili parametreler arasındaki korelasyon analizi	80
16: Beyin dokusu GSH düzeyi gruplar arası karşılaştırmaları.....	80
17: Beyin dokusu GSH düzeyi ve deney ile ilgili parametreler arasındaki korelasyon analizi.....	81
18: Hipokampus Nrf2 düzeyi gruplar arası karşılaştırmaları.....	82
19: Hipokampus TNF- α düzeyi gruplar arası karşılaştırmaları	83
20: Hipokampus IL-1 β düzeyi gruplar arası karşılaştırmaları	84
21: Hipokampus NLRP 3 düzeyi gruplar arası karşılaştırmaları	85
22: Hipokampus NLRP3 düzeyi ve deney ile ilgili parametreler arasındaki korelasyon analizi	86
23: Hipokampus JAK 2 düzeyi gruplar arası karşılaştırmaları	86
24: Hipokampus JAK2 düzeyi ve deney ile ilgili parametreler arasındaki korelasyon analizi.....	87
25: Hipokampus STAT 3 düzeyi gruplar arası karşılaştırmaları	88
26: Hipokampus STAT3 düzeyi ve deney ile ilgili parametreler arasındaki korelasyon analizi.....	89

27: Hipokampüs BDNF düzeyi gruplar arası karşılaştırmaları.....	89
28: Hipokampüs BDNF ve Nrf2 düzeyleri korelasyon analizi	90
29: Hipokampüs CREB düzeyi gruplar arası karşılaştırmaları	91
30: Hipokampüs CREB düzeyi ve deney ile ilgili parametreler arasındaki korelasyon analizi	92
31: Hipokampüs CaMKII düzeyi gruplar arası karşılaştırmaları	92
32: Hipokampüs CaMKII düzeyi ve deney ile ilgili parametreler arasındaki korelasyon analizi	94
33: Hipokampüs GLT-1 düzeyi gruplar arası karşılaştırmaları	94
34: Hipokampüs GLT-1 düzeyi ve deney ile ilgili parametreler arasındaki korelasyon analizi	95
35: BSA konsantrasyonları ve Absorbans değerleri.....	96
36: Hipokampüs AChE aktivitesi düzeyi gruplar arası karşılaştırmaları	97
37: Hipokampüs AChE aktivitesi düzeyi ve deney ile ilgili diğer parametreler arasındaki korelasyon analizi	98
38: Hipokampal CA1 ve CA3 bölgelerindeki sağlam nöron sayılarının gruplar arası karşılaştırmaları.....	99
39: Hipokampal CA1 İntakt Nöron Sayısı ve deney ile ilgili diğer parametreler arasındaki korelasyon analizi	101
40: Hipokampal CA3 Sağlam Nöron Sayısı ve deney ile ilgili diğer parametreler arasındaki korelasyon analizi	102

1. GİRİŞ

Kronik serebral hipoperfüzyon (KSH) yaşlanma ve ateroskleroz, hipertansiyon, obezite gibi çeşitli risk faktörlerine bağlı olarak serebral kan akımının kronik azalması ile karakterize patofizyolojik bir durumdur. KSH, en yaygın 2. demans türü olan vasküler demans (VaD)'ın başlıca nedenidir. Ayrıca Alzheimer hastalığı (AH) da dahil olmak üzere, multiple skleroz, majör depresyon, Parkinson hastalığı (PD), şizofreni, epilepsi gibi diğer merkezi sinir sistemi (MSS) hastalıklarında bilişsel ve davranışsal bozukluklar için önemli bir predispozan faktördür (1, 2). Yapılan çalışmalar KSH'nin glial aktivasyonu, reaktif oksijen türleri (ROS)'un oluşumunu, mitokondriyal disfonksiyonu, nöroinflamasyonu, beyaz cevher lezyonunu, tau hiperfosforilasyonunu, amiloid beta (A β) birikimini artırarak nörodejenerasyona ve sonuçta da nöronal hasara yol açabileceğini göstermektedir (3-9). KSH sıçanlarda her iki ortak karotis arterin kalıcı oklüzyonu ile taklit edilebilmekte ve kronik serebrovasküler bozuklukların patofizyolojisini araştırmak için deneysel çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (4, 6, 7, 10).

Dikkat çekici bir şekilde dünya genelinde kadınlarda demansın daha sık görüldüğü bildirilmektedir (11). Serebrovasküler hastalıklar menopoz öncesi kadınlarda çok gözlenmezken menopozdan sonra bu risk artar. Bu yükselmiş riskin, östrojen eksikliğinin vasküler disfonksiyonla ilişkili olduğu ve bunun beyin enerji metabolizmasında düşüş ve hipokampal hacim kaybı gibi hem Alzheimer hem de VaD biyobelirteçleriyle örtüştüğü vurgulanmaktadır (12, 13). Menopoz sonrası hormonal değişiklikler, beyindeki yapısal ve işlevsel farklılıklar kadınları bilişsel gerilemeye yatkın hale getirebilir (14). Popülasyonda cinsiyete dayalı bu önemli fark göz önüne alınarak mevcut çalışma dişi sıçanlara uygulanmıştır ve sıçanlarda menopoz; endojen estradiol ve progesteron üretimini ortadan kaldırmak için bilateral overektomi yapılarak taklit edilebilmektedir (15, 16).

ROS demans da dahil olmak üzere pekçok nörodejeneratif hastalığın ve bilişsel bozukluğun patofizyolojisinde önemli rol oynar (17). Çünkü antioksidan enzim aktivitesinin düşüklüğü, oksidatif metabolik aktivite yükseliği ve çoklu doymamış yağ asitlerinin içeriği nöronları ROS hasarına karşı oldukça duyarlı hale getirir (18). Bu nedenle iskemik durumlarda beyin dokusunun antioksidan savunma mekanizmaları, dokuyu oksidatif hasara karşı koruyamayabilir. KSH mitokondriyal disfonksiyona ve

protein sentezinin inhibisyonuna neden olabilir, bu da antioksidanlar ve ROS dengesini oksidatif hasar üreten ROS birikimine doğru değiştirebilir (5).

Nöroinflamasyon esas olarak artan glial aktivasyon ve ardından inflamatuvar faktörlerin salınmasıyla karakterizedir (7). KSH ile indüklenen hasarın fizyopatolojik başlangıcında, mikrogliya ve astositlerin aktivasyonu, kemokin ve inflamatuvar mediatörlerin salınımı önemli rol oynar (19, 20). KSH ile indüklenen hasarın şiddeti interleukin (IL)-1 β , IL-6 ve tümör nekroz faktörü α (TNF- α) dahil olmak üzere çeşitli proinflamatuvar sitokinler aracılığıyla artar (21, 22). Nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı (NOD) benzeri reseptör ailesi pirin domain içeren protein 3 (NLRP3) inflamazomunun kaspaz-1'in bölünmesini ve aktivasyonunu tetiklediği sonuçta IL-1 β olgunlaşmasına ve sekresyonuna yol açtığı bilinmektedir (23). Yakın tarihte yapılan bir çalışmada KSH'nun, mikrogliyal aktivasyonu ve ROS birikimini artırarak, NLRP3 inflamazomunun aktivasyonunu ve IL-1 β salınımını artırdığını bildirilmiştir (24). Janus kinaz (JAK) ve sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) yolu, son yıllarda keşfedilen ve hücrel apoptoz, inflamatuvar yanıtlar ve oksidatif stres reaksiyonlarına katılan bir grup hücre içi sinyal iletim yollarının önemli bir üyesidir (25). JAK-STAT yolu, hedef genlerin transkripsiyonel aktivasyonu için çok sayıda ligand tarafından kullanılır. Ligandların reseptörlerine bağlanması JAK fosforilasyonunu indükler, bu da daha sonra pro-inflamatuvar sitokinleri ve kemokinleri kodlayan hedef genlerin transkripsiyonunu düzenleyen ve doku hasarına katkıda bulunan STAT fosforilasyonuna neden olur (21, 22). Bir çalışmada serebral iskemi reperfüzyonu sonrası JAK2/STAT3 sinyal yolağının inhibisyonunun proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu ve oksidatif hasarı azalttığı bildirilmiştir (26).

Sinaptik fonksiyonlardaki bozukluk AH ve VaD gibi nörodejeneratif hastalıklarda bilişsel gerilemenin en önemli nedenlerinden biridir. Sinapslarda sinaptik plastisitenin düzenlenmesi ve nörotransmitterin salınmasıyla ilgili çok sayıda reseptör, kanal ve fonksiyonel protein vardır (27). Hipokampal uzun süreli potansiyasyon (LTP), beyinde hafıza edinme, konsolidasyon ve depolamanın altında yatan anahtar hücrel mekanizma olarak kabul edilir (28-30). Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), hipokampüste yaygın olarak eksprese edilir ve BDNF sinaptik plastisitede, nöronal aktivitede, nöronal sağkalımda, sinaptik yeniden şekillenmede, nörogenezde önemli rol oynar (30). BDNF, tropomiyosin reseptör kinaz B (TrkB)'nin aktivasyonu yoluyla serebral fizyolojik aktiviteleri düzenler ve daha sonra ekstrasellüler sinyal

düzenleyici kinaz (ERK) ve siklik adenosin monofosfat (cAMP) yanıt elemanı bağlayıcı proteini (CREB) ve Ca^{2+} /kalmmodulin bağımlı protein kinaz II (CaMKII) gibi alt akış protein aktivasyonunu başlatır (31). CaMKII, sinaptik plastisite, öğrenme ve hafızada yer alan çok işlevli bir serin / treonin kinazdır (32). Ca^{2+} /kalmmodulin kompleksi CaMKII ile birleştiğinde aktive edilir ve kinazı yapısal olarak aktif hale getirmek için otofosforilatlanır ve CaMKII'nin fosforilasyonu (p-CaMKII), CREB'i aktive eder (33). CREB, nöronal canlılığı, prekürsör proliferasyonu, nörit büyümesi ve nöronal farklılaşmada büyük bir düzenleyici rol oynayan çok sayıda dokuda bulunan bir transkripsiyon faktörüdür (34). Min ve arkadaşları (2013) AH ve VaD deneysel modellerinde p-CaMKII, ve p-CREB seviyelerinin azaldığını ve aynı şekilde Morris su labirenti testinde hayvanlarda öğrenme ve hafıza davranışlarında bozulma olduğunu bildirmişlerdir (35).

MSS'nin esas uyarıcı nörotransmitteri glutamattır ve KSH ve AH'nin patofizyolojisindeki ayırt edici mekanizmalardan biri olarak kabul edilen eksitotoksositeye neden olur (36). İskemik hasarı takiben aşırı glutamat salınımı ve glutamat taşıyıcılarının ciddi şekilde bozulması nörotoksositeye yol açar, bu da esas olarak iyonotropik reseptörlerin aktivasyonu ve hücre içi kalsiyum aşırı yüklenmesi yoluyla zararlı bir kaskadı tetikleyerek "eksitotoksik" nöronal ölüme yol açar (36-38). Pek çok çalışma, astrositlerin düşük hücre dışı glutamat seviyelerini korumada, beyindeki glutamati ortadan kaldırmada ve geri dönüştürmede önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Astrositik glutamat taşıyıcı-1 (GLT-1) ve glutamat / aspartat taşıyıcı (GLAST) beyindeki hücre dışı glutamat seviyelerinin birincil düzenleyicileridir (38-40).

Kolinerjik nörotransmisyonundaki düşüş VaD'nin ve AH'nin ortak bir patofizyolojik faktörü olarak kabul edilir. Merkezi kolinerjik nöronlar, çoğunlukla hipokampus, striatum ve korteks gibi serebral hipoperfüzyona duyarlı bölgelerde dağılmıştır ve bu nöronların kaybı hipokampal fonksiyonlarda bozulma ve bilişsel işlevlerde düşüşe neden olur (36, 41, 42). Asetilkolinesteraz (AChE), sinaps içine salınan asetilkolin (ACh)'i parçalayan ve böylece ACh fonksiyonunu inhibe eden biyolojik bir enzimdir. ACh, AChE tarafından hızla ortamdan uzaklaştırıldığından, doğrudan tespiti oldukça zordur. Dolayısıyla çoğu çalışma, kolinerjik sistemin hasarının ve onarımının, kolin asetiltransferaz (ChAT) ve AChE'nin ekspresyonu ve aktivitesinin saptanmasıyla dolaylı olarak değerlendirilebileceğini göstermiştir (9).

Mineralokortikoid reseptör (MR) aktivasyonu, çok çeşitli hastalıkların patofizyolojisine katkıda bulunan bir faktördür. MR'nin fizyolojik aktivatörü olan yüksek aldosteron düzeylerinin hipertansiyonu indüklediği, inflamasyonu ve fibrozu değiştirdiği ve kardiyovasküler hastalıkları şiddetlendirdiği bilinmektedir (43). MR'ler klasik olarak, su ve elektrolit dengesinin düzenlenmesinde rol aldıkları böbreğin distal toplama kanalında eksprese edilirler. MR'i beyin nükleus tractus solitarii, hipokampus, prefrontal korteks (PFC) ve amigdala gibi çeşitli bölümlerinde de bulunur (44). Spironolakton bir MR antagonistidir ve MR'lerin neden olduğu çeşitli hücre hasarı inhibe eder (45). Literatürde spironolaktonun çeşitli dokularda göz (46), böbrek (47), karaciğer (48), beyin (49) MR aracılığıyla indüklenen oksidatif hasarı ve nöroinflamasyonu azalttığı, öğrenme ve hafıza fonksiyonlarını iyileştirdiği rapor edilmiştir (43, 50, 51). Bir çalışmada kortikosteron kaynaklı LTP'deki zayıflamanın spironolakton varlığında bloke edildiği ve hatta fosforile edilmiş CaMKII'de kortikosteron kaynaklı azalma yine spironolakton varlığında arttığı bildirilmiştir (52). Aynı zamanda bir klinik çalışmada plazma aldosteron konsantrasyonu yüksek kişilerde spironolakton tedavisinin bilişsel işlevi iyileştirdiğini bildirilmiştir (53).

KSH'nin hipokampal fonksiyonları ve bilişsel işlevleri olumsuz etkilediği bilirse de altta yatan mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. VaD'da bilişsel düşüşü hafifletmek için mevcut tedavi stratejileri ağırlıklı olarak donepezil, memantin ve pirasetam gibi ilaçların kullanımına dayanmaktadır (54). Çalışmamızda, KSH'nin hipokampal fonksiyonlar üzerine etkilerini ve olası mekanizmaların neler olduğunu ve bu durumları tersine çevirebilecek bir tedavi ajanı olarak ön gördüğümüz spironolaktonun etkilerini araştırmayı amaçladık. Bu çalışma literatürdeki KSH'de hipokampal fonksiyonlardaki bozulmaya ve bilişsel düşüşe spironolaktonun etkilerini ve olası mekanizmaları inceleyen ilk çalışmadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kronik Serebral Hipoperfüzyon ve Vasküler Demans

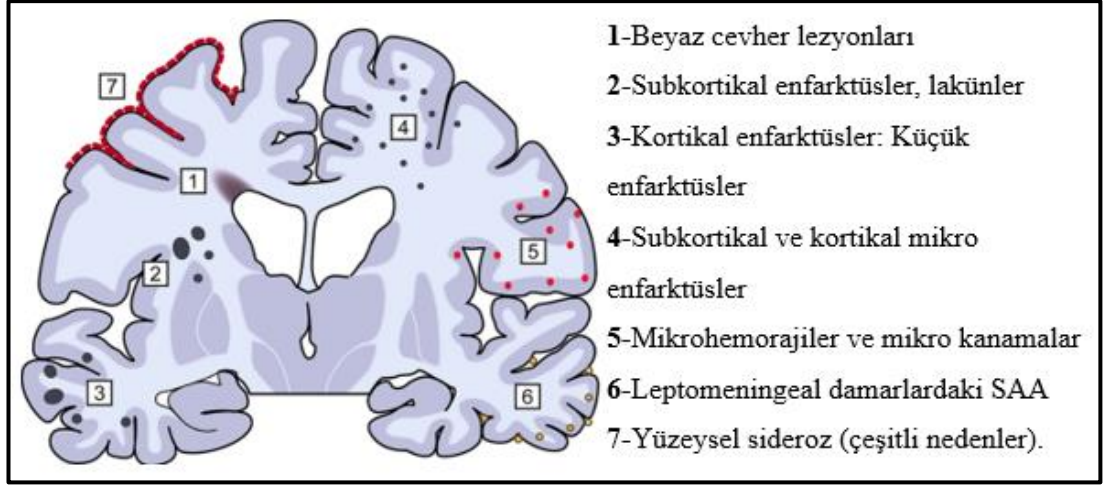
Kronik serebral hipoperfüzyon ilerleyici hipokampal hasara ve bilişsel bozukluklara neden olan serebral kan akımı (SKA)'nın kronik azalmasıyla karakterize yaygın patolojik bir mekanizmadır (55). KSH, Alzheimer hastalığından sonra görülen en yaygın ikinci demans türü olan vasküler demansın başlıca nedenidir. VaD Batı ve Asya ülkelerindeki tüm demans vakalarının yaklaşık %20-30'unu oluşturur ve bu rakamların giderek artacağı beklenmektedir (36).

Yaşlı nüfus dünya çapında önemli sağlık ve sosyoekonomik etkilerle birlikte artmaktadır. Yaşlanma üzerine yapılan klinik ve deneysel çalışmalar beyinde nörojenizde azalma, sinaptik bozukluklar, metabolik stres ve inflamasyonda artışın olduğunu ortaya koymuştur. Bu değişiklikler bilişsel gerileme ve nörodavranışsal eksikliklerle ilişkilidir. Yaşlanma bir hastalık olmasa da işlevsel kötüleşme, duygusal bozukluk, hastalığın abartılması, demans ve genel hastalık duyarlılığı için önemli bir risk faktörüdür. Ayrıca, zihinsel stres ve travmayla ilişkili yaşam olayları da yaşa bağlı bozuklukları ve demansı hızlandırabilir (56). VaD için artan yaş, kadın cinsiyeti ve aile öyküsü değiştirilemez risk faktörleridir. Yaşlanma, özellikle hipokampüste atrofiye, amiloid- β üretimi ve yıkımında dengesizliğe, inflamasyona ve hafızayla ilgili nöronların apoptozuna neden olarak VaD gelişimine katkıda bulunur. Kadınlarda menopoza sonra VaD yaygınlığının artmasında östrojen hormonunun azalması ve beynin yapısal farklılıkları rol oynayabilir. Ebeveynlerin demans öyküsü, hastalığa genetik yatkınlık ekleyebilmektedir (57). Bunların yanı sıra diyabet, hipertansiyon, obezite, atriyal fibrilasyon, kalp yetmezliği gibi vasküler disfonksiyona neden olan kronik hastalıklar da önemli rol oynar. Ayrıca düşük eğitim seviyesi gibi demografik faktörler ve sedanter yaşam, sigara kullanımı gibi yaşam tarzları da bilinen diğer risk faktörleridir (58).

KSH, yaşlı hastalarda bilişsel gerileme ve demansa neden olan ana mekanizmalardan biridir. Yaşlanan nüfus arttıkça, hafif bilişsel bozukluk ve demanstan oluşan bilişsel bozukluk, dünya çapında önemli bir sağlık sorunu haline gelmektedir (2). Küresel olarak, demanstan etkilenen kişi sayısı 2019'da 57.4 milyon iken, bu rakamın 2050'de 152.8 milyon vakaya çıkacağı tahmin edilmektedir. Vakalarda öngörülen artışlar, büyük ölçüde nüfus artışına ve nüfusun yaşlanmasına

atfedilmektedir. Dikkat çekici bir şekilde 2019'da dünya genelinde demansı olan kadınların erkeklerden daha fazla olduğu ve demansla yaşayan insan sayısındaki büyük artışlara rağmen, yaşa göre standardize edilmiş her iki cinsiyetteki yaygınlığın ise aynı kalacağı tahmin edilmektedir (13, 59).

VaD'nin çok faktörlü etiopatolojisi, çeşitli klinik belirtileri ve çok sayıda klinik alt tipi vardır (60). VaD, beyindeki kan damarlarına zarar veren ve SKA'nı azaltan, sekonder fokal nöronal hasara ve doku kaybına yol açan serebral ateroskleroz/arter hasarı, tromboz, vasküler stenoz veya oklüzyon gibi farklı vasküler etiolojilerden kaynaklanır (61). Hipertansiyon, diabetes mellitus (DM) ve yaşlanma gibi çeşitli vasküler risk faktörleri küçük damar değişikliklerine ve ateroskleroza neden olur. Küçük damar değişikliği oklüzyona ve laküner enfarktüse neden olabilirken, ateroskleroz KSH'ye neden olur. KSH mikrogial/astroglial aktivasyonu, matris metaloproteinaz aktivasyonu, kan-beyin bariyeri hasarı ve endotelial disfonksiyonu, nöroinflamasyonu, oksidatif stresi, oligodendroglial apoptozu ve beyaz cevher lezyonlarını indüklemektedir (58, 61, 62). Artan kanıtlar, vasküler risk faktörlerinin nörodejenerasyona, bilişsel bozulmaya ve demansa katkıda bulunduğunu göstermektedir (63). KSH, periventriküler beyaz cevhere, bazal ganglionlara ve özellikle bilişsel fonksiyonlarla ilişkili hipokampüse ve prefrontal kortekse zarar vererek bilişsel bozukluğa yol açmaktadır. Hipokampus yüksek bazal metabolizma hızı nedeniyle serebral kan akışındaki değişikliklere, iskemi ve hipoksiye oldukça duyarlı bir beyin bölgesidir (64). Dolayısıyla KSH, çeşitli hipokampal patolojileri tetikleyen vasküler bilişsel bozukluk (VBB)'nin başlaması ve ilerlemesi için temel mekanizmalardan biridir. Çalışmalar serebrovasküler ve nörodejeneratif hastalıklarda, hipokampal hasarın bilişsel bozulmanın gelişmesinde önemli bir rol oynadığını, dahası hipokampal dejenerasyon derecesinin bilişsel gerileme ile pozitif ilişkili olduğunu göstermektedir (58, 64) (Şekil 1).



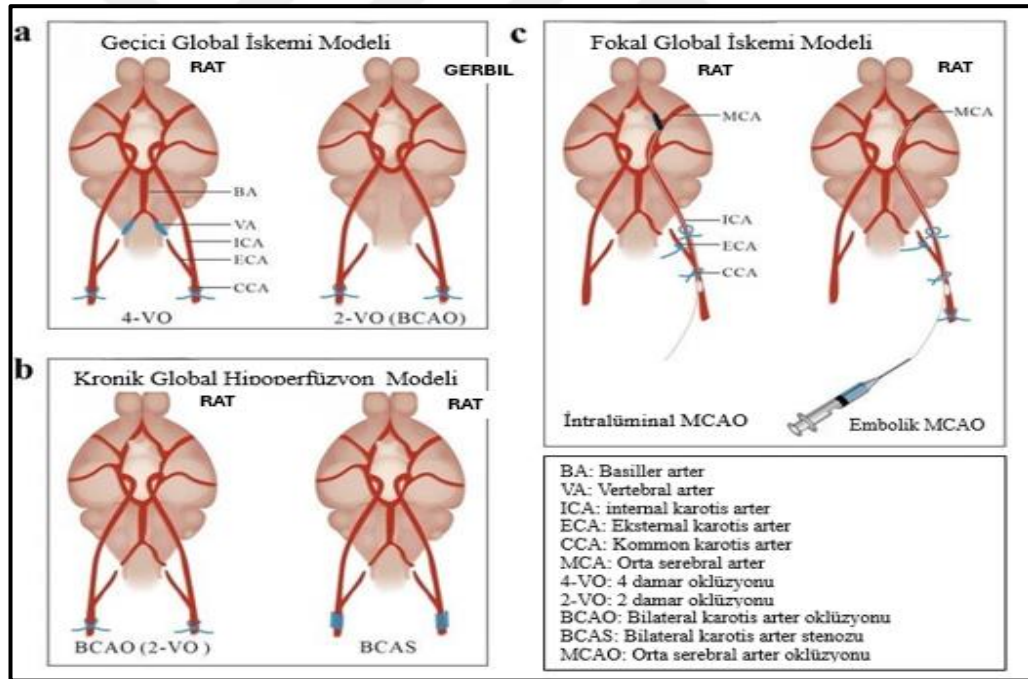
Şekil 1: Demansla ilişkili Farklı Serebrovasküler Patolojiler. Bazal ganglionlar seviyesinde koronal düzlemin şematik diyagramı. Küçük damar hastalığı; arterioskleroz, lipohyalinozis, hipertansif, arteriosklerotik, amiloid veya kollajen anjiyopatisinin tanımlarını içerir. Bu lezyonların her biri, hastalığın başlangıcından itibaren oluşan vasküler hasarın zamanlaması ve süresiyle ilişkilidir ve bilişsel gerilemenin hem başlangıcında hem de ilerleyici doğasında kritik rol oynamaktadır. (SAA: serebral amiloid anjiyopati) (61).

65 yaş üstü kişilerin %1-4'ünü etkileyen ve morbiditesi yaşla birlikte artan (65) VaD'da bilişsel düşüşü hafifletmek için mevcut tedavi stratejileri ağırlıklı olarak donepezil, memantin ve pirasetam gibi ilaçların etiket dışı kullanımına dayanmaktadır. Ancak, bu farmakoterapötiklerin hiçbiri VaD'ye özgü kullanım için FDA onayı almamıştır (54) ve bu da terapötik yeniliğe olan acil ihtiyacı vurgulamaktadır.

2.2. Kronik Serebral Hipoperfüzyon ve Sıçan Modeli

KSH ile bilişsel bozukluk arasındaki nedensel ilişkilerin anlaşılmasına deneysel çalışmalar önemli ölçüde katkı sağlamaktadır (63). VaD ve KSH'nin en yaygın kullanılan deneysel modeli, sıçanlarda kalıcı olarak bilateral ortak karotis arterlerin oklüzyonu (BCCAO)'dur. İki damar oklüzyonu (2VO) olarak da adlandırılan bu model, vertebral arterler açık kalırken ortak karotid arterlerin oklüzyonu ile oluşturulur bu da serebral kan akımının kısmi azalmasına neden olur (66). 2VO, SKA'nın kortikal alanlarda %35-45'e ve hipokampüste yaklaşık %60'a düşmesine neden olur. Oklüzyonu takip eden günlerde kısmi bir iyileşme olsa da kalıcı oligemi klinik bulgularla uyumlu yapısal ve işlevsel beyin değişikliklerine neden olur (10, 67).

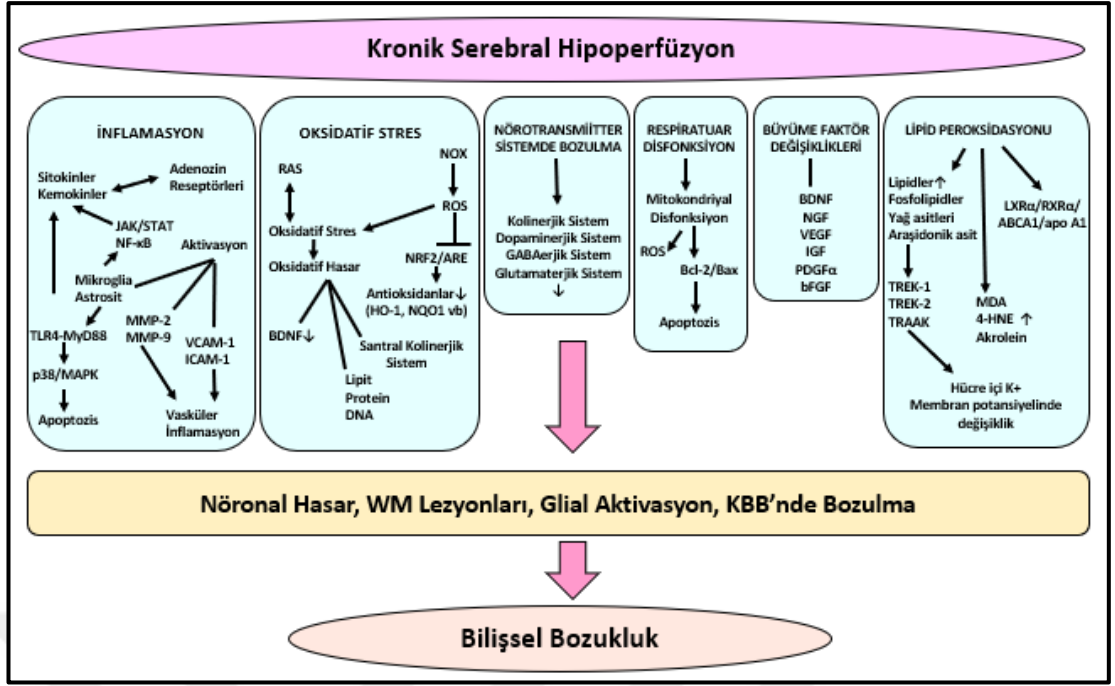
2VO hayvanları, arterlerin ligasyonundan iki hafta sonra tipik olarak belirgin olan beyaz cevher lezyonları geliştirir ve miyelin vakuolasyonu, aksonal hasar, demiyelinizasyon, kan beyin bariyeri (KBB) hasarı ve mikrogliaların aktivasyonu ve lenfosit infiltrasyonu ile karakterize edilen lezyonlar gözlenir. 2VO hayvanları, insanlarda bilişsel bozukluklarla benzer davranış değişiklikleri geliştirir. Davranış değişiklikleri oklüzyondan birkaç hafta sonra saptanabilir ve SKA normal değerlere dönse bile bilişsel düşüşün zamanla ilerlediği görülür (63, 66-68). Dolayısıyla nöropatoloji ve bilişsel disfonksiyonun ilerleyici olması 2VO modelini nöroprotektif tedavileri test etmek için uygun kılar (60, 63). Çeşitli demans gruplarının ortak klinik semptomu, yüksek düzeyli bilişsel işlevlerin ciddi şekilde bozulmasıdır. Kemirgenlerde VBB'yi indüklemek için 2VO dışında BCCAO, orta serebral arter oklüzyonu MCAO gibi farklı modeller de vardır (69). Yaygın kullanılan modeller Şekil 2'de özetlenmiştir (66) (Şekil 2).



Şekil 2: Kemirgenlerde vasküler bilişsel bozukluk modellerinin şematik diyagramı. a. Sıçanlarda ve gerbillerde geçici global serebral iskemi modelleri sırasıyla 4-VO ve 2-VO ile oluşturulan. b. Sıçanlarda kronik global hipoperfüzyon modelleri BCAO (2VO) veya BCAS ile oluşturulan. c. Sıçanların fokal serebral iskemi modelleri endovasküler filament veya fibrin açısından zengin allojenik emboli ile oluşturulan. Aynı yöntem fareler için de geçerlidir ancak farelerin serebrovasküler gelişimine bağlıdır. Bu nedenle, MCAO fare modeli daha az tutarlıdır (66).

2.3. Kronik Serebral Hipoperfüzyon ve Patofizyoloji

İnmeye neden olan bölgesel SKA'nın ani bir şekilde bozulmasından farklı olarak, KSH, SKA'nın orta derecede ve kalıcı bir şekilde azalmasıyla indüklenir. Yüksek enerji tüketimi ve enerji depolarının sınırlılığı nedeniyle beyin sürekli ve iyi düzenlenmiş bir kan dolaşımına ihtiyaç duyar ve SKA'nın orta derecede bozulması bile beyin fonksiyonu üzerinde onarılamaz etkiler oluşturur (68). Bu tür hipoperfüzyon paterni, AH ve VaD gibi nörodejeneratif kognitif bozukluk hastalıklarının gelişmesine ve ilerlemesine neden olan bir dizi patofizyolojik değişikliğe yol açabilir (6, 7, 11, 29). Hipokampal patolojik hasar ve dejenerasyon ile yakından ilişkili olan bu süreçte altta yatan moleküler mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamış olsa da çeşitli çalışmalarda KSH'nun; oksidatif strese (3), nöroinflamasyona (24), nörotransmitter sistemlerinde bozulmaya (6, 9), sinaptik disfonksiyona (70), mitokondriyal disfonksiyona (15), nöronal apoptoza (16), lipid metabolizmasının bozulmasına (5) ve büyüme faktörlerinde değişikliklere (27) neden olduğu gösterilmiştir. Bu biyokimyasal değişiklikler KSH'nin neden olduğu bilişsel bozuklukla karakterize edilen nöronal hasarların, beyaz cevher lezyonlarının, anormal glial aktivasyonun ve kan beyin bariyeri (KBB) bozukluğunun gelişmesine önemli katkı sağlar (58, 62, 64, 66). Bu tür dengesizliklerin zararlı etkilerini aydınlatan deneysel çalışmalardan elde edilen kanıtlar, bunların VaD patogenezindeki kritik rollerini göstermektedir (71) (Şekil 3).



Şekil 3: KSH kaynaklı biyokimyasal değişiklikler ve VaD'deki fizyopatolojik mekanizmalar. KSH, bir dizi patolojik değişikliğe neden olur: nöronal hasar, Beyaz cevher lezyonları, glial aktivasyon ve KBB'nin bozulması. Bu patolojik değişiklikler esas olarak oksidatif stres, inflamasyon, nörotransmisyonunda bozulma, sinaptik disfonksiyon, mitokondriyal işlev bozukluğu, büyüme faktörlerinin değişiklikleri ve anormal lipid metabolizması gibi hücrel homeostaz anormalliğinden kaynaklanır (71).

2.2.1. Kronik serebral hipoperfüzyon ve oksidatif stres

Demansın vasküler, Alzheimer, frontotemporal ve Lewy cisimcikli demans olmak üzere çeşitli alt tipleri vardır ve bu farklı tipler, ROS'nin anormal derecede aşırı üretiminin veya antioksidan mekanizmalardaki azalmanın neden olduğu dengesizlik nedeniyle ortaya çıkan oksidatif stres yoluyla ortak patogenezi korurlar (72). Aşırı ROS, hücrel işlev bozukluğuna ve nörodejenerasyona yol açarak temel biyomoleküllere zarar verir. Alzheimer, Parkinson, Amyotrofik lateral skleroz (ALS), multipl skleroz ve iskemik inme dahil olmak üzere çeşitli nörolojik bozukluklar oksidatif stresle ilişkilidir (73). Dolayısıyla sadece demans türlerinde değil birçok nörodejeneratif hastalığın patofizyolojisinde oksidatif stres önemli rol oynar (17). Beyin dokusu, daha yüksek oksijen tüketimi, çoklu doymamış yağ asitlerinin içeriğinin nispeten yüksek olması ve antioksidan savunma mekanizmalarının düşük

olması nedeniyle oksidatif stresten zarar görmeye daha yatkındır (18). KSH mitokondriyal disfonksiyona ve protein sentezinin inhibisyonuna neden olabilir, bu da antioksidanlar ve ROS dengesini oksidatif hasar üreten ROS birikimine doğru değiştirebilir (5). KSH sırasında aşırı üretilen süperoksit anyonları (O_2^-), hidroksil radikali ($-OH$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi zararlı serbest oksijen radikalleri lipidlere, proteinlere ve DNA'ya saldırarak hücrel hasarı şiddetlendirebilir (71).

Fizyolojik konsantrasyonda ROS, sinyal yollarında ve sitokin sekresyonu, büyüme, farklılaşma ve gen ekspresyonları ve savunma gibi çok sayıda hücrel aktivitenin düzenlenmesinde yer almaktadır. Fakat fizyolojik konsantrasyonun üzerinde ROS ile ortaya çıkan oksidatif stresin ikincil yan ürünleri, lipid peroksidasyonu, protein ve DNA oksidasyonu yoluyla zararlı biyolojik hasara neden olur (74). Genel olarak lipid hasarı, malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksi-2-nonenal (4-HNE) dahil olmak üzere lipid peroksidasyon ürünleri tarafından (60), protein oksidatif hasarı, nitrotirozin ve protein karbonilleri dahil olmak üzere protein modifikasyon ürünleri ve oksidatif DNA hasarı ise 8-Hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) düzeylerinin ölçülmesi ile değerlendirilir (71). ROS, elektron taşıma zinciri, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidazlar ve miyeloperoksidazların aktivitesiyle ortaya çıkan bir yan üründür. Bunlar vücuttan çeşitli antioksidanlar tarafından ortadan kaldırılır. Yapılan çalışmalarda KSH sırasında enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar azaldığı da bulunmuştur (3, 49). Enzimatik antioksidanlar arasında süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GSR), NAD(P)H: kinon oksidoredüktaz 1 (NQO1), katalaz (CAT), vb. ve enzimatik olmayan antioksidanlar arasında toplam hücrel tiyoller, glutatyon (GSH), askorbik asit (AA) vb. yer alır. Deneysel KSH'da oksidatif stres biyobelirteçlerinin bir özeti Tablo 1'de sunulmaktadır (71).

Tablo 1. Deneysel KSH'da kullanılan oksidatif stres biyobelirteçlerin bir özeti (71).

Oksidatif hasar	Belirteç	Kısaltma
Serbest radikaller	Süperoksit anyon	O ₂ ⁻
	Hidroksil radikali	-OH
	Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂
	Reaktif oksijen türleri	ROS
Lipit peroksidasyonu	Malondialdehid	MDA
	4-Hidroksi-2-nonenal	4-HNE
DNA oksidatif hasarı	8-Hidroksi-deoksiguanozin	8-OGdG
Protein oksidatif hasarı	Nitrotirozin	
	Protein karbonilleri	
Enzimatik antioksidanlar	Süperoksit dismutaz	SOD
	Glutasyon peroksidaz	GPx
	Glutasyon-S-transferaz	GST
	Glutasyon redüktaz	GR
	NAD(P)H: kinon oksidoredüktaz 1	NQO1
	Katalaz	CAT
Enzimatik olmayan antioksidanlar	Toplam hücresel tiyoller	
	Glutasyon	GSH
	Askorbik asit	AA

Bilişsel bozukluk ve demans; Alzheimer, Parkinson, Huntington, ALS ve VaD gibi nörodejeneratif hastalıklarda yaşlı bireylerin yaşam kalitesini ve yaşam süresini ciddi şekilde etkiler. Bu hastalıklar; hafıza kaybı, motor bozukluklar ve hareket yetisinin azalmasıyla karakterizedir. Oksidatif stres, bu nörodejeneratif süreçlerin patofizyolojisinde merkezi bir rol oynar. MDA, GSH-Px ve protein karbonilleri gibi oksidatif stres biyobelirteçleri ile yaşa bağlı bilişsel gerileme arasında anlamlı korelasyonlar saptanmıştır. Oksidatif stres, stres granülleri oluşumuna katkı sağlayarak nöronal protein ve transkriptlerin sekestrasyonuna neden olur, bu da nöronal işlevin bozulmasına yol açar. Ayrıca, DNA hasarı, anormal protein katlanması ve agregasyonu gibi süreçlerle etkileşerek doku hasarını ve hastalık progresyonunu hızlandırır. Böylece oksidatif stres, nörodejeneratif hastalıklarda hem tetikleyici hem de predispozan temel bir patojenik unsur olarak öne çıkar (73).

2.2.1.1. Kronik serebral hipoperfüzyon ve lipid peroksidasyonu

MSS'nde lipitler hem yapısal hem de işlevsel olarak temel bileşenlerdir. Lipitler, hücre zarı ve hücre içi yapının yapılandırılmasına katılmanın yanı sıra, madde taşınmasında, nöronal sinyallemede, oksidatif streste, nöroinflamasyonda, nörodejenerasyonda, nöroproteksiyonda, sinaptogenez ve nörogenezde sinir hücrelerinin normal fizyolojik fonksiyonlarının sürdürmesine ve korumasına yardımcı olur. Merkezi sinir sistemi çoklu doymamış yağ asitleri bakımından zengindir, bu da

onu özellikle membranla ilişkili oksidatif strese karşı savunmasız hale getirir. Lipid peroksidasyonunun Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, amiyotrofik lateral skleroz ve multipl skleroz dahil olmak üzere bir dizi nörodejeneratif hastalıkta rol oynadığı gösterilmiştir. Bu nedenle beyindeki anormal lipid metabolizması kısmen serebral fonksiyon bozukluğunu yansıtmaktadır (75, 76).

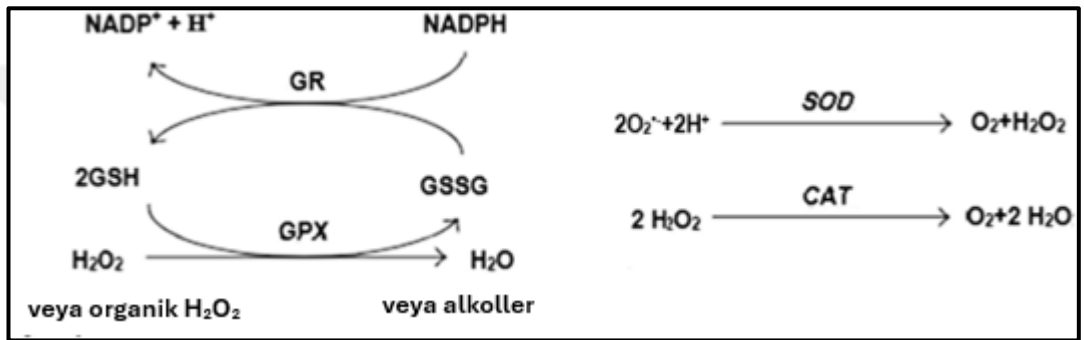
2.2.1.2. Kronik serebral hipoperfüzyon ve protein oksidasyonu

Proteinler canlı organizmanın yapı taşlarıdır ve biyolojik fonksiyonların sürdürülmesinde rol oynarlar. Bunlar arasında kromatin mimarisinin dinamik modifikasyonu yoluyla genomun stabilizasyonu, mitokondriyal fonksiyonlar ve DNA hasarın onarılması yer alır (74). Dokuya oksijen sağlanmasının yetersiz olduğu durumlarda, oksidatif protein modifikasyonlarına ve doku hasarına yol açan serbest radikal oluşumu indüklenir. ROS'un proteinlerle etkileşimi sonucunda histidin, prolin, arjinin ve lizin gibi çok sayıda aminoasit kalıntısında ve/veya peptid yapısında meydana gelen hasar sonucunda protein karbonil ürünleri oluşur. Dolayısıyla beyindeki hipoksi-iskemi hasarı, yaşlanmaya, yaşa bağlı hastalıklara ve nörodejenerasyona yol açabilecek dejeneratif protein modifikasyonlarına neden olur (77). Oksidatif protein modifikasyonları spesifik protein fonksiyonlarını azaltır ve hücre ölümüne neden olur. Protein oksidasyonu protein karbonillerinin oluşumna neden olur (74).

2.2.1.3. Kronik serebral hipoperfüzyon ve antioksidan sistem

Beyin, toplam vücut oksijen tüketiminin yaklaşık %20'sini tutar. Nöronların neredeyse hiç enerji rezervi olmadığından, enerji üretiminin temel bileşenleri oksijen ve glikozdur. 2VO tarafından indüklenen serebral hipoperfüzyon, ATP (adenozin trifosfat) tükenmesine neden olarak mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna, protein sentezi inhibisyonuna ve iyonik pompa bozukluğuna yol açabilir (78). Protein sentezi hücresel iskemik hasara karşı çok duyarlıdır ve aynı zamanda antioksidanların üretimi azalır. Daha önceden yapılan çalışmalarda 2VO modeli uygulanan grupların hipokampuslerinde SOD ve katalaz aktivitelerinin (79) ve GSH düzeylerinin azaldığı bildirilmiştir (3). Bir kromoprotein olan katalaz, SOD tarafından üretilen hidrojen peroksite, solunumla ilgili oksidazların, yağ asitlerinin β -oksidasyonunun ve pürin

katabolizmasının ayrışmasında rol oynar. Katalazın spesifik etkisi iki adımı içerir: H_2O_2 , hem'i bir oksiferril bileşiğine oksitler. Bir porfirin radikal katyonu oluşur, ardından ikinci bir H_2O_2 molekülü enzimi başlangıç durumuna indirgeyerek su ve moleküler oksijen sağlar (76). Katalaz, substratları hidrojen peroksitin zararlı aktivitesinden korur, dolayısıyla hücrelerin adaptif tepkisinin yanı sıra oksidatif strese karşı tolerans kazanmada da önemli bir rol oynar (80, 81). Glutasyon sistemi beyindeki ROS'un ortadan kaldırılması için birincil savunma mekanizması olarak rol oynar. GSH hücre içindeki en bol antioksidan moleküldür ve H_2O_2 ve lipid peroksit gibi oksidanları nötralize eder. Ayrıca GPX gibi enzimlerin kofaktörüdür (76, 77) (Şekil 4).

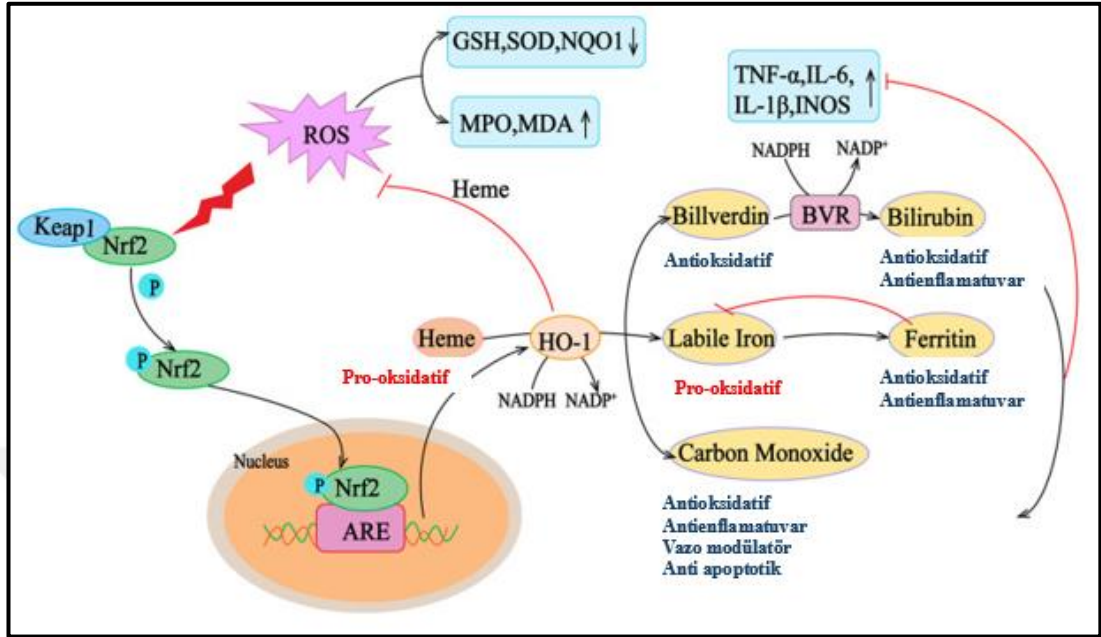


Şekil 4: Antioksidan enzimlerin izlediği mekanizma. GR (glutasyon redüktaz); GPX (glutasyon peroksidaz); SOD (süperoksit dismutaz); CAT (katalaz) (77).

2.2.1.4. Kronik serebral hipoperfüzyon ve Nrf2

Reaktif oksijen türleri nedeni ile ortaya çıkan hücresel oksidatif stresin etkilerini ortadan kaldırmada etkili bir diğer mekanizma ise bir transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2)'dir. Beyin dahil birçok organda bulunan Nrf2 lösün bazlı bir yapıda olup oksidatif stres altında hücre çekirdeğine serbestleştirilerek antioksidan faktörlerin transkripsiyonunda görev alır (82). ROS artışı, Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1 (Keap1)–Nrf2 kompleksinin ayrışmasına neden olur. Nrf2 nükleusa taşınır ve antioksidan yanıt elemanı (ARE)'e bağlanarak HO-1 transkripsiyonunu aktive eder. Böylece Nrf2/HO-1 yolu, hücreyi oksidatif strese karşı koruyan en kritik antioksidan savunma mekanizmalarından biridir. Ayrıca Pro-oksidan uyarım Nrf2/HO-1 sinyal yolunu aktive eder, böylece Nrf2, HMOX-1 transkripsiyonunu uyarır ve HO-1 seviyelerini artırır, bu da hem kaynaklı karbon

monoksit (CO) ve bilirubini parçalayarak mitokondriyal işlev bozukluğunu baskılayarak ve H₂O₂ seviyelerini azaltarak apoptozu engeller (82-84) (Şekil 5).



Şekil 5: Nrf2 sinyal yolağı (84).

Yapılan araştırmalar nörodejeneratif hastalıkların, beyindeki azalmış Nrf2 seviyeleri ile bağlantılı olabileceğini göstermektedir (82). Aβ ile indüklenen Alzheimer modelinde sıçanların hipokampus ve PFC dokularında oksidatif belirteçler artarken Nrf2 düzeylerinin azaldığı bildirilmiştir (49). Yaşlanma ve çevresel faktörler ile artan oksidatif stres, nörodejeneratif hastalıkların etyopatogenezinde önemli olmakla birlikte (85) Nrf2 aktivasyon kaybı (örnek olarak stoplazmadan çekirdeğe alınmasının engellenmesi) veya beyin hücrelerindeki seviyelerinin azalması, beyinde Aβ birikimine yol açmaktadır. Aβ birikimi ise mikrogial aktivasyon ile IL-1β, IL-6, TNF-α gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınmasına yol açar. Böylece nöronal hasar, sinaptik fonksiyon kaybı ile sonuçlanan nöroinflamatuvar sürece neden olur (82, 84). Dolayısıyla Nrf2 antiinflamatuvar etkiler göstererek nörodejeneratif hastalıklar karşısında koruyucu etkiye sahiptir. Nrf2 geninin silindiği APP/PS1 transgenik fareler (Alzheimer hastalığı modeli)'in bilişsel işlevlerin bozulduğu, Aβ düzeylerinde, interferon gama (IFN-γ) ve mikrogial aktivasyonda artış gözlemlenmiştir (86). Sonuç olarak Nrf2 oksidatif hasara ve nöroinflamasyona karşı koruyucu etkiler gösteren önemli bir transkripsiyon faktörüdür ve eksikliğinde hem biyokimyasal hem de davranışsal düzeyde nörodejeneratif hastalıkları şiddetlendirir (47, 84).

2.2.2. Kronik serebral hipoperfüzyon ve nöroinflamasyon

Nöroinflamasyon, demans gibi kronik nörodejeneratif hastalıkların hem başlangıcında hem de ilerleyici klinik seyrinde merkezi bir rol oynamaktadır. Hipoperfüzyona bağlı olarak aktive olan mikrogial hücreler, başta IL-1 β , TNF- α ve interlökin-6 (IL-6) olmak üzere çeşitli proinflamatuvar sitokinleri salarak nöronal hasarı derinleştirebilir (87). Ayrıca KBB geçirgenliğindeki artış, periferik immün hücrelerin beyin parankimine geçişini kolaylaştırarak inflamatuvar sürecin daha da kronikleşmesine zemin hazırlar. KSH ile indüklenen bu inflamatuvar ortam, hipokampus başta olmak üzere limbik sistem yapılarında sinaptik plastisiteyi bozarak öğrenme, hafıza ve davranış fonksiyonlarında gerilemeye yol açabilir (66, 67). Aynı zamanda, nöronal hasarın artmasıyla birlikte astrosit ve mikrogia aktivasyonu, NLRP3 inflamazom kompleksi, nükleer faktör kappa B (NF- κ B) sinyal yolları gibi moleküler düzenekler de inflamasyonun hem başlatıcısı hem sürdürücüsü haline gelir (21).

Nöroinflamasyon, merkezi sinir sisteminde kronik hipoperfüzyon ile ortaya çıkan doku hasarına karşı oluşan bağışıklık yanıtıdır. Mikrogial aktivasyon, sitokin ve kemokin düzeylerinde artış, periferik bağışıklık hücrelerinin bölgeye toplanması ve lokal doku hasarı öne çıkan temel nöroinflamatuvar mekanizmalardır (19). Mikrogial aktivasyon proinflamatuvar sitokinlerin (IL-1 β , TNF- α , IL 6) ve ROS oluşmasına neden olur (20). Çeşitli nedenlerle oluşan ROS seviyelerindeki artış, NF- κ B yoluyla proinflamatuvar sitokin yapımını uyararak nöroinflamatuvar cevabı artırır. Bu arada, proinflamatuvar moleküller ayrıca IkappaB kinaz/NF- κ B kompleksini uyararak NF- κ B aktivasyonuna neden olur. Ek olarak, ROS, NLRP3 indükleyerek IL-1 β ve IL-18 seviyelerini artırır (84). Uzun süreli ve kalıcı hale gelen nöroinflamasyon, beyaz cevherin yapısal bütünlüğünü bozarak sinir hücrelerinde geriye dönüşü olmayan dejeneratif değişimlere yol açabilir. Bu durum, özellikle öğrenme, bellek oluşturma ve bilgiyi işleme gibi temel bilişsel süreçlerde bozulmalara neden olur. (88). Nöroinflamasyon sürecine katılan proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinler özetlenerek tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2: Pro inflammatuar ve anti inflammatuar sitokinler (89).

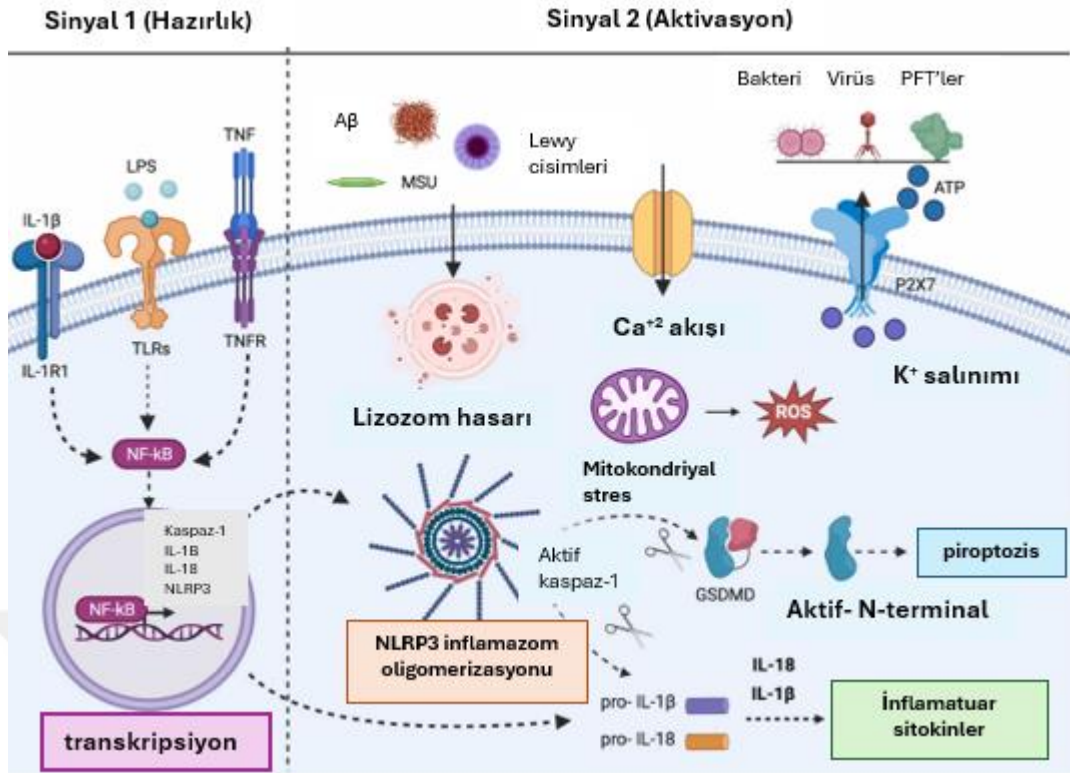
Pro-inflammatuar Sitokinler	Kaynak / Temel Bilgi (Pro)	Anti-inflammatuar Sitokinler ve İnhibitörler	Kaynak / Temel Bilgi (Anti)
IL-1 α , IL-1 β	Makrofaj/monosit kaynağı, IL-6 üretimini tetikler	IL-1Ra (reseptör antagonist)	IL-1 aktivitesini engeller
IL-6	Hem pro-inflammatuar, hem anti-inflammatuardır; IL-1 ve TNF- α 'yı baskılar	IL-4	Th2 kaynaklı; IL-1, TNF- α 'yı baskılar
TNF- α	Klasik ateş ve inflamasyon uyarıcısı	IL-10	Güçlü anti-inflammatuar; makrofajlardan TNF- α , IL-6, IL-1 β üretimini baskılar
IL-12	Th1 yanıtlarını destekler	IL-11	IL-4 ailesinden; inflamasyonu baskılar
IL-17A/E/F	Th17 hücrelerinden; otoimmün inflamasyona yol açar	IL-13	Th2 kaynaklı; hem alerjik hem anti-inflammatuar etkiler gösterir
IL-18	IL-12 ile birlikte IFN- γ üretimini artırarak inflamasyonu tetikler	TGF- β	Makrofaj, Treg aracılığıyla inflamasyonu baskılar, doku onarımına katkı sağlar
IFN- γ	Th1 aracılıklı bağışıklıkta merkezi; makrofaj aktive eder	IFN- α	Bazı durumlarda anti-inflammatuardır

KSH ortamında mikrogliya, astrositler ve endotelial hücreler erken dönemde aktive olarak TNF- α ve IL-1 β , gibi proinflammatuar sitokinleri hızla üretir. TNF- α , nöroinflamasyonun merkezi araçlarından biri olarak öne çıkar. Mikroglialar, astrositler ve endotelial hücreler tarafından salgılanan TNF- α , KSH'ye bağlı olarak KBB geçirgenliğini artırır, oksidatif stres yanıtlarını tetikler ve apoptotik sinyalleri güçlendirerek nöronal kaybı hızlandırır (19). TNF- α 'nın etkisi hem doğrudan nörotoksik hem de sekonder glial aktivasyonu ve IL-1 β , IL-6 gibi proinflammatuar sitokinlerin uyarılması yoluyla gerçekleşir (89). NLRP3 inflamasyonu başta olmak üzere, çeşitli inflamasyon komplekslerinin, beyindeki mikroglialar tarafından algılanan hücrel stres yanıtına karşı aktive olduğu bilinmektedir. Bu aktivasyon, pro-kaspaz-1'in aktif kaspaz-1'e dönüşmesiyle sonuçlanır ve kaspaz-1 pro IL-1 β 'yı aktif IL-1 β formuna çevirerek güçlü bir proinflammatuar yanıt başlatır. IL-1 β , bu süreçte KBB'nin geçirgenliğini artırır ve endotelial hücre fonksiyonlarını bozulmasına neden olur (90). TNF- α ve IL-1 β hipokampal sinaptik fonksiyonu etkileyerek işlevsel ve yapısal bozulmaya yol açar (89). Deneysel KSH modellerinde TNF- α ve IL-1 β

düzeylerinin hızla arttığı, bu artışla birlikte hipokampal bölgede mikrogliosis, sinaptik protein kaybı ve davranışsal düzeyde hafıza bozukluklarının ortaya çıktığı gösterilmiştir (91, 92).

2.2.2.1. Kronik serebral hipoperfüzyon ve NLRP3

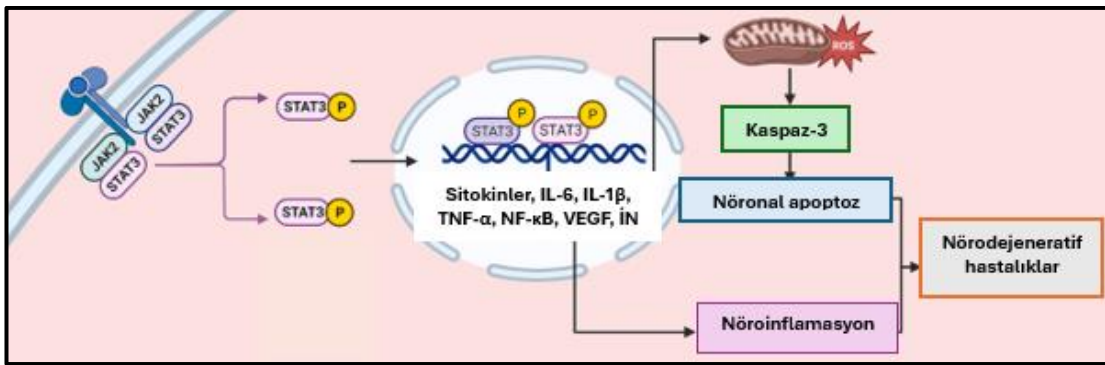
Merkezi Sinir Sistemi'nde mikroglia ve astrositler aracılığıyla düzenlenen nöroinflamasyon, hücrel stres ve zararlı uyarılara karşı bağışıklık yanıtını temsil eder. Bu süreçte en iyi tanımlanmış yapılardan biri, NLRP3 inflamazomudur; bu kompleks, NLRP3, apoptozla ilişkili spek benzeri protein (ASC) ve prokaspaz-1 bileşenlerinden oluşur. Çeşitli hücrel stres faktörleri NLRP3 aktivasyonunu tetikleyerek inflamazom oluşumuna, ardından IL-1 β ve IL-18 gibi proinflamatuvar sitokinlerin olgunlaşmasına ve salınımına yol açar. NLRP3 inflamazomunun aşırı ve kontrolsüz aktivasyonu, özellikle Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi yaşa bağlı nörodejeneratif bozuklukların patogeneğinde merkezi bir rol oynar (93). NLRP3 inflamazomu, merkezi sinir sistemindeki en iyi tanımlanmış inflamatuvar yollardan biridir. KSH gibi düşük düzeyli, uzun süreli hipoksik stres koşullarında, NLRP3 inflamazomu özellikle mikrogliyalardan aktive edilir. Bu aktivasyon, nöronal hasarın ve bilişsel bozulmanın temelini oluşturan nöroinflamatuvar yanıtı başlatır. KSH ortamında hücrel stres, ROS artışı, ATP salınımı, iyon dengesizlikleri ve lizozomal disfonksiyon gibi tehlike sinyalleri NLRP3'ü aktive eder (94). Bu aktivasyon sonucunda kaspaz-1 aktif hale gelir ve proIL-1 β ile proIL-18'i olgun ve aktif formlarına dönüştürerek güçlü bir nöroinflamatuvar yanıt başlatır (90). Deneysel 2VO modellerinde, KSH'ye maruz bırakılan hayvanlarda hipokampus ve korpus kallozum gibi bölgelerde NLRP3, IL-1 β ve IL-18 ekspresyonunun anlamlı ölçüde arttığı gösterilmiştir. Bu durum, özellikle beyaz madde hasarı, sinaptik disfonksiyon ve glial aktivasyonla yakından ilişkilidir (24). Aktive olmuş inflamazomlar, nöronlarda apoptoza ve inflamasyonla ilişkili hücre ölümü türü olan piraptoza neden olur. Ayrıca NLRP3 aktivasyonu, KBB bozulması ve mikrogliyal aşırı duyarlılık yoluyla inflamasyonun yayılmasını hızlandırır. Tüm bu süreçler öğrenme ve hafıza işlevlerinde belirgin gerilemelere yol açar (95) (Şekil 6).



Şekil 6: Kanonik NLRP3 inflammazom aktivasyonu, iki aşamalı bir modelle açıklanır: Sinyal 1 (Hazırlık): Toll benzeri reseptörler (TLR'ler), TNF reseptörü (TNFR) ve IL-1 reseptörü (IL-1R1) gibi bağışıklık reseptörlerinin; lipopolisakkarit (LPS), TNF- α , IL-1 β gibi PAMP'ler, DAMP'ler ve sitokinlerle uyarılması sonucunda NF- κ B sinyalleme aktif olur. Bu da inflammazom bileşenleri olan NLRP3, pro-IL-1 β ve pro-IL-18'in transkripsiyonel düzeyde yukarı regülasyonunu sağlar. Sinyal 2 (Aktivasyon): Hücre içi stres veya çeşitli uyarılarla (ekstraselüler ATP, ROS, K⁺ efflusu, Ca²⁺ mobilizasyonu, mitokondriyal disfonksiyon, lizozomal hasar, A β agregatları, monosodyum urat kristalleri gibi) sağlanır. Bu sinyaller, NLRP3 oligomerizasyonunu, ASC (CARD içeren apoptozla ilişkili spek benzeri protein) aracılığıyla prokaspaz-1'in bir inflamazom kompleksinde toplanmasını ve ardından aktif kaspaz-1 oluşumunu tetikler. Aktif kaspaz-1, iki temel etkinliği yürütür: pro-IL-1 β ve pro-IL-18'i olgun sitokinlere dönüştürerek inflamatuvar yanıtı başlatır. Gasdermin D (GSDMD)'yi N-terminalinden keserek plazma membranında gözenek oluşumuna neden olur. Bu süreç piroptosis olarak bilinen inflamatuvar hücre ölümünü başlatır. Bu mekanizma, enfeksiyonlara karşı bağışıklık yanıtını düzenlemenin yanı sıra, nörodejeneratif hastalıklar gibi inflamasyonla ilişkili patolojilerin gelişiminde de kritik rol oynar (93).

2.2.2.2. Kronik serebral hipoperfüzyon ve JAK/STAT yolağı

Janus kinaz ve STAT yolu, sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin hücre içi etkilerini ileten, hücresel apoptoz, inflammatuar yanıtlar ve oksidatif stres reaksiyonlarına katılan kritik bir sinyal iletim yoludur. (96). JAK/STAT yolu, hedef genlerin transkripsiyonel aktivasyonu için çok sayıda ligand tarafından aktive edilebilir. Ligandların reseptörlerine bağlanması JAK fosforilasyonunu neden olur. Fosforile JAK pro-inflammatuar sitokinleri ve kemokinleri kodlayan hedef genlerin transkripsiyonunu düzenleyen ve doku hasarına katkıda bulunan STAT fosforilasyonuna indükler (21, 22). JAK, JAK1, JAK2, JAK3 ve JAK4 olmak üzere dört aile üyesinden oluşur ve hepsi bir tirozin kinazdır; JAK1 ve JAK2 çeşitli dokularda ve hücrelerde yaygın olarak dağılmıştır. Ayrıca STAT1, STAT2, STAT4, STAT5a, STAT5b ve STAT6 gibi STAT3 ailesinin altı farklı üyesi vardır (97). STAT3 aktivasyonu, astrositlerde GFAP ekspresyonunu artırarak reaktif gliosis oluşturur. Mikroglialarda ise M1 fenotipine dönüşümünü sağlayan TNF α ve IL-1 β üretimini tetikler. Uzun vadede STAT3 aktivasyonu, öğrenme ve hafıza işlevlerinin zayıflamasına yol açan yapısal ve işlevsel beyin değişikliklerine neden olur. Özellikle JAK2/STAT3 eksen, merkezi sinir sisteminde inflammatuar yanıtların düzenlenmesinde ve astrosit/mikroglia aktivasyonunda belirgin rol oynar (98). KSH gibi durumlarda bu yolun anormal aktivasyonu, inflamasyonun devamlılığını sağlayarak bilişsel bozulmayı hızlandırabilir. KSH ortamında artan IL-6 düzeyleri, bu yolu aktif hale getirerek mikroglia ve astrositlerin proinflammatuar fenotipe geçmesini destekler (6) (Şekil 7).



Şekil 7: JAK2/STAT3 sinyal yolu, sitokinlerin reseptörlerine bağlanmasıyla tetiklenir. Bu etkileşim, JAK2'nin aktivasyonu ve STAT3'ün tirozin fosforilasyonuna yol açar. Fosforile STAT3 (p-STAT3), homodimer veya heterodimer oluşturarak çekirdeğe taşınır ve sitokine duyarlı genlerin transkripsiyonunu başlatır (97).

2.2.3. KSH ve sinaptik disfonksiyon

KSH, demans ve diğer nörodejeneratif hastalıklarda bilişsel gerileme ve dejeneratif süreçlerin altında yatan yaygın bir patofizyolojik mekanizmadır. KSH sırasında düşük serebral kan akışı, hemodinamik ve enerji metabolizmasının homeostazında bozukluklara yol açar ve bu da oksidatif strese, astrositlerin aşırı aktivasyonuna ve sinaptik protein yapımında azalmaya neden olur (99). Bu olaylar KSH'den sonra sinaptik plastisiteye ve bilişsel işlev bozukluğuna katkıda bulunur. KSH mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres, glial aktivasyon ve nöroinflamasyon gibi olaylar zinciri, nöronal hasar ve sinaptik kayıp ile sonuçlanır (71).

Sinaptik disfonksiyon, nöronlar arası iletişimin yapısal veya işlevsel düzeyde bozulması olarak tanımlanır ve birçok nörodejeneratif hastalığın erken evresinde ortaya çıkan kritik bir patolojik süreçtir. KSH ile ilişkili bilişsel bozulmaların, sadece nöronal kayıplarla değil, daha erken evrede gelişen sinaptik disfonksiyon ve mikro damarsal dejenerasyon ile başladığına dair giderek artan kanıtlar mevcuttur (28, 29). KSH altında, sinaptik yapılar oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon ve inflamatuvar yanıtların etkisiyle zarar görür. Bu süreçte glutamaterjik sistemdeki bozulmalar, glutamatın geri alımının yetersizliği ve N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin aşırı aktivasyonu sinaptik toksisiteye yol açar. Ayrıca, sinaptik plastisite için gerekli olan nörotrofik faktörlerde –özellikle BDNF ve sinir büyüme faktörü (NGF) belirgin bir azalma gözlenir (27).

KSH sinaptik protein kaybı ve yapısal değişiklikler ile ilişkilidir (5). KSH'ye maruz kalan hayvan modellerinde, postsinaptik yoğunluk proteinlerinden (PSD-95), sinaptik vezikül proteini sinaptofizin ve yapısal sinaps proteinlerinde anlamlı düzeyde azalma tespit edilmiştir (30). Bu proteinlerin kaybı, sinapsın hem iletim kapasitesini hem de yapısal bütünlüğünü zayıflatmakta ve sinaptik bağlantı sayısının azalmasına neden olmaktadır. KSH'de en sık etkilenen bölgeler hipokampusün cornu ammonis CA1 ve CA3 alanları ile PFC'dir (69). Bu alanlar, hafıza ve yürütücü işlevlerde kritik rol oynadığından, sinaptik disfonksiyon bilişsel bozulmaların en erken habercisi olabilir. Sinaptik plastisite, öğrenme ve hafıza gibi yüksek bilişsel işlevlerin temelini oluşturur (99). Bu sürecinin önemli bir göstergesi olan LTP, nöronal devrelerin fonksiyonel adaptasyonuna olanak sağlar ve özellikle öğrenme ve bellek konsolidasyonunda kritik rol oynar (100). Ancak KSH ya da iskemi koşullarında LTP mekanizmalarında belirgin bozulmalar gözlenmektedir. LTP'nin oluşumu ve sürdürülmesi için gerekli olan CREB, uzun süreli

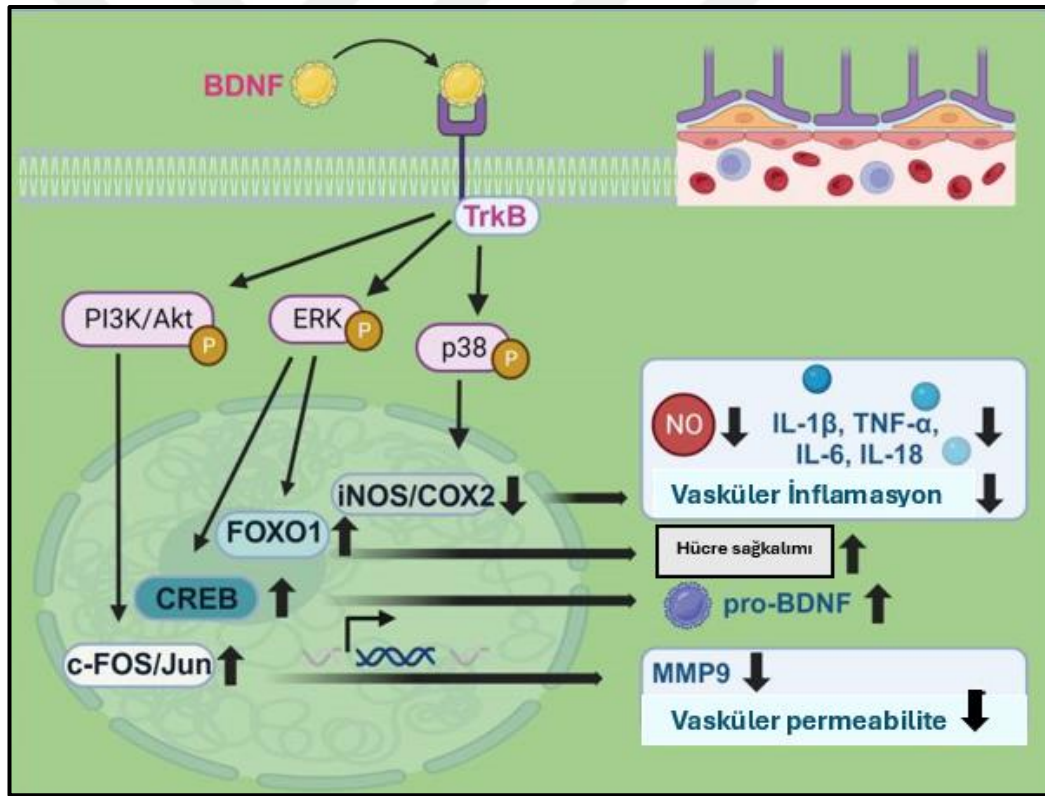
belleğin moleküler düzeydeki anahtar düzenleyicilerindendir. KSH gibi stres durumlarında CREB'in fosforilasyonu ve transkripsiyonel aktivitesi inhibe edilebilmekte, bu da sinaptik plastisiteyi ve hafıza oluşumunu olumsuz etkileyebilmektedir. Sinaptik yapılar, serebral iskemiye karşı özellikle duyarlıdır. İskemik hasarı takiben dendritik yapılarda ve sinaptik yoğunlukta belirgin azalmalar olur. Bu yapısal bozulmalar, nöronlar arası iletişimin zayıflamasına ve bilişsel fonksiyonlarda gözlemlenen gerilemeye katkıda bulunur (99). Yapısal plastisitenin önemli biyobelirteçlerinden olan mikrotübül ile ilişkili protein 2 (MAP-2) ve sinaptofizin, sinaptik bütünlüğün korunmasında kritik rol oynar. Yapılan çalışmalarda, KSH sonrasında hem MAP-2 hem de sinaptofizin ekspresyon düzeylerinde anlamlı azalmalar tespit edilmiştir. Bu durum, sinaptik dejenerasyonun ilerlediğini ve yapısal plastisitenin geri döndürülemez şekilde bozulduğunu düşündürmektedir (101). Aynı zamanda, BDNF/TrkB ve Akt/CREB yollarının da baskılanması, sinaptik disfonksiyonu daha da derinleştirmektedir (27).

2.2.3.1. Kronik serebral hipoperfüzyon ve BDNF

BDNF, nöronal gelişim, sağkalım, farklılaşma ve sinaptik plastisiteyi destekleyen, merkezi sinir sisteminde yaygın olarak bulunan bir nörotrofindir. BDNF, başlıca hipokampus, PFC ve serebral kortekste sentezlenir ve etkilerini, yüksek afiniteli reseptörü olan TrkB'ye bağlanarak gösterir. BDNF/TrkB sinyal yolları; sinaptik güçlenme, LTP ve hafıza konsolidasyonu gibi bilişsel işlevlerde hayati rol oynar (30). KSH'ye bağlı hipoksi ve enerji eksikliği, nöronal aktiviteye duyarlı transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonunu engeller ve bu da BDNF gen ekspresyonunun baskılanmasına neden olur (27, 102). KSH koşullarında, BDNF mRNA hem de protein düzeylerinde azalma bildirilmiş; bu azalma sinaptik proteinlerde düşüş, LTP inhibisyonu ve bilişsel performansta gerileme ile ilişkilendirilmiştir (103). BDNF düzeylerinin azalması aynı zamanda Akt/CREB ve fosfoinozitid 3-kinaz (PI3K)/Akt gibi sinyal yollarının da zayıflamasına neden olur, bu da sinaptik kaybı derinleştirir (27, 30).

BDNF/TrkB sinyal yolu, yalnızca sinaptik plastisiteyi değil; aynı zamanda hücre sağkalımı, vasküler bütünlük ve inflamasyonun düzenlenmesini de etkileyen çok yönlü bir moleküler ağı parçasıdır. BDNF, TrkB'ye bağlanarak PI3K/Akt sinyal yolunu aktive eder. Bu aktivasyon, anti-apoptotik genlerin uyarılmasına ve hücre sağkalımının desteklenmesine yol açar. Akt sinyali aynı zamanda hücrel Fos proto-onkogeni/hücrel Jun proto-onkogeni (c-Fos/Jun) transkripsiyon komplekslerini modüle eder; bu sayede

matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9) sekresyonu azalır ve vasküler geçirgenlik baskılanır. Bu mekanizma hem serebral vasküler bariyerin korunmasına hem de iskemik stres sonrası beyin dokusunun yapısal stabilitesine katkı sağlar. BDNF aynı zamanda ERK fosforilasyonunu da uyarır. Bu yolak üzerinden forkhead kutusu protein O1 (FOXO1) ve CREB transkripsiyon faktörlerinin aktivitesi artar. CREB aracılığıyla sinaptik plastisiteyle ilişkili genlerin transkripsiyonu artarken, FOXO1 yoluyla oksidatif stres yanıtı düzenlenir. BDNF/TrkB sinyalizasyonu ayrıca pro-BDNF üretimini artırarak pozitif geri besleme mekanizması oluşturur. BDNF/TrkB sinyalleme, p38 mitojen-aktif protein kinazı (MAPK) fosforilasyonunu, indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve siklooksijenaz-2 (COX-2) ekspresyonunu inhibe eder. Bu yolla nitrik oksit (NO) üretimi sınırlanır ve IL-1 β , TNF- α , IL-6 ve IL-18 transkripsiyonu baskılanır. Bu etkiler birlikte vasküler inflamasyonun ve nöroinflamasyonun hafifletilmesine katkı sağlar (30, 36) (Şekil 8).



Şekil 8: BDNF/TrkB sinyal yolağı. (BDNF, beyinden türetilen nörotrofik faktör; TrkB, tropomiyozinle ilişkili kinaz B; PI3K, fosfoinozotid 3-kinazlar; MMP9, matris metalloproteinaz 9; ERK, hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz; FOXO1, Forkhead kutusu O1; CREB, cAMP-tepki elementi bağlayıcı protein; iNOS, uyarılabilir nitrik oksit sentaz; COX2, siklooksijenaz-2; NO, nitrik oksit; IL, interlökin; TNF, tümör nekroz faktörü) (36).

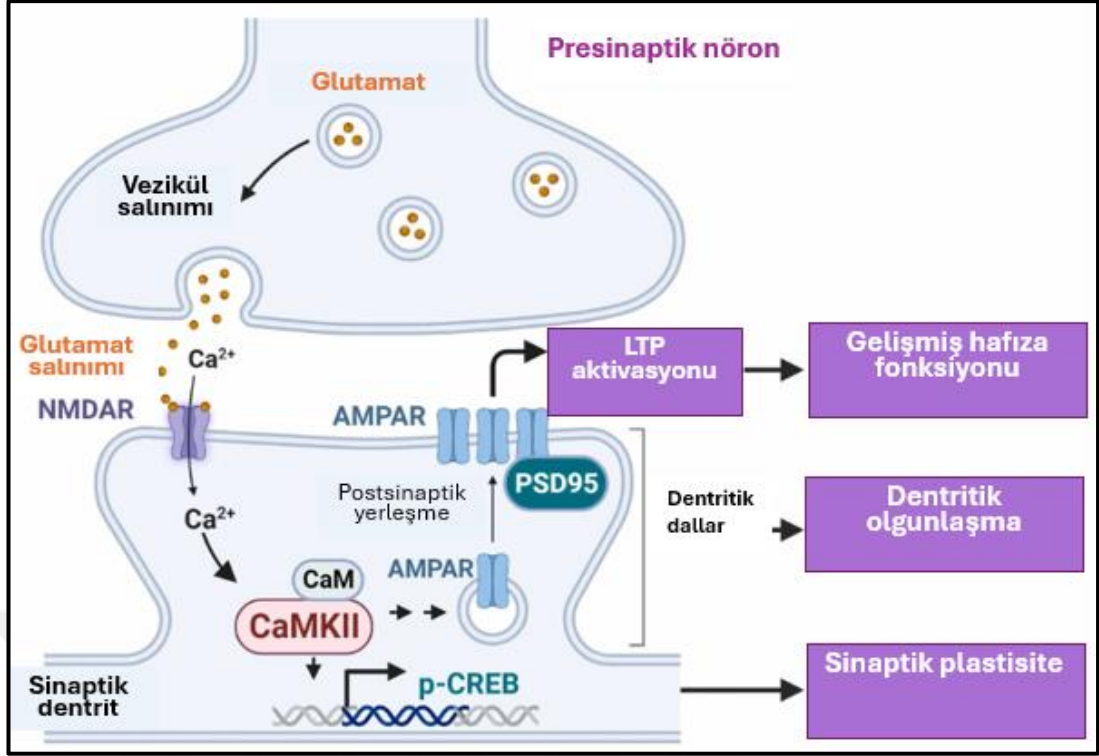
2.2.3.2. Kronik serebral hipoperfüzyon ve CREB

CREB (CREB1), CRE modülatörü (CREM), aktive edici transkripsiyon faktörü-1 (ATF-1) olmak üzere üç ana üyeden oluşur. CREB1 geni, bilinen tüm izoformların transkripsiyonundan sorumludur. En yaygın olanı CREB- α izoformudur; ancak β ve Δ formları da eksprese edilir. CREB α ve Δ izoformlarından yoksun farelerin kısa süreli belleği etkilenmemiş olsa da uzun süreli bellekte belirgin bozulmalar görülmüştür. Bu durum, CREB'in özellikle uzun süreli hafıza oluşumundaki temel rolünü desteklemektedir (104, 105). CREB glutamat, BDNF, dopamin, serotonin, insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1), östrojen gibi çeşitli nörotransmitterler, büyüme faktörleri ve hormonlarla aktive olur. Bu ligandlar genellikle cAMP/PKA, Ca^{2+} /CaMKII, PI3K/Akt, ve MAPK/ERK yolları üzerinden CREB'in Ser133 fosforilasyonunu sağlayarak transkripsiyonel etkinliğini başlatır (106). Nöronal aktiviteye yanıt olarak fosforile olan CREB, nöronal sağkalım ve hücre adaptasyon için gerekli olan birçok genin transkripsiyonunu düzenler. Ancak KSH gibi uzun süreli iskemik koşullar altında CREB'in ekspresyonu ve aktivitesi anlamlı şekilde azalır. 2VO modelinde bilişsel düşüşle birlikte hayvanların hipokampuslerinde CREB fosforilasyonunun azaldığı, buna paralel olarak sinaptofizin, sinaptotagmin-I, sinapsin I, PSD-95, p-NMDA2B ve p-CaMKII- α dahil olmak üzere sinaptik plastisite ile ilişkili proteinlerin de azaldığı bildirilmiştir (27). BDNF, glutamat, dopamin, serotonin, IGF-1, östrojen gibi çeşitli nörotransmitterler, büyüme faktörleri ve hormonlarla aktive olur. Bu ligandlar genellikle cAMP/PKA, Ca^{2+} /CaMKII, PI3K/Akt, ve MAPK/ERK yolları üzerinden CREB'in Ser133 fosforilasyonunu sağlayarak transkripsiyonel etkinliğini başlatır (106).

2.2.3.3. Kronik serebral hipoperfüzyon ve CaMKII

CaMKII hücre içi kalsiyum sinyallerine duyarlı serin/treonin kinaz ailesine ait bir enzimdir. Hem periferik organlarda hem de MSS çeşitli hücresel sinyal yollarında kritik rol oynar. CaMKII, RNA eklenmesi, ROS üretimi, hücre iskeletinin düzenlenmesi ve protein-protein etkileşimleri gibi mekanizmalar aracılığıyla çok yönlü işlevler üstlenir. MSS'de ise özellikle vasküler tonusun düzenlenmesi, nöronal ağların bütünlüğü, LTP, nörotransmisyon, sinaptik plastisite, amiloid beta aracılı nörotoksisite, lipid metabolizması ve mitokondriyal işlevler üzerinde belirleyici rol

oyunar (32). En çok çalışılan izoformu CaMKII α 'dır ve özellikle beyin, kalp ve iskelet kası dokularında bol bulunur (107). CaMKII, 12-14 alt birimden oluşan holoenzim yapısına sahiptir. Aktivasyonu, Ca²⁺/kalmodulin kompleksine bağlanma ile başlar. Ardından CaMKII α veya CaMKII β bölgesinde otofosforilasyon meydana gelir. Bu fosforilasyon, enzimin Ca²⁺ olmadan da aktif kalmasını sağlar ve buna "Ca²⁺ bağımsız aktivite" denir. CaMKII, özellikle hipokampus ve PFC gibi bölgelerde LTP süreçlerinin merkezindedir. NMDA reseptörleri aracılığıyla hücreye giren Ca²⁺, CaMKII'yi aktive eder ve bu da α -Amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionik asit (AMPA) reseptörlerinin fosforilasyonunu, sinaptik güçlenmeyi ve yeni sinaps oluşumu sağlar (32, 33, 108). CaMKII'nin otonom olarak aktive olmasını sağlayan CaMKII α otofosforilasyonu, glutamaterjik sinyalizasyonun öğrenme ve hafıza süreçlerine adaptif yanıtlar verebilmesini sağlar (107). KSH oluşturulmuş sıçanlarda p-CaMKII, ve p-CREB seviyelerinin azaldığı ve aynı şekilde bilişsel fonksiyonlarında bozulma olduğunu bildirilmiştir (35). CaMKII, nörotransmitter iletiminde ve sinaptik plastisitenin düzenlenmesinde önemli rol oynar dolayısıyla CaMKII seviyelerindeki düşüş bilişsel bozuklukla ilişkili olabilmektedir (33). KSH, oksidatif stres, glutamat eksitotoksitesisi ve inflamasyon gibi birçok ve kompleks bir patofizyolojiyi indükler. Son bilimsel veriler; KSH' ta CaMKII'nin düzenlenmesinin nöronal ölüm, nöroinflamasyon ve endotel bariyerinin bozulması gibi süreçlerde nöroprotektif bir rol oynadığını işaret etmektedir (27, 102, 108) (Şekil 9).



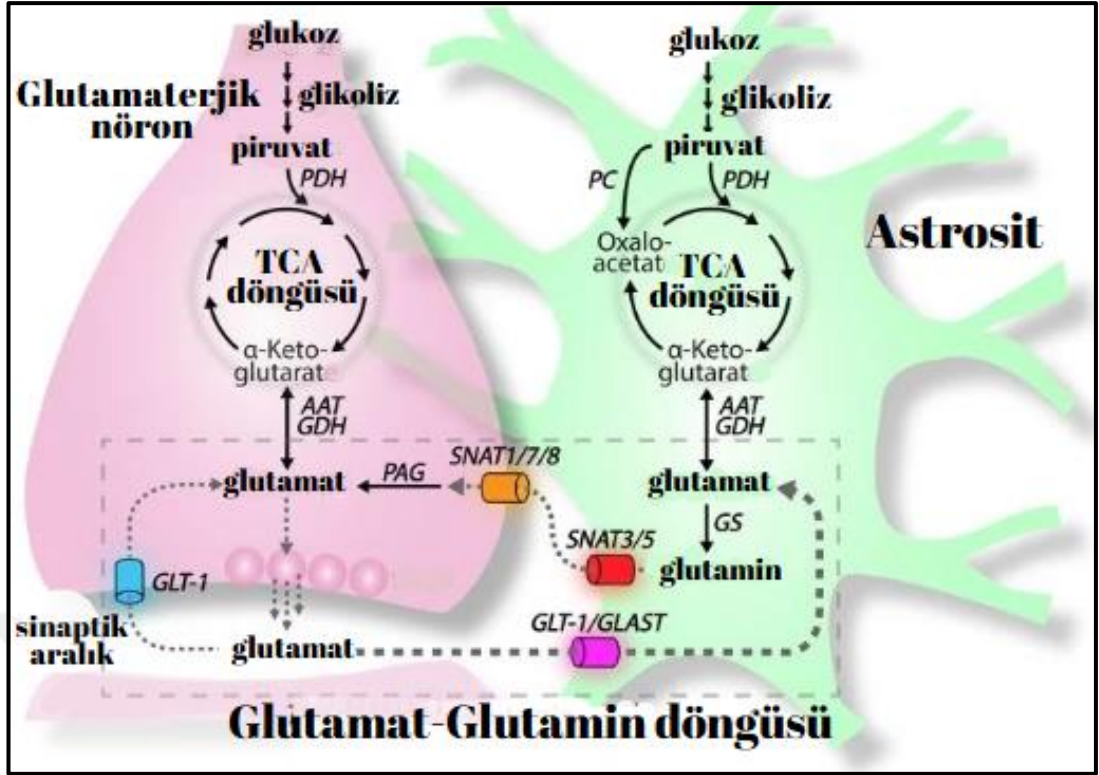
Şekil 9: CaMKII ve NMDAR bağımlı bilişsel işlevlere katkısı. CaMKII, kalmodulin'e (CaM) bağlanır ve N-metil-D-aspartat reseptörü (NMDAR) aracılığıyla Ca^{2+} sinyallemesinin neden olduğu α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit reseptörü (AMPA) ekspresyonunu artırır. Daha sonra, CaMKII, NMDAR-AMPA bağımlı PSD95 ekspresyonu aracılığıyla uzun süreli potansiyasyon (LTP) indüksiyonunu hızlandırır ve bu da gelişmiş hafıza fonksiyonuna yol açar. Ayrıca, CaMKII, cAMP yanıt elementi bağlayıcı proteinin (CREB) fosforilasyonunu aktive ederek sinaptik plastisite ve dentritik dalların olgunlaşmasında iyileşmeye yol açabilir (32).

2.2.4. Kronik serebral hipoperfüzyon ve glutamaterjik sistem

MSS'de en fazla bulunan non esansiyel aminoasit olan glutamat beyinde en önemli eksitator nörotransmitter olarak bilinmektedir ve glutaminden sentezlenir. MSS'deki nöronların %90'ı sinaptik iletide glutamat salgılar. Astrositler ve nöronlardaki glutamat metabolizmasının fizyolojik sınırlar içinde devam etmesi, beyin fonksiyonlarının sürdürülebilmesi için zorunludur. Glutamat öğrenme, hafıza gibi bilişsel fonksiyonlar için önemlidir. Dolayısıyla glutamaterjik sistemdeki bozukluk epilepsi, nörodejeneratif hastalıklar, iskemi gibi birçok patoloji ile ilişkilidir. Nöron ve astrositlerde mitokondriyal glutaminaz aracılığı ile glutaminden sentezlenir. Glutamat

ayrıca trikarboksilik asit (TCA) siklusunda bir ara ürün olan α -ketoglutaratın, glutamat dehidrojenaz enzim aracılığı ile de sentezlenmektedir (109).

Glutamat vezikülleri presinaptik membran yüzeyine bağlanarak glutamati sinaptik aralığa boşaltır. Glutamat daha sonra postsinaptik nöronlardaki reseptörleri olan NMDA reseptörlerini aktive eder. Glutamat'ın NMDA reseptörleri dışında iyon kanalı özelliğine sahip AMPA ve kainat reseptörleri bulunur. Ayrıca glutamat G proteinine bağlı metabotropik glutamat reseptörleri olarak bilinen reseptörleri aracılığı ile de etki gösterir (27). İstirahat sırasında 0.6 μ M olan glutamat düzeyleri reseptörlerin aktive olması esnasında yaklaşık 10 μ M a ulaşır. Sinaptik aralıktaki glutamat konsantrasyonlarının hızlı bir şekilde düşürülmesi aşırı uyarılmanın ve nörotoksisitenin engellenmesi için son derece önemlidir. (109-112). Astrositlerin ve nöronların plazma zarlarında yer alan glutamat taşıyıcıları vasıtasıyla glutamat hızla uzaklaştırılmış olur. Bu taşıyıcılar hücre içi glutamat taşıyıcıları ve plazma membran taşıyıcıları olmak üzere iki sınıfa ayrılabilir. Hücre içi glutamat taşıyıcıları veziküler glutamat taşıyıcıları (VGLUT), plazma membranı uyarıcı aminoasit taşıyıcıları (EAAT) ve glutamat-sistein dönüştürücü bir grup glutamat taşıyıcı üyesinde oluşan bir aileyi oluşturur. Plazma membran taşıyıcıları ise yüksek afiniteli glutamat taşıyıcıları ve Na-Cl birleştirilmiş taşıyıcılardır. MSS'de glutamat taşınması büyük çoğunlukla yüksek afiniteli sodyuma bağımlı EAAT'ler aracılığı ile gerçekleşir. EAAT'lerin beş farklı alt tipi vardır. Tüm glutamat taşıyıcıları arasına EAAT-2/GLT-1 hipokampus ve kortekste glutamat taşıyıcılarının %80'ini oluşturur ve başta astrositlerde eksprese edilebilmektedir (36). Azalmış glutamat taşıyıcı proteinleri ile nörodejeneratif hastalıklar arasındaki bağlantı birçok çalışmada gösterilmiştir. Örnek olarak GLT-1/EAAT-2 seviyelerinin yaş ile azalması, GLT-1 oksidasyonun artmasıyla inaktive edilmesi, nöronlarda bu taşıyıcıların anormal ekspresyonu glutamat nörotoksisitesi ile sonuçlanır ve nörodejeneratif hastalıkların oluşumuna katkı sunar. Bu nedenle birçok farmakolojik çalışma Glutamat taşıyıcılarının ekspresyonun veya aktivasyonlarının yeniden arttırılmasını hedeflemektedir (40, 109) (Şekil 10).

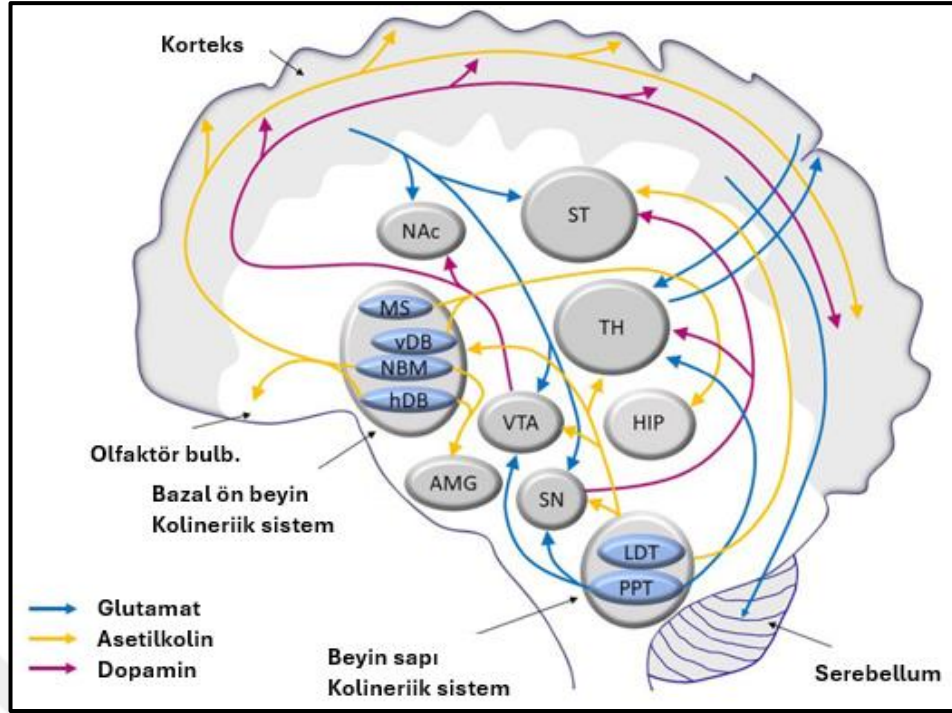


Şekil 10: Glutamat-glutamin döngüsü. Glutamat-glutamin döngüsü, nöronlar ve astrositler arasında gerçekleşen ve sinaptik glutamatın geri dönüşümünü sağlayan temel bir süreçtir. Bu döngüde glutamat, glukozdan sentezlenir ve enerji metabolizmasıyla (özellikle TCA döngüsü) yakından ilişkilidir. Astrositler, pirüvat karboksilaz (PC) enzimi ile pirüvatı oksaloasetata çevirerek glutamat sentezi için gerekli anaplerotik desteği sağlar. Glutamat, presinaptik nöronlardan sinaptik aralığa salınır ve postsinaptik nöronlarda uyarıcı sinyal iletimini sağlar. Glutamatın sinaptik aralıktan temizlenmesi ağırlıklı olarak astrositler tarafından GLT-1 ve GLAST taşıyıcıları aracılığıyla, daha az oranda ise nöronal GLT-1 ile gerçekleşir. Astrositlerde glutamat, yalnızca bu hücrelerde bulunan glutamin sentaz (GS) enzimi ile glutamine dönüştürülür. Glutamin, astrositlerden SNAT3/5 taşıyıcılarıyla salınır ve nöronlara SNAT1/7/8 aracılığıyla alınır. Nörona giren glutamin, glutaminaz (PAG) tarafından glutamata çevrilerek döngü tamamlanır. Glutamat ayrıca hem nöron hem de astrositlerde aspartat aminotransferaz (AAT) ve glutamat dehidrogenaz (GDH) ile TCA döngüsünde oksidatif olarak metabolize edilebilir. Bu döngü, glutamaterjik nörotransmisyonun devamlılığı ve beyin enerji dengesinin sağlanması açısından kritik öneme sahiptir (109).

Sinaptik aralıktaki glutamat konsantrasyonunun yükselmesi aşırı uyarılma sonucu nöronal toksisite ile sonuçlanır ve buna eksisitotoksisite adı verilir. Yapılan birçok çalışmada eksisitotoksisitenin nöronal hücre ölümüne yol açarak nörodejeneratif hastalıkların etyopatogenezinde rol aldığı gösterilmiştir (40, 71). İlerleyen yaş ile eksisitotoksisite, astrositlerin glutamat taşımasında bozukluklar, glutamat seviyelerinde azalma, nöron yoğunluğu ve boyutlarında azalma, dentritik dallanmalarda ve aksonal bağlantılarda azalma meydana gelir (113). İleri yaşla beraber daha sık görülemeye başlayan inme, serebral iskemi ve hipoperfüzyon gibi durumlarda glutamat eksisitotoksisite ile nörodejeneratif hastalıkların diğer bir nedeni olarak kabul görmektedir. Gerek önemli bir mortalite ve morbidite nedeni olan serebrovasküler hadiselerde gerekse hayvan çalışmalarında oluşturulan kronik serebral hipoperfüzyon modellemelerinde azalan ATP ve oksijen seviyelerine karşı veziküllerden sinaptik aralığa yoğun bir glutamat salınımının olduğu ve glutamat taşıyıcılarının seviyelerinde azalma olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu durum nöronal hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır. Serebral iskemi ve enfarktüs sonrası beyin omurilik sıvısı (BOS) glutamat seviyelerinin yüksek olması bu durumu desteklemektedir. GLT-1 gibi glutamat taşıyıcılarının glutamat seviyelerini azaltarak iskemi sonrasında nöroprotektif bir etki oluşturduğu kabul edilmektedir (111, 112).

2.2.5. Kronik serebral hipoperfüzyon ve kolinerjik sistem

Kolinerjik sistem hafıza ve öğrenmede rol oynar ve kolinerjik nöronların kaybı bilişsel işlevin bozulması ile ilişkilidir ve AH etiyojisinde en erken olay olarak kabul edilir. Buna karşılık, glutamaterjik nöronlar MSS’de en bol bulunanlardır ve bunların kaybı beyin atrofisinde en büyük payı oluşturur (56) (Şekil 11).

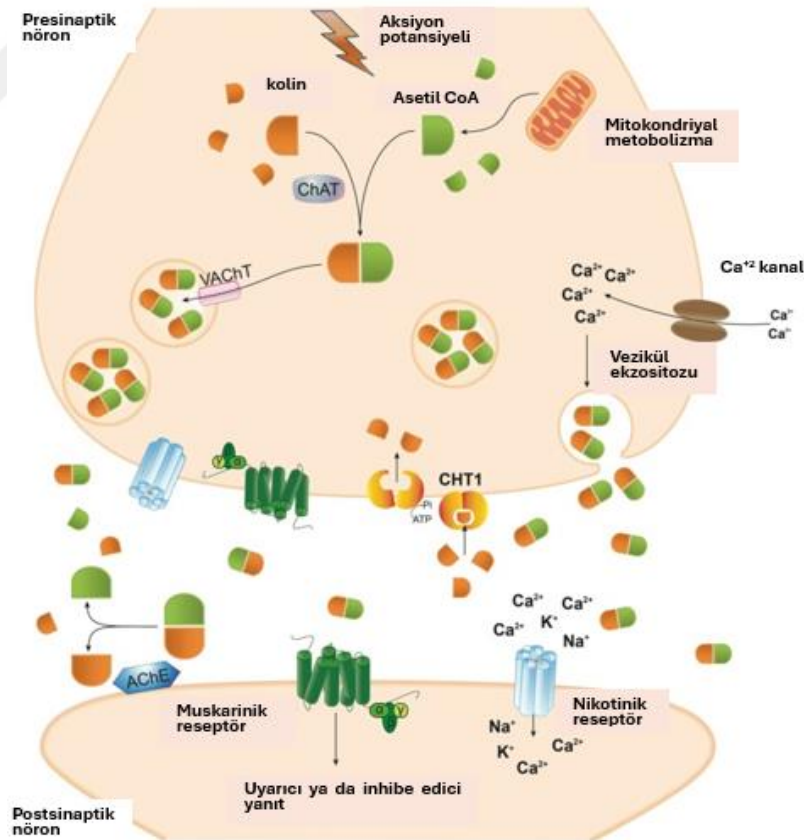


Şekil 11: İnsan beynindeki ana glutamaterjik, kolinerjik ve dopaminerjik nörodevrelerin şeması ve bunların birleşmesi. (AMG, amigdala; hDB, Broca'nın diyagonal bandının yatay kolu; HIP, hipokampus; LDT, laterodorsal tegmental çekirdek; MS, medial septum; NAc, nucleus accumbens; NBM, Maynert'in nucleus basalis'i; PPT, pedunkülopontin tegmental çekirdek; SN, substantia nigra; ST, striatum; TH, talamus; vDB, Broca'nın diyagonal bandının dikey kolu; VTA, ventral tegmental alan) (56).

Merkezi kolinerjik sistem disfonksiyonu AH ve VaD'li hastaların patogeneğinde ortak noktadır. Özellikle hipokampus ve neokortekste yoğun şekilde bulunun kolinerjik nöronların kaybı ve öğrenme ve hafıza gibi nörobilişsel faaliyetlerde gerilemeye neden olmaktadır (36, 114). Günümüzde, kolinesteraz inhibitörleri AH için uygulanan birinci basamak ilaçlardır. Donepezil, rivastigmin ve galantamin klinik olarak kullanılan üç ana kolinesteraz inhibitörüdür. Birçok çalışma, demans hastalarında artan asetilkolin tedarikinin bilişsel gerilemeyi azaltmaya yardımcı olduğunu ortaya koymuştur (115).

Beyinde özellikle hafıza, dikkat, algı, öğrenme gibi faaliyetlerin yürütülmesinde sorumlu kolinerjik nöronlar ön beyinde yoğunlaş bir şekilde bulunmaktadır. Hipokampüste CA1-CA4 ve dental girusta bulunan kolinerjik nöronlar septohipokampal yol olarak adlandırılır ve uzamsal öğrenmede rol alırlar (116).

Yapılan çalışmalarda septohipokampal bölgeye verilen hasar sonucu T-labirent testinde uzamsal öğrenmenin kaybolduğu ya da gecikmeye yol açtığı bildirilmiştir (117). Asetilkolin kolinerjik nöronların sitoplazmasında ChAT enzimi tarafından asetil CoA ve kolin sentezlenir. Asetil CoA mitokondride sentezlenir. Kolinin çoğu ise diyetle karşılanır. Veziküler asetilkolin taşıyıcılarıyla asetilkolin veziküllerinde depolanır. Presinaptik depolarizasyon ile veziküllerdeki asetilkolin sinaptik aralığa geçer ve postsinaptik muskarinik ve nikotinik reseptörler ile etkileşim başlar. Glutamat/glutamin siklusuna benzer şekilde sinaptik aralıkta artan kolin seviyeleri ile AChE enzimi aktive olur ve asetilkolin'i kolin ve asetat'a ayırır. Özelleşmiş kolin taşıyıcıları aracılığı ile kolin presinaptik nöronlara taşınır ve tekrardan asetilkolin sentezlenmek üzere kolin havuzuna dahil edilir (118). ACh, AChE tarafından hızla ortamdan uzaklaştırıldığından, kolinerjik sistemin hasarının ve onarımını değerlendirebilmek için çalışmalarda, ChAT ve AChE'nin ekspresyonu ve aktivitesinin saptanmasıyla dolaylı olarak değerlendirilebileceğini göstermiştir (9) (Şekil 12).



Şekil 12: Asetilkolin nörotransmisyonunu içeren biyolojik yönlerin şematik gösterimi (118).

İlerleyen yaşla beraber kolinerjik nörotransmisyon sistemdeki fonksiyonel kayıplar azalmış asetilkolin, kolin, kolin asetiltransferaz gibi biyobelirteçlerin düzeylerinde farklılaşma ile açıklanmaktadır. Beyin ön bölgesinde Meynert bazal çekirdeği, hipokampus, neokortekste azalan kolinerjik sistem aktivitesi öğrenme hafıza gibi bilişsel fonksiyonlarda gerilemeye yol açmaktadır. (119). Nörodejeneratif hastalıklarda ve özellikle Alzheimer'da, fonksiyonel olarak ilk bozulmaya başlayan bölgelerin hipokampus ve meynert bazal çekirdeğinde olduğu düşünülmektedir (120).

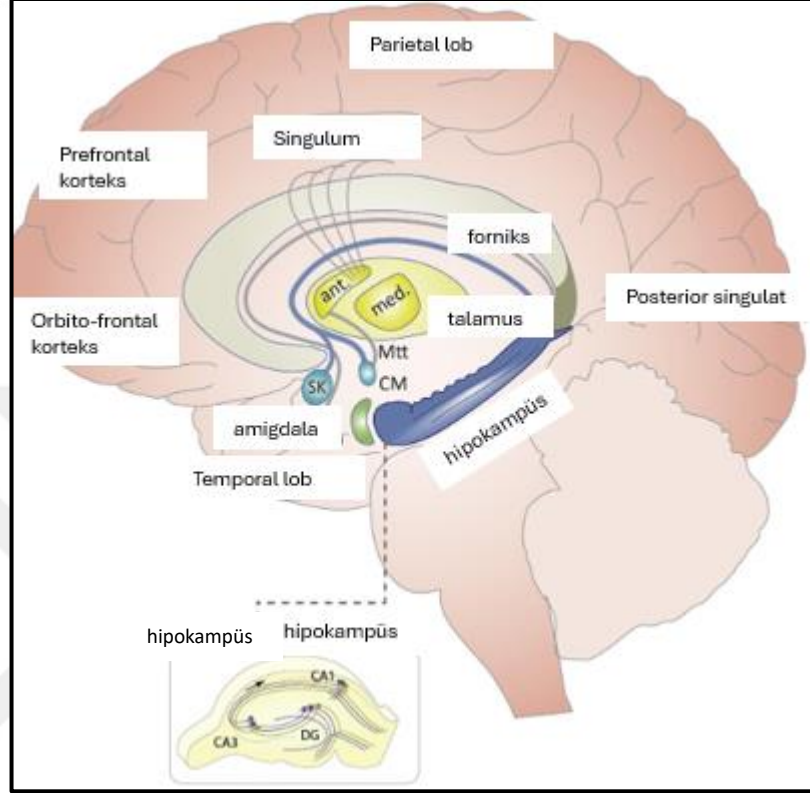
MSS de bulunan kolinerjik nöronlar aktivasyon ya da inhibisyonla ziyade modülatör işlevleri ile faaliyet göstermekte olup periferik nöronların aksine Ca^{2+} aracılı iyon kanallarını kullanmaktadır. Bu farklılık MSS'deki asetilkolin reseptörlerine modülatör fonksiyonlarının kazandırılmasını sağlamaktadır. Asetilkolin salınımı ile presinaptik bölgede Ca^{2+} artışı sağlar. Bu da diğer nörotransmitterler olan glutamat, gama aminobütirik asit (GABA), dopamin, serotonin gibi farklı nörotransmitterlerin regülasyonlarına katkı sağlamaktadırlar. Öğrenme ve hafıza gibi bilişsel fonksiyonlar bu nörotransmisyon regülasyonu ve etkileşimi ile sağlamaktadır (118) (Şekil 11).

Serebral iskemi hipokampus, korteks, striatum gibi hipoperfüzyona duyarlı bölgelerde bulunan kolinerjik nöronların hasarına neden olur. Kolinerjik nörotransmisyon sistemde bozulma, nöroinflamasyon, oksidatif stres, biriken ROS nedeni ile bilişsel fonksiyonlarda bozulma meydana gelir (9). Yapılan çalışmalarda kronik serebral hipoperfüzyon oluşturulmuş sıçanlarda beyinde asetilkolin ve muskarinik reseptör seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir (121). Ayrıca KSH ve Alzheimer sıçan modellerinde hipokampal dokuda AChE aktivitesinin arttığı ve bilişsel düşüş olduğu bildirilmiştir (9, 122). Hipokampal kolinerjik sistem medial septumdaki ve brokodiyoğonal banttaki nöronlar tarafından iletilir. Bu iletim dikkat, öğrenme, hafıza fonksiyonları ile ilişkilidir (119).

2.3. Hipokampusun Anatomik Yapısı ve Fonksiyonel Bağlantıları

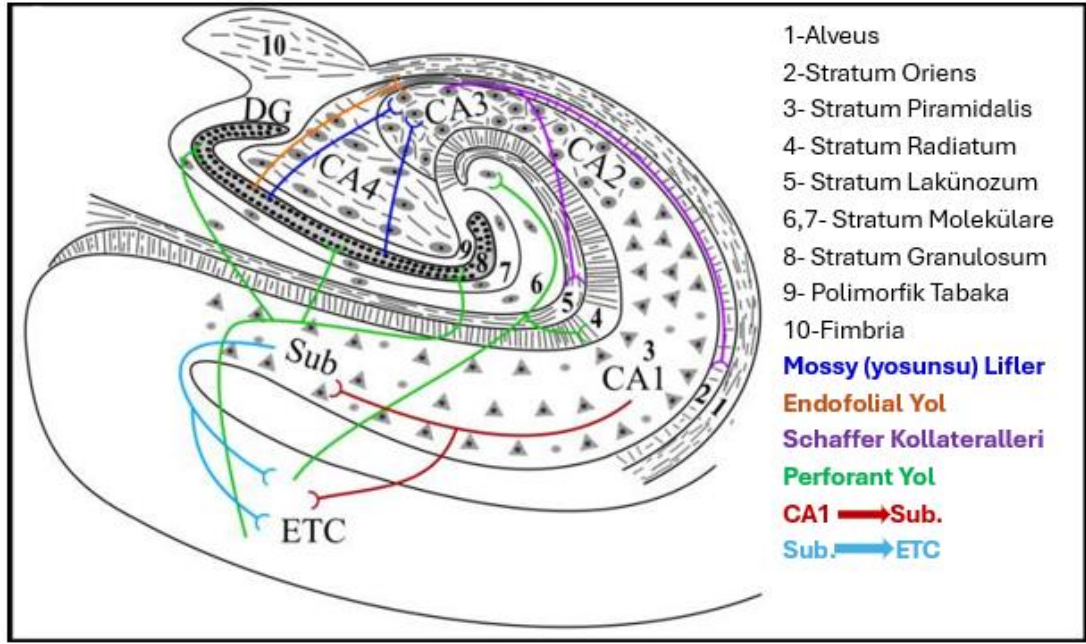
Hipokampus anatomik olarak beynin gri cevher tabakasında lokalize lateral ventrikülün temporal hornunda, temporal lobun medialinde uzanım gösteren bir yapıdır. Aslında temporal lobun medial kısmı limbik sistemi oluşturan amigdala, dentat girus, parahipokampal girus ve hipokampusu barındırır ve bu yapılar iç içe geçmiş şekilde bütünlük gösteren yapılardır. Hipokampus dentat girus (DG), Cornu ammonis ve subikulum (Sub) olmak üzere üç bölümden oluşmaktadır. CA ve dentat

girus C şeklinde bir formasyonla birleşir ve Cornu ammonis, dentat girusu CA1-CA2-CA3-CA4 alanları ile çevreler. CA1 ile entorinal korteks arasında yer alan subikulum, hipokampusun entorinal kortekse açılan çıkış bölgesidir (123, 124) (Şekil 13).



Şekil 13: Hipokampus ve öğrenme ve bellekte yer alan beyin bölgelerinin başlıca anatomisi. (Ant, anterior talamik çekirdekler; CA, cornu ammonis; MB, mamiller cisimler; Med, medial talamik çekirdekler; MTT, mamillotalamik yol) (123).

Hipokampus, altı katmanlı neokorteksin aksine, belirgin üç katmanlı laminaları nedeniyle klasik olarak arşikorteks olarak adlandırılır. Hipokampüste, trisinaptik döngü olarak adlandırılan temel bağlantı sistemi: Entorinal korteksten dentat girusa uzanan perforant yollar, dentat girustan CA3'e giden mossy lifleri, CA3'ten CA1'e ulaşan Schaffer kollaterallerini içerir. Son aşamada, CA1'den entorinal kortekse geri dönen projeksiyonlarla döngü tamamlanır. Subikulum ve CA alanlarından entorinal kortekse yönelen geri bildirici bağlantılar, hipokampusün yalnızca bilgi alan değil, aynı zamanda bilgiyi geri ileten çift yönlü bir merkez olduğunu gösterir (123, 125) (Şekil 14).



Şekil 14: Hipokampüse ait tabakalar ve bilginin işlenmesinde rol oynayan trisinaptik yol (125).

Entorinal korteksten gelen veriler dentat girus aracılığıyla hipokampal CA alt bölgelere dağılır ve buradan da birçok kortikal ve subkortikal yapıya iletilir. CA3 aksonları tarafından CA1'e gönderilen sinaptik iletilerin yanı sıra CA3'teki diğer nöronlarla olan bağlantıları CA3 bölgesini disosiyatif hafıza yeteneği konusunda daha benzersiz kılmaktadır (126). Hipokampal bölgeler kortikal ve subkortikal bağlantı bölgelerine sahiptir. Entorinal korteksten giren kortikal veriler dentat girus tarafından alınır ve Cornu ammonisin farklı alt birimlerine dağılır. Bu sayede birçok kortikal ve subkortikal beyin yapılarına yayılır (125). Ancak son zamlarda yapılan daha detaylı anatomik incelemelerde hipokampüsün, bu bağlantılardan farklı olarak enine kesitlerde ve çapraz aksta farklı bağlantıların olduğu daha karmaşık bir sistemi barındırdığı düşünülmektedir. Entorinal korteksten dentat girus dışında direkt olarak CA1 ve CA3 bölgelerine dağılımların olması buna bir örnek olarak gösterilebilir. Yine CA3 ten dentat girusa olan geri bildirimler sistemin tek taraflı olmadığı fikrinin oluşmasını sağlamıştır (127).

Kemirgenlerde hipokampus medial temporal lobun ventralinde yer almaktadır. Sıçanlarda hipokampus medial ve lateral entorinal korteksten kortikal veriler alır. Bu iki bölge profontal korteks ve koku bölgelerinden ileti alır. Entorinal korteksin yanında perirhinal ve postrhinal korteksten de veri alan hipokampus medial septum, locus

seruleus, amigdala, nukleus reunniens gibi subkortikal alanlardan da veri almaktadır. Uzaysal hafıza ile ilgili en belirleyici girdiler medial entorinal korteksten dorsal hipokampüse gerçekleşir. Ventral hipokampus amigdala ve prefrontal korteksten veri almaktadır. (127, 128). Hipokampus tek bir yapı gibi görünse de hipokampüsün dorsal ve ventral kısımlarının işlevsel olarak farklı olduğuna dair önemli kanıtlar vardır. Dorsal hipokampus mekansal bellek sürecini, ventral hipokampus stres, heyecan ve duyguların etkilerini düzenler (100).

Uzamsal öğrenme, hafıza, yön bulma, duygulanım gibi nörobilişsel faaliyetlerin hipokampus tarafından kontrol edildiği 1957 yılında ilk olarak saptandı ve sonrasında birçok araştırmaya konu oldu. Hafıza, hatırlama, verilerin depolanması ve geri çağırılması gibi faaliyetlerin sürdürülmesi hipokampal formasyon, parahipokampus, medial temporal lob, subkortikal çekirdekler, neokortikal bileşim bölgelerinin kontrolü altındadır. Hipokampüste özellikle dentat girus ve hipokampal granül hücrelerinde yaşam boyu devam eden nörogenesis sayesinde ortaya çıkan yeni nöronlar öğrenme, hafıza, duygu durum gibi bilişsel ve emosyonel durumlardan sorumludur (124). Aynı zamanda amigdala, hipotalamus, singulat girus ile limbik sistemin bir üyesi olan hipokampus, yön ve mekânsal konumlanma gibi fonksiyonların sürdürülmesinde görev almaktadır (128). Bilişsel fonksiyonların gerçekleşmesi için gereken sinaptik bağlantıların güçlendirilmesi LTP ile sağlanmakta ve bu aynı zamanda nörogenesisi tetiklemektedir. Oluşan yeni nöronlar sayesinde LTP, daha yüksek amplitüd ile oluşmaktadır. Bu durum öğrenme, bellek, yön bulma, gibi faaliyetler için gereken sinaptik bağlantı ağının olgunlaşmasını kolaylaştırmaktadır (100).

2.3.1. KSH ve hipokampal fonksiyonlar

Hipokampus kan akımı posterior serebral arter ve anterior koroidal arter tarafından sağlanmaktadır. Hipokampus yoğun bir vasküler ağ yapısına sahip olması nedeni ile iskemik nedenli nörodejenerasyona açık bir bölgedir (128). Hipoperfüzyon, hipoksi ve iske mi gibi durumlara karşı son derece hassas bir yapıdır. İskeminin erken dönemlerinde hipokampal CA1'deki nöronlar dentat girus, CA3 ve diğer kortikal nöronlara göre daha az dirençli olduğu kabul edilmektedir (42). Ayrıca yoğun mikroglyal içeriğinden dolayı nöroinflamasyona neden olan iskemik durumlardan da etkilenmektedir. Nöroinflamasyona olan duyarlılık ile artan glutamat

eksisitotoksitesisi hipokampal nöronlarda daha belirgin olumsuz sonuçlara yol açabilmektedir. Bu nöroinflamatauar süreçler AH da ortaya çıkmaktadır. Mikroglia ve astrositlerin proliferasyonu, T hücre ve sitokin aktivasyonları, ROS ve prostoglandinin etkileri gibi nöroinflamasyon elemanlarını kapsayan geniş bir fizyopatolojik mekanizmayı içermektedir (129).

KBB, sistemik dolaşımdaki faktörlerle hassas beyin ortamı arasındaki karmaşık bir arayüzdür. KBB, nöronal homeostazın korunmasında kritik bir rol oynar ve bozulması, insan bilişsel işlev bozukluğunun erken bir biyobelirteci olarak kabul edilir. Daha da önemlisi, hipokampüsteki KBB, diğer beyin bölgelerine göre bozulmaya daha yatkındır ve bu da bilişsel işlevler üzerindeki etkiyi artırır (128). Dolayısıyla KSH hipokampal nöronal ve oksidatif hasara, anormal glial aktivasyona ve KBB bozukluğuna neden olarak bilişsel bozukluğa katkı sağlar (71).

Yeni nöronal hücrelerin oluşumunu ifade eden nörogenesis hipokampüste nöronal plastisitenin farklı bir formasyonudur. Öğrenme ve hafızanın temelini oluşturan bu mekanizma Alzheimer gibi nörodejenerif ve nörobilişsel hastalıklarda ilk etkilenen bölgelerden biridir. Yapılan araştırmalar Alzheimer'da hipokampal nörogenesisin baskılandığını ortaya koymuştur (124). Entorinal korteks Alzheimer hastalığında amiloid plakların ilk önce oluştuğu bölgelerden birisidir (127). Alzheimer'ın erken dönemlerinde görülen nöronal kayıp, amiloid birikimi, inflamasyon gibi bulgulardan önce hipokampal nörogenesisde bozulma olabileceği yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir (100, 124). Amiloid beta ve pTau birikiminin hipokampal nörogenesisi olumsuz etkilediği bildirilmektedir. Değişen kan akımının ve vasküler patolojilerin de bu patogeneze katkı sunduğu bildirilmiştir (130).

Hipokampus fonksiyonlarını, hacmini, hipokampal nörogenesisi etkileyen bir diğer faktör de menopozdur ve birçok araştırmaya konu olmuştur. Postmenopozal kadınlarda, premenapozdaki kadınlara göre hipokampus hacminin daha küçük olduğu gösterilmiştir (131). Benzer şekilde Tian ve arkadaşları (2023) sıçanlarda overektomi sonrası hipokampus hacimlerinin kontrol gurubuna kıyasla belirgin olarak azaldığını, öğrenme ve hafıza fonksiyonlarının ise gerilediğini bildirmişlerdir (132). Üç yıllık beyin görüntüleme çalışmasında ise menopoz ve perimenopoz döneminde kadınların hipokampal hacimlerinde ve beyin glikoz metabolizmasında erkeklere göre önemli bir düşme gözleendiği bildirilmiştir (13). 17- β östradiol ve progesteron hipokampüsteki sinaptik fonksiyonları, nörogenesisi ve nöronal bağlantılara ait organizasyonları, CA piramidal nöron yoğunluğunu etkilemektedir. Menopoz sonrası azalan steroid hormon

düzeylerinin hipokampüsteki olumsuz etkilerinden birisi de östradiolün amiloid birikimini önleyici etkilerinin ortadan kalkmasıdır (133).

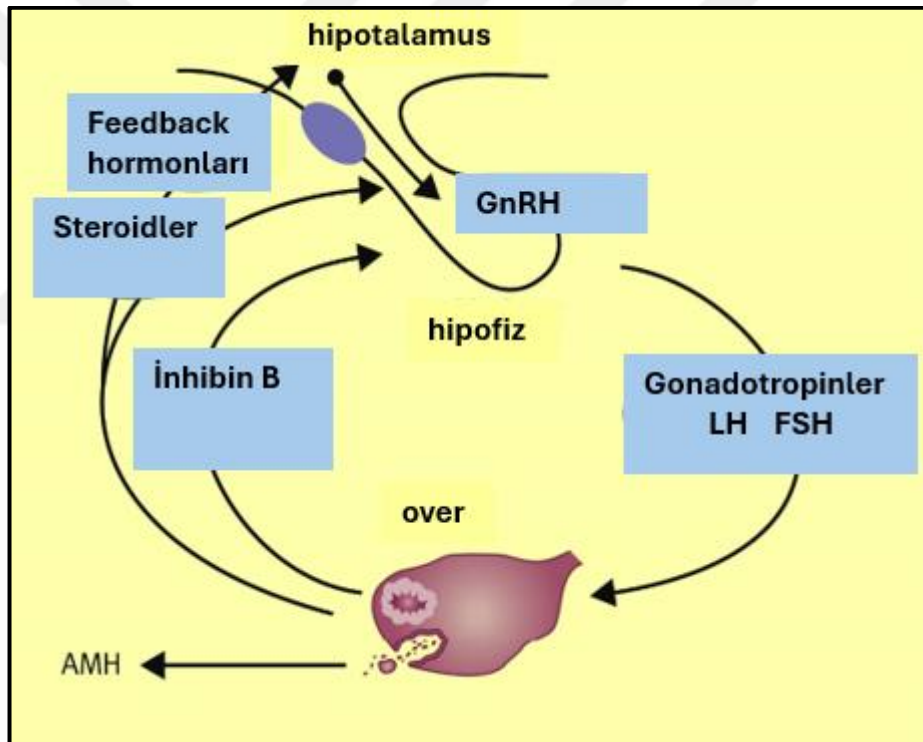
Hipokampüsteki öğrenme ve hafıza faaliyetlerini olumsuz etkileyen bir diğer mekanizma ise hipokampal nöroplastisitenin yaşlanma süreçlerinden olumsuz etkilenmesidir. Nöron sayısı, dentritik dallanmalarda azalma belirgin olmasa da dentat girusa olan entororinal kortikal girdilerde sinaptik kayıplar oluşmaktadır. Ayrıca dentat girusta nörogenesis yaşlanmayla birlikte azalmaktadır (134). Yaşlanmayla birlikte Ca^{+2} homeostazı, LTP'nin indüksiyonu ve sinaptik plastisite değişir. Dolayısıyla yaşlanma sırasında bilişsel değişiklikler hipokampus nöral dinamiklerindeki değişikliklere atfedilebilir (123).

2.4. Menopoz

Kadınlarda embriyonel dönemde oogoniumla başlayan ve prepubertal dönemde primer oosit oluşumu ile tamamlanan germ hücre farklılaşması, pubertal dönemde üreme kabiliyetine sahip primer folikül gelişimi ile devam eder. Menopoz dönemine kadar her ay ortalama bir primer folikül oluşumu ile tamamlanan ovulatuvar sikluslar, kadınlar için fertil dönemi ifade etmektedir. Ortalama 400 folikül dışında kalan primer oositler farklı mekanizmalar ile atreziye uğramaktadır (135). Perimenopozal dönemde foliküler atrezi hızı dramatik bir şekilde artar ve her bir ovaryumda ortalama 100'e kadar düşer (136). Sonuç olarak zayıflayan yumurtalık fonksiyonları, sona eren ovulasyon siklusları kadınlarda menstürel siklusların da sona ermesine neden olur. Üreme faaliyetlerinin son bulduğu bu dönem kadınlarda menopoz olarak tanımlanmaktadır. Genel olarak kadınlarda en az 12 ay boyunca menstürel siklusların görülmemesi menopoz olarak kabul edilir. Menopozdan önce başlayan ve menopozdan bir yıl sonrasına kadar devam eden süreç ise perimenopoz olarak adlandırılmaktadır. Hormonal değişiklikler, klinik semptomlar, fizyolojik ve biyolojik değişiklikler bu süreçte başlamaktadır (137). Dünya genelinde menopoz yaşı yaklaşık olarak 51'dir. Ancak ülkeler ve toplumlar arasında farklılık göstermektedir. Yapılan araştırmalarda kadınların %95'i 45-55 yaşları arasında menopoza girmektedir (138). Bunun yanı sıra menopoz yaşı etnik köken, vücut yağ oranı, sigara ve alkol kullanımı, ailesel faktörler, yaşam koşulları, toplumsal inanışlar ve değerler, beslenme gibi faktörlerden etkilenir (139).

2.4.1. Menopoz fizyolojisi

Geç fertil dönem, erken perimenopozal ve geç perimenopozal dönemi takiben ortaya çıkan menopoz, geçiş döneminde adet düzenlerinde bozulma, klinik semptomların görülmesi, folikül stimulan hormon (FSH) seviyelerinde yükselme ile karakterize olsa da endokrinolojik olarak karmaşık bir süreç sonrasında tamamlanır (140). Menopoz sürecindeki hipotalamus-hipofiz-ovaryan aksındaki feedback mekanizmalarında değişikliğin birçok nedeni olsa da en önemli unsur folikülogenezdeki bozulma, primordial folikül sayısında ve granüloza hücrelerindeki azalma, foliküler atrezidir. Hipotalamo-hipofizer sistem gonadal seks steroidleri ve inhibin tarafından negatif feedback ile baskılanmaktadır (141) (Şekil 15).



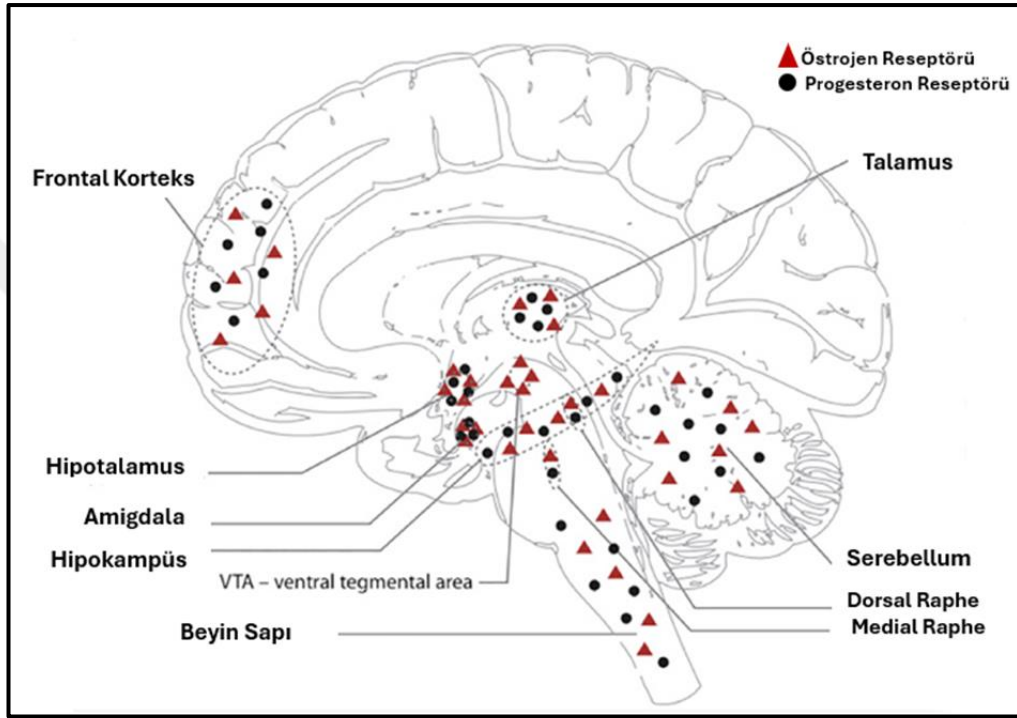
Şekil 15: Hipotalamo-pituiter-ovaryan aksının şematik gösterimi (141).

Premenopozal erken dönemde, artan FSH düzeyleri E2 düzeylerinin geçici olarak korunmasına yol açar. Bu süreçte inhibin B'nin baskılanması ve gonadotropinlerin artışı foliküler atrezinin hızlanmasına ve anovulatuvar siklusların görülmesine neden olur. Menstrüel döngüde 7 günü aşan sapmalar bu dönemin ilk göstergelerindendir. Ayrıca foliküler aktivitenin azalması ve serum anti mülleryen hormon (AMH) düzeylerinin düşmesi de premenopozal geçişin biyokimyasal

bulgularıdır (142). Erken geçiş döneminde, FSH artışı daha kısa sürede ve daha az sayıda folikülün daha erken ovulasyona uğramasına neden olur. Düşen folikül rezervine karşılık olarak, daha büyük foliküller gelişir ve bu, artan FSH düzeyleriyle ilişkilidir. Bu hızlı foliküler gelişim, foliküler fazın kısalmasına ve menstrüel döngülerin sıklaşmasına neden olur. Premenopozal dönemin ilerleyen evrelerinde korpus luteumdan salgılanan progesteron ve inhibin A düzeyleri azalır. Bu durum luteal faz yetmezliğine ve FSH düzeylerinin siklusun erken dönemlerinde dahi yüksek seyretmesine neden olur. Sonuç olarak, ovulasyon daha erken gerçekleşir ve sikluslar sıklaşır. Serum östradiol düzeyleri bu dönemde artış gösterebilir. Geç perimenopozal dönemde ise kompensatuvar mekanizmalar yetersiz kalır, anovulatuvar sikluslar artar, östradiol ve progesteron düzeyleri düşer, sikluslarda gecikmeler görülür (136). Hipotalamo-hipofizer aksın duyarlılığında azalma nedeniyle LH seviyelerinde dalgalanma ortadan kalkar ve değerler bazal seviyenin hafif üzerine çıkar. Bu dönemden yaklaşık 1-2 yıl sonra FSH seviyeleri artmaya, östradiol düzeyleri ise azalmaya devam eder. Folikül rezervinin tükenmesiyle birlikte 12 ay süren amenore menopoz olarak tanımlanır (141, 143).

Menopoz, kadınların yaklaşık %85'inde farklı sistemleri etkileyen çeşitli semptomlarla seyreden fizyolojik bir geçiş dönemidir. En sık bildirilen semptomlar arasında sıcak basması, terleme gibi vazomotor belirtiler; depresyon, anksiyete ve uyku bozuklukları gibi nöropsikiyatrik bulgular; vajinal kuruluk, disparoni ve libido kaybı gibi ürogenital ve cinsel fonksiyon bozuklukları yer almaktadır. Bu semptomların çoğunun temelinde, östradiol düzeylerindeki düşüş rol oynamaktadır (144). Ancak özellikle vazomotor semptomların oluşum mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Yapılan çalışmalar, östrojen eksikliği ile hipotalamik termoregülatuar merkezlerde beta-endorfin düzeylerinde azalma, noradrenerjik ve kolinerjik sistemlerde dengesizlik gibi nöroendokrin değişiklikler arasında ilişki kurmuştur. Hipotalamusun infundibular çekirdeğinde yer alan kispeptin, dinorfin ve nörotoksin B içeren nöronlar, östrojen reseptörleri aracılığıyla gonadotropin serbestleştirici hormon (GnRH) nöronlarını ve aynı zamanda termoregülasyonla ilişkili sinir ağlarını etkilemektedir (12, 143). Genital atrofi, vajinal kuruluk ve cinsel fonksiyon bozuklukları ise östradiol ve testosteron düzeylerindeki düşüş ile ilişkilidir. Ürogenital sistemdeki mukozal değişiklikler genellikle atrofiye, cinsel ilişki sırasında ağrıya (disparoni) ve libido kaybına neden olur (144). Östrojen reseptörlerinin beyin genelinde yaygın dağılımı da bu semptomların çeşitliliğini açıklamaktadır. Alfa

östrojen reseptörleri hipotalamus ve amigdala bölgelerinde yoğunlaşırken, beta östrojen reseptörleri ise hipokampus başta olmak üzere frontal korteks, talamus, serebellum ve beyin sapı çekirdeklerinde bulunmaktadır. Hipotalamus ve amigdala alfa östrojen reseptörleri hakimken, hipokampüste β reseptörler hakimdir. Talamus ve serebellumda ise her iki reseptör yaklaşık olarak aynı seviyelerde bulunmaktadır (28, 143, 145) (Şekil 16).



Şekil 16: Beyin bölgelerinde östrojen ve progesteron reseptörlerin dağılımı (145).

Aslında kadınlarda 3 farklı östrojen formu bulunmaktadır. Bunlar östron (E1), östradiol (E2) ve östriol (E3)'den oluşmaktadır. Etkinliği en yüksek olan östrojen formu E2'dir (146). Steroid hormon grubuna da yer alan östradiol bilindiği gibi santral sinir sisteminde KBB'yi geçerek reseptör etkileşimlerini gerçekleştirir. Östrojenler hem hücre membranında yer alan G proteini ilişkili membran östrojen proteini GPR30/GPER1 ile hem de hücre içinde yer alan $ER\alpha$ ve $ER\beta$ reseptörlerine yüksek afinite göstermektedir (55). $ER\alpha$ kadınlarda hipofiz, hipotalamus, amigdala uterus, böbrek ve böbrek üstü bezde tespit edilmiştir. $ER\beta$ reseptörleri ise overde, beyinde hipokampal bölgede daha yaygın bulunur. Östrojenler membrana bağlı reseptörleri ya da hücre için alfa ve beta reseptörleri ile direkt ya da indirekt olarak genomik sinyalizasyonu ve transkripsiyonu, dolayısıyla hücre proliferasyonunu indükler. Bunun

yanında reseptör etkileşimlerinden bağımsız bir şekilde antioksidan ve sitoprotektif etkiler gösterir (145-148).

2.4.2. Kronik serebral hipoperfüzyon ve menopo

Östrojenler nöronal proliferasyon, nöronal diferansiyasyon, hücrel metabolizmanın düzenlenmesi, kolesterol metabolizmasının indüklenmesi, sinaptik plastisitenin regülasyonu gibi olaylara aracılık eder. Ayrıca antioksidan, antiinflamatuvar, sitoprotektif süreçlere katkı sunar. (146-148). Beyin üzerinde bu koruyucu etkinin, üreme dönemi dışındaki kadınlarda, erkeklere kıyasla daha fazla inme ve iskemik beyin hasarı gibi olumsuz serebrovasküler olayların görülmesi ile bağdaştırılmaktadır (59).

Menopozun hem insanlarda kilo alımı ve visseral yağ birikimi de dahil olmak üzere metabolik değişikliklere neden olduğu (149) hem de farelerde kilo alımını, glikoz intoleransını ve visseral adipoziteyi artırdığı ve menopoz sonrası bilişsel epizodik ve mekansal hafızada bozulmaya neden olduğu bildirilmiştir (55). Kilo alımı, artmış visseral ve subkutanöz yağlanma ve bozulmuş glikoz toleransı dahil olmak üzere metabolik işlev bozukluğunun menopozdan sonra ortaya çıkabileceğini, dolayısıyla kadınlarda vasküler bilişsel bozukluk ve demans için önemli risk faktörü olabileceğini göstermektedir (55).

Kadın cinsiyeti, AH geliştirmede önemli bir risk faktörüdür, AH kadınlara özgü olmasa da dünya çapında AH-demansla yaşayan hastaların üçte ikisini kadınlar oluşturmaktadır. Bu bulgular, kadınların erkeklere göre daha uzun ömürlü olmasından büyük ölçüde bağımsızdır. Öyle ki erkekler, postmenopozal ve birkaç yıl sonrası kadınlardan biraz daha yüksek küresel bilişsel gerileme oranları gösterdiği bildirilmiştir (13). Bu oranın tersine dönmesindeki etken menopoz sonrası hormonal değişiklikler ve beyindeki yapısal ve işlevsel farklılıklar kadınları bilişsel gerilemeye yatkın hale getirmesiyle açıklanmaktadır (14). Ayrıca beyin AH biyobelirteç anormallikleri (Aβ birikimi gibi) ile AH klinik semptomlarının başlangıcı arasındaki bilinen ilişkiler göz önüne alındığında, menopozla birlikte beyin biyoenerjisinin bozulmasının, kısmen, kadınlarda AH riskinin artmasını açıklayabileceğini göstermektedir. Kronolojik olarak, menopoz yaşı, klinik tanıdan 15-20 yıl önce başlayan AH'nin prodromal fazının başlangıcı ile eşlendiği bildirilmektedir. Bu

nedenle menopo2 değişiklikleri, ortalama menopo2 yaşı (50'li yaşların ortası) ile ortalama AH tanısı yaşı (70'li yaşların ortası) arasındaki zaman aralığıyla örtüşür (13).

Beyaz cevher hasarı, hipoperfüzyondan kaynaklanan hasara karşı özellikle hassas olduğu için VaD'nin bir özelliğidir. İnsan verileri, beyaz cevherin menopo2dan sonra daha fazla risk altında olduğunu göstermektedir. Menopo2 sonrası kadınlarda, erkeklerden veya menopo2 öncesi kadınlardan daha fazla beyaz cevher hiperintensitesi olduğu bildirilmiştir (150). Ayrıca uzun süreli hipoperfüzyonun ve menopo2un farelerin beyaz cevher bölgelerindeki miyelin oluşum belirteçlerini etkileyip etkilemediğini inceleyen bir çalışmada tek başına KSH'den ziyade menopo2un korpus kallozumda miyelin bazik proteini (MBP) ekspresyonunu azalttığı bulunmuş. Dahası KSH'nin premenopo2 ve postmenopo2 gruplarında mekansal hafızanın bozulmasına neden olduğu fakat postmenopo2 grubunda hem epizodik benzeri hafızanın hem de günlük yaşam aktivitelerinin (yuva yapımı gibi) de ekstra bozulduğu bildirilmiş (55). Bu bulgular menopo2un KSH ile ilişkili hem beyin yapısını hem de bilişsel eksiklikleri daha da kötüleştirdiğini göstermektedir.

Orta yaş kadın beyrinde iki yaşlanma programı rol oynar: kronolojik ve endokrinolojik (perimenopo2al geçiş); Kronolojik yaşlanma programı, erken (menopo2 öncesi) ve geç (menopo2 sonrası) olmak üzere ikiye ayrılır ve endokrinolojik yaşlanma programı bunların arasında yer alır. Perimenopo2al geçiş, üremeye ilişkili olanların ötesinde, hipotalamik işlevlerden yönetici işleve, duyuusal bütünleşmeye, öğrenme ve belleğe, duygu ve motivasyona, serotonerjik sisteme ve adrenerjik sisteme kadar birçok sinir devresini etkiler. Ayrıca, postmenopo2da da devam edebilen ateş basması, uykusuzluk, depresyon ve bilişsel işlevlerde düşüş gibi birden fazla nörolojik semptomla da ilişkilidir (12).

2.5. Aldosteron ve Mineralokortikoid Reseptörleri

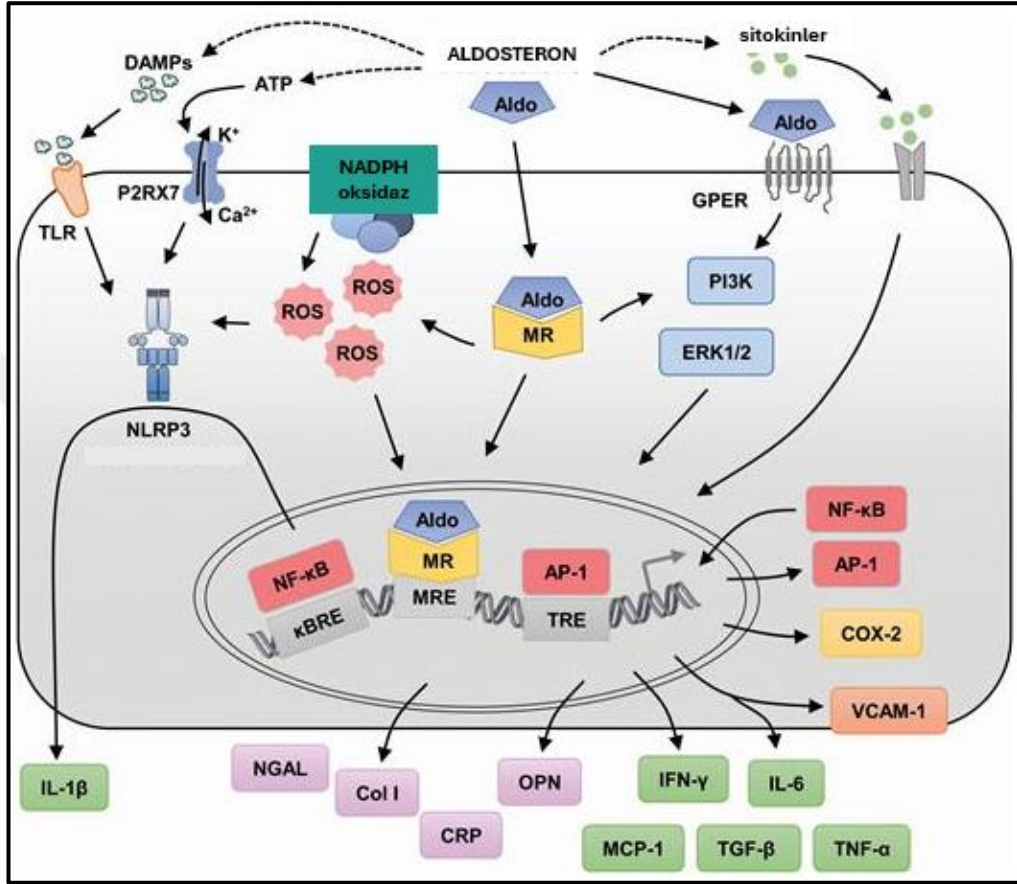
Renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi (RAAS), sıvı-elektrolit dengesi ve kan basıncının düzenlenmesinde merkezi rol oynayan, aynı zamanda nörolojik ve metabolik süreçleri de etkileyen karmaşık bir hormonal sistemdir. Renal afferent arteriyollerin jukstaglomerüler hücrelerinden salınan renin, anjiyotensinojenin anjiyotensin I'e dönüşmesini başlatır. Anjiyotensin I ise çoğunlukla akciğerlerin endotel hücrelerinde lokalize olan anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) aracılığıyla anjiyotensin II'ye çevrilir. Anjiyotensin II, adrenal korteksteki zona glomeruloza

hücrelerini uyararak aldosteron sentezini indükler. Aldosteron, klasik olarak böbreklerde sodyum geri emilimi ve potasyum atılımını düzenleyerek su tutulmasına ve kan basıncında artışa neden olur. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar, aldosteronun MR aracılığıyla kardiyovasküler sistem, böbrek, beyin ve retina gibi hedef dokularda proinflamatuvar, prooksidan ve fibrotik etkiler oluşturduğunu göstermektedir (43,46,151,152).

Aldosteron, bir steroid hormon sınıfı olan mineralokortikoiddir. Kan basıncını yükseltir ve vücuttaki su ve mineral dengesini düzenler. Adrenal korteksin zona glomerulosa bölgesinde, sitokrom P450 ailesine ait olan aldosteron sentaz tarafından üretilir. Aldosteron sentezi ekstrasellüler potasyum konsantrasyonları, adrenokortikotropik hormon ve renin-anjiyotensin sistemi tarafından uyarılır. Sitokrom P450scc kolesterolü pregnenolona dönüştürür, bu da endoplazmik retikuluma taşınır ve 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaz ve 21-hidroksilaz tarafından 11-deoksikortikosterona (11DCS) dönüştürülür. 11DCS, mitokondride aldosteron sentaz tarafından 11-, 18-hidroksilasyon ve 18-oksidasyon reaksiyonları ile aldosterona dönüşür. Steroid yapısı sayesinde hücre zarını kolayca geçer, sitoplazmada mineralokortikoid reseptör (MR)'ye bağlanır ve reseptörün nükleusa taşınmasını ve transkripsiyon faktörü olarak gen ekspresyonunu başlatmasını sağlar. Bu süreç, SGK-1 gibi proteinlerin sentezini artırarak, başlıca toplayıcı tüp hücrelerinde bulunan ENaC üzerinden sodyum ve su geri emilimini düzenler (151).

Birincil işlevi böbreklerde olmasına rağmen, artan kanıtlar aldosteronun beyinde önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Yüksek aldosteron seviyeleri, karmaşık nörobiyolojik mekanizmalar yoluyla hafızayı potansiyel olarak bozabilir. Aldosteron, inflamasyon, oksidatif stres, endotel disfonksiyonu, fibrozis ve hipertrofik yeniden şekillenme yoluyla doğrudan vasküler sistemi etkiler (152, 153). Yapılan çalışmalarda aldosteronun, artmış kan basıncı ve endotel hasarından bağımsız bir şekilde beyinde proinflamatuvar sitokilerin düzeylerinde artışa neden olarak nöroinflamasyona, lipid peroksidasyonuna ve oksidatif hasara neden olduğu bildirilmiştir (154, 155). Aldosteron, glikoz-6-fosfat dehidrogenazın (G6PD) endotel ekspresyonunu azaltır. G6DP, oksitlenmiş NADPH'yi NADPH'ye indirgeyerek ROS seviyelerini sınırlamak için indirgeyici bir eşdeğer olarak kullanılır. Bu nedenle, aldosteron uyarımı, G6DP seviyelerinin azalmasına bağlı olarak ROS birikimine yol açarak NADPH konsantrasyonlarının azalmasına neden olur (155). Ayrıca aldosteron makrofaj infiltrasyonunu uyarır. Bu durum, proinflamatuvar transkripsiyon faktörleri

olan aktivatör protein-1 (AP-1) ve NF- κ B'nin aktivasyonunu tetikler ve sonuç olarak adezyon molekülleri ile kemokinlerin ekspresyonunu indükler. İnfiltrasyon olan makrofajlar, okside düşük yoğunluklu lipoproteinlere (ox-LDL) etki ederek aterosklerotik plak oluşumuna katkıda bulunur (153) (Şekil 17).



Şekil 17: Aldosteron ve inflammatuar mediatörlerin üretimi (Aldo, aldosteron; AP-1, aktivatör protein-1; ATP, adenosin trifosfat; Ca²⁺, kalsiyum; Col I, Kolajen tip I; COX-2, siklooksijenaz-2; CRP, C-reaktif protein; DAMP'ler, hasarla ilişkili moleküler desenler; ERK, hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz; IFN, interferon; IL, interleukin; K⁺, potasyum; κ BRE, nükleer faktör- κ B (NF- κ B) yanıt elemanı; MCP-1, makrofaj kemotaktik protein-1; MRE, MR yanıt elemanı; NADPH, indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat; NF- κ B, nükleer faktör- κ B; NGAL, nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin; NLRP3, NOD benzeri reseptör pirin-domain içeren protein 3; OPN, osteopontin; P2RX7, P2X purinoseptörü 7; PI3K, fosfoinozotid 3-kinaz; ROS, reaktif oksijen türleri; TGF, dönüştürücü büyüme faktörü; TLR, Toll benzeri reseptör; TNF, tümör nekroz faktörü; TRE, 12-O-tetradekanoilforbol-13-asetat yanıt elementi (AP-1 yanıt elemanı); VCAM-1, vasküler hücre yapışma molekülü-1) (153).

Mineralokortikoid reseptörler (MR), yalnızca sodyum ve su retansiyonu ile sıvı-elektrolit hemostazı ve kardiyovasküler etkilerden sorumlu reseptörler değil, aynı zamanda inflamatuvar ve oksidatif stres süreçlerini de içeren, çok sayıda organ ve sistemde yer alan kompleks bir reseptör sistemini temsil etmektedir. MR ekspresyonunun; adipoz doku, kalp, beyin, endotel hücreleri, renal nefron ve tübüller, düz kas hücreleri, miyeloid doku ve makrofajlar gibi çeşitli immün sistem hücrelerinde bulunduğu gösterilmiştir (156, 157). Özellikle MSS’de; hipokampus, amigdala ile lateral ve medial septum bölgelerinde yer alan nöronlarda MR ekspresyonunun yoğun olduğu bilinmektedir (44). MR aracılı etkileşimler, hedef gen ekspresyonu üzerinden inflamasyon, oksidatif stres ve fibrozis gelişimine katkı sağlar (43). Bu tepkiler antioksidanlar ve MR antagonistleri tarafından zayıflatılır (45, 49).

2.6. Spironolakton

Spironolakton bir aldosteron reseptör antagonisti olup potasyum tutucu diüretiktir. 7 α -tiyometil-spironolakton ve kanrenon spironolaktonun iki aktif metabolitleridir ve MR’e bağlanarak etki gösterebilirler. Kullanıma sunulan ilk aldosteron reseptör antagonisiti olan spironolakton MR’lerinin yanı sıra androjen, progesteron ve az bir düzeyde östrojen reseptörlerine bağlanabilir. MR antagonisti sınıfında yer alan spironolakton farklı endikasyonlar ile klinik kullanımı olan bir farmakolojik ajandır. Kalp yetmezliği, hiperaldosteronizm, hirsutizm, polikistik over sendromu, periferik ödem, portal hipertansiyon, nefrotik sendrom, asit gibi durumlar klinik endikasyon alanlarıdır (158).

Günümüzde mineralokortikoid reseptör antagonisti olarak kullanılan iki steroidal formu mevcuttur. Bunlar spironolakton ve eplerenon’dur. Bu ajanlar temelde aldosteron reseptör antagonizması ile diüretik etkinlik göstermektedir. Spironolakton progesteron hormonu ile benzer yapıda olup 17.karbon halkasına lakton halkası eklenmek sureti ile oluşturulmuştur. Biyoyararlanımı %80-90 olup büyük oranda plazma proteinlerine (çoğunlukla albümine) bağlı olarak taşınır ve aktif metabolitlerinin yarılanma ömrü daha uzundur (45).

Sitokrom P450 enzim indüksiyonuna neden olan spironolakton, karaciğerde hepatik deasetilasyon ve detiolasyon yoluyla metabolize edilir. Mineralokortikoid reseptör antagonistleri böbrek epitel hücrelerinde MR’leri bloke ederek etki gösterir ve potasyum tutucu diüretikler olarak bilinirler. Aldosteron reseptörlerinin yanı sıra

farklı düzeylerde androjen, progesteron ve glukokortikoid reseptörlerini etkileyebilmektedir (45). MR' ne spesifik olmaması nedeni ile erkeklerde jinekomasti, kadınlarda adet düzensizliği yapabilmektedir.

Aldosteron hormonu etkilerini temel olarak mineralokortikoid reseptörleri üzerinden göstermektedir ve spironolaktonun bu etkileri antagonist etkiler ile bloke etmektedir. Literatürde spironolaktonun antihipertansif etkisinden bağımsız çeşitli dokularda göz (46), böbrek (47), karaciğer (48), beyin (49) oksidatif stresi ve nöroinflamasyonu azalttığını bildiren çok sayıda çalışma vardır (50, 51). MR aracılı aldosteronun beyin dokusu üzerindeki olumsuz etkilerini antagonize ederek öğrenme ve hafıza gibi bilişsel fonksiyonları iyileştirdiği de rapor edilmiştir. Klinik olarak MR'lerin blokajı vasküler perfüzyonu iyileştirerek, nörohormonal aktivasyonu ve sistemik inflamasyonu azaltarak kardiyovasküler, HPA ve nörovasküler kaynaklı mekanizmaları etkileyerek bilişsel fonksiyonu etkilediği öne sürülmektedir (50, 51, 53). Ayrıca Alzheimer (49, 159), şizofreni (160), akut stres (161), postoperatif bilişsel bozukluk (162) ve korku modelinde (163), spontan hipertansif ve (164) obez sıçanlar (165) gibi prelinik çalışmalarda da MR blokajının hipokampal fonksiyonları etkileyerek aldosteronun zararlı etkilerinin hafifletilerek öğrenme ve hafızayı iyileştirdiği gösterilmiştir.

Aldosteronun beyin dokusu üzerindeki olumsuz etkilerini, MR'i aracılığı ile ortaya çıkardığı, spironolakton ile bu etkilerin antagonize edildiği saptanmıştır (154). Serebral iskemi modeli oluşturulan farelerde iskemi ile MR seviyelerinde artış olduğu ve bununla oksidatif stresi arttırdığı kabul edilmektedir. Nöron hücreleri ve astrositlerde tespit edilen MR'nin spironolakton ile bloke edilmesi, beyin dokusunun onarılmasına ve rejenerasyonuna katkı sağladığı düşünülmektedir. Beyin dokusundaki enfarktüs düzeylerini azalttığı, iyileşme sürecini hızlandırdığı ortaya koyulmuştur. Spironolaktonun bu olumlu etkilerini beyinde angiogenezi artırarak ve reperfüzyonu indükleyerek, ROS üretimini azaltarak, fibroblast büyüme faktörü ve vasküler endotelial growth faktör aracılığı ile iskemiye azaltarak, nöronal hücre kaybını önleyerek yaptığı düşünülmektedir. Bu nedenle bir aldosteron reseptör antagonisti olan spironolakton, iskemik beyin olaylarında bir nöroprotektif ajan olarak dikkat çekmiştir (166). Özellikle astrositler tarafından sentezlenen nörotrofik faktörler iskemi sonrası beyin dokusunun onarılmasında rol oynar. Hem spironolakton hem de epleronon uygulanan başka bir çalışmada ise hipokampus ve PFC'de BDNF ve Nrf2 seviyelerinin her iki farmakolojik ajan tarafından da artırıldığı bildirilmiştir. Ayrıca

bilişsel fonksiyonları etkileyerek nörodejeneratif hastalıklardan biri olan Alzheimer'ı iyileştirdiği bildirilmiştir (49).

Beyinde kortikosteroid hormonlar hem MR'ler hem de GR'ler üzerinden etki eder. Glikokortikoidler (kortizol) ve minerolokortikoidler (aldostereon) MR reseptörlerine afinite göstermektedir. Beyinde kortizol hormonu aldosteron hormonuna göre daha yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır ve kortizol metabolizmasında görev alan 17- β hidroksisteroid dehidrogenez tip 2 enzimi beyin dokusunda nucleus tractus solitarius dışında son derece düşük seviyede bulunmaktadır. Bu da tercih edilen ligandı kortizol lehine düzenler. Beyinde MR'lerin afinitesi, GR'lerin afinitesine göre daha fazladır (44). Yapılan araştırmalar stres anında artan kortizol seviyeleri ile aktive olan MR'lerin nörodejeneratif hastalıkların kötü prognozuna katkı sağladığını göstermiştir (45, 159, 167). Her iki kortikosteroid reseptörü ortaya koydukları genomik faaliyetler ile bilişsel ve duygusal fonksiyonları düzenler (44).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bülent Ecevit Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim dalında 2021-2022 tarihleri arasında gerçekleştirilen çalışmamıza öncesinde Bülent Ecevit Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (Etik kurul no:2020-28-01/10) onay alınmıştır (Ek-1). Ayrıca bu çalışma Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmektedir (BAP No: 2020-2625-9946-02).

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edilen 2 aylık 160 ± 30 gram ağırlığında 48 adet dişi Wistar-Albino cinsi sıçan kullanılmıştır. Tüm sıçanlar, aynı bakım koşullarında günlük değiştirilen taze musluk suyu ve standart pelet yem ile beslenmeleri sağlanmıştır. Tüm sıçanlar rahat hareket edebilecekleri büyüklükte üstü tel ile kapalı pleksiglas kafeslerde gruplar halinde barındırılmıştır. Ayrıca 12 saat aydınlık 12 saat karanlık sirkadiyen ritimde, sıcaklığın $20-25^{\circ}\text{C}$ ve nemin %50-60 olduğu aynı ortamda tutulmuştur. Tüm sıçanların bakımları, Tıbbi Araştırmalar Ulusal Derneği tarafından biçimlendirilen "Deney Hayvanlarının Bakım Prensipleri" ne ve Laboratuvar Hayvanı Kaynakları Enstitüsü tarafından düzenlenen "Laboratuvar Hayvanlarının Bakım ve Kullanımı için Kılavuz" una uygun olarak yapılmıştır.

3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması

Deney başında hayvanlar her grupta 12 hayvan olacak şekilde rastgele 4 gruba ayrıldı: (1) Kontrol, (2) KSH, (3) KSH+SPİ25, (4) KSH+SPİ50. Deneysel menopoz oluşturmak için tüm hayvanlar overektomi (OVX) edildi. OVX'den 5 hafta sonra KSH, KSH+SPİ25, KSH+SPİ50 gruplarına deneysel KSH modeli oluşturuldu. Kontrol grubu hayvanlarına ise sahte KSH işlemi uygulandı. SPİ distile su içerisinde çözüldü ve KSH+SPİ25, KSH+SPİ50 grup hayvanlarına KSH'dan 3 gün önce ve işlemiden sonra 21 gün boyunca günde bir kez sırasıyla 25mg/kg ve 50mg/kg olacak şekilde spironolakton (Spylacton, Adeka ilaç, Türkiye) uygulandı. Kontrol, KSH grup hayvanlarına ise aynı gün ve süreyle distile su uygulandı.

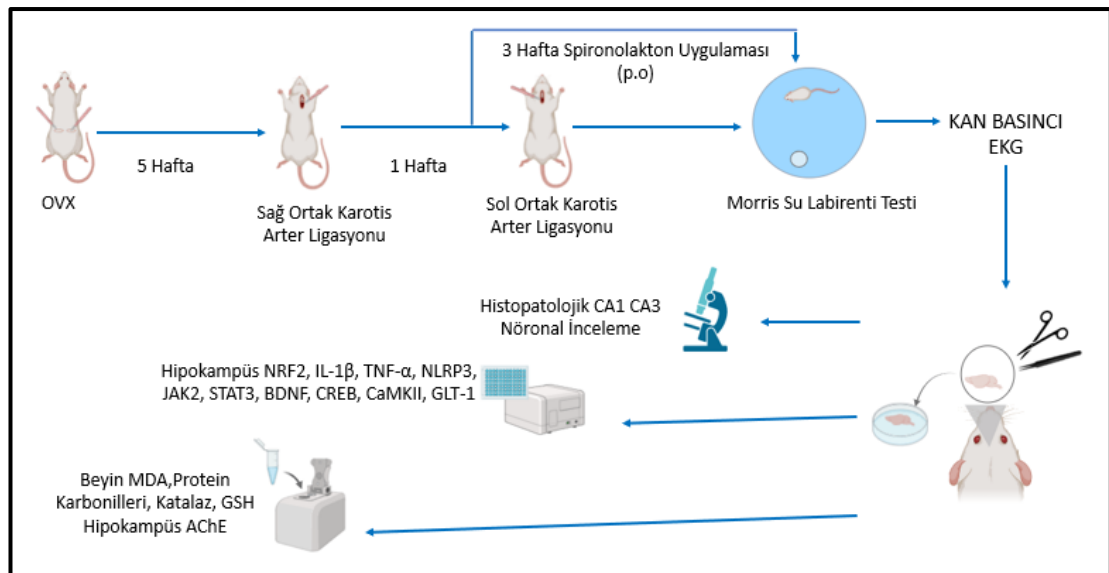
Kontrol: Hayvanlar önce OVX edildi. Menopozun yerleşmesi için 5 hafta beklenildi. 5 hafta sonra sahte KSH operasyonu uygulandı. KSH'den 3 gün önce ve işlemiden sonra 21 gün boyunca her gün aynı saatte olacak şekilde günde bir kez distile su (p.o) uygulandı (n=12).

KSH: Hayvanlar önce OVX edildi. Menopozun yerleşmesi için 5 hafta beklenildi. 5 hafta sonra KSH uygulandı. KSH'den 3 gün önce ve işlemiden sonra 21 gün boyunca her gün aynı saatte olacak şekilde günde bir kez distile su (p.o) uygulandı. Deney sürecinde 2 tane hayvan 2VO işleminden hemen sonra öldü (n=10).

KSH+SPİ25: Hayvanlar önce OVX edildi. Menopozun yerleşmesi için 5 hafta beklenildi. 5 hafta sonra KSH uygulandı. KSH'den 3 gün önce ve işlemiden sonra 21 gün boyunca her gün aynı saatte olacak şekilde günde bir kez spironolakton 25mg/kg (p.o) uygulandı. Deney sürecinde 1 tane hayvan KSH'den sonra öldü (n=11).

KSH+SPİ50: Hayvanlar önce OVX edildi. Menopozun yerleşmesi için 5 hafta beklenildi. 5 hafta sonra KSH uygulandı. KSH'den 3 gün önce ve işlemiden sonra 21 gün boyunca her gün aynı saatte olacak şekilde günde bir kez spironolakton 50mg/kg (p.o) uygulandı. Deney sürecinde 1 tane hayvan KSH'den sonra öldü (n=11).

Deney prosedürü şekil 18'de özetlenmiştir (Şekil 18).



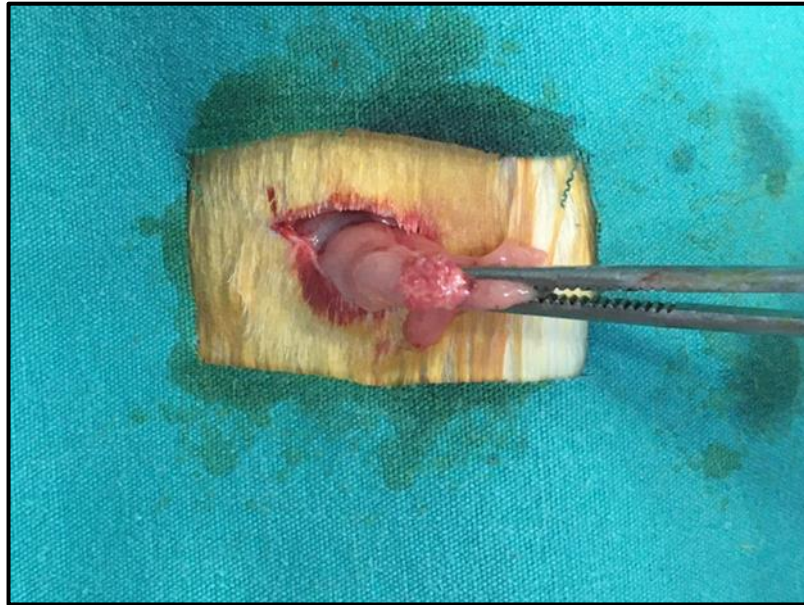
Şekil 18: Deney prosedürü şekilsel özeti.

3.2.1. Cerrahi girişim

3.2.1.1. Cerrahi menopoz modelinin oluşturulması

Endojen estradiol ve progesteron üretimini ortadan kaldırmak için tüm hayvanlar OVX edildi. Anesteziden 12 saat önce yeme ulaşmaları kısıtlandı ancak su içmelerine herhangi bir kısıtlama getirilmedi. Hayvanlar ketamin (70mg/kg, i.p.) (Ketamin hidroklorür, Pfizer, Türkiye) ve ksilazin (10mg/kg, i.p) (Xylazinbio, Bioxell Pharm, Türkiye) anestezisi altında dorsal cerrahi yaklaşımı kullanılarak bilateral olarak overektomi yapıldı.

Hayvanların önce cerrahi girişimin yapılacağı sırt bölgeleri tıraş edildi ve cerrahi örtü ile örtüldü. Povidon iyodür ile cilt temizlendi. Önce sağ taraf cilde bistüri ile yaklaşık 1cm'lik kesi atıldı. Sonra kas tabakası künt diseksiyon ile geçildi. 3/0 ipek ile tuba uterinaller ve ligamentler bağlandı ve sonra over dokusu kesilerek çıkarıldı (Şekil 19). Kas dokusu ve cilt 3/0 ipek ile primer olarak kapatıldı. Sonra aynı işlem sol tarafa da uygulandı. İşlemden sonra hayvanların pansumanı yapıldı ve ağrılarını hafifletmek için devalgin (30 mg/kg) (Devaljin, Adeka ilaç, Türkiye) uygulandı. Cerrahi işlem sırasında ısıtma battaniyesi yardımıyla rektal sıcaklık 37 ° C'de tutuldu. Ayrıca hayvanlar anesteziden uyanana kadar tekli kafeslerde sıcak ortamda barındırıldı ve tüm hayvanlar uyandıktan sonra tekrar gruplar halinde kafeslerine alındı (15,16).

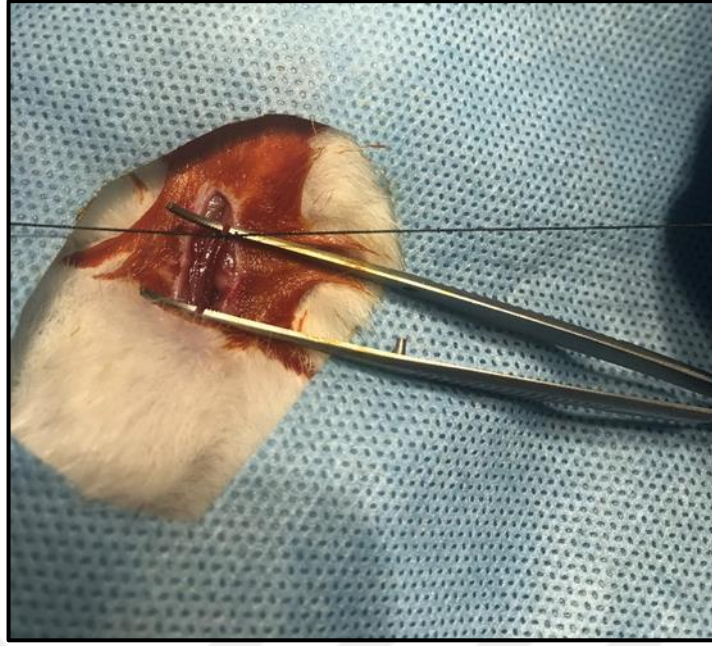


Şekil 19: Over dokusunun çıkarılması.

3.2.1.2. KSH oluşturulması

Sıçanlara KSH, modifiye edilmiş bir cerrahi modelle, ortak karotid arterlerin iki taraflı ligasyonu ile oluşturuldu. Anesteziden 12 saat önce yeme ulaşmaları kısıtlandı ancak su içmelerine herhangi bir kısıtlama getirilmedi. Cerrahi prosedür sırasında ketamin (70 mg / kg) ve ksilazin (10 mg / kg) i.p. karışımı uygulandı. Anesteziden sonra hayvanların önce cerrahi girişim yapılacağı boyun bölgeleri tıraş edildi. Povidon iyodür ile cilt temizlendi ve cerrahi örtü ile örtüldü. Sonra yaklaşık 2cm bir orta hat servikal kesisi atıldı. Forceps kullanılarak submandibular bez yavaşça kenara çekildi ve ortaya çıkan sternokleidomastoid kası ve sternohyoid kası arasından sağ ortak karotis arter ağığa çıkarıldı. Karotis arter vagus sinirinden nazikçe izole edildi ve arter 5/0 ipek sütür ile bağlandı (şekil 20). Oklüzyon oluşturulduktan sonra cerrahi hat 3/0 ipek sütür ile kapatıldı. İşlemden sonra hayvanların pansumanı yapıldı ve ağrılarını hafifletmek için devalgin 30 mg/kg uygulandı. Deney sırasında gelişebilecek hipotermiyi önlemek amacıyla, ısıtma battaniesi yardımıyla rektal sıcaklık 37°C'de tutuldu. Ayrıca hayvanlar anesteziden uyanana kadar solunum desteğine ihtiyaç duymadan tekli kafeslerde sıcak ortamda barındırıldı ve tüm hayvanlar uyandıktan sonra tekrar gruplar halinde kafeslerine alındı. İşlemden 1 hafta sonra aynı prosedür ile bu sefer sol ortak karotis arter oklüzyonu yapıldı. Sol karotis arter ligasyonundan 3 gün önce günde bir kez spironolakton uygulandı. Sahte ameliyat edilen kontrol grubu hayvanları ise ligasyon yapılmadan aynı operasyona tabi tutuldu (3,5).

Kronik serebral hipoperfüzyon modeli KSH, KSH+SPİ25 ve KSH+SPİ50 olmak üzere 3 gruba toplamda 36 hayvana uygulandı. İşlem sırasında veya hemen sonrasında toplam 4 hayvan öldü ve bu durumda ölüm oranı %11 olarak tespit edildi.



Şekil 20: Sol karotis arterin ligasyonu.

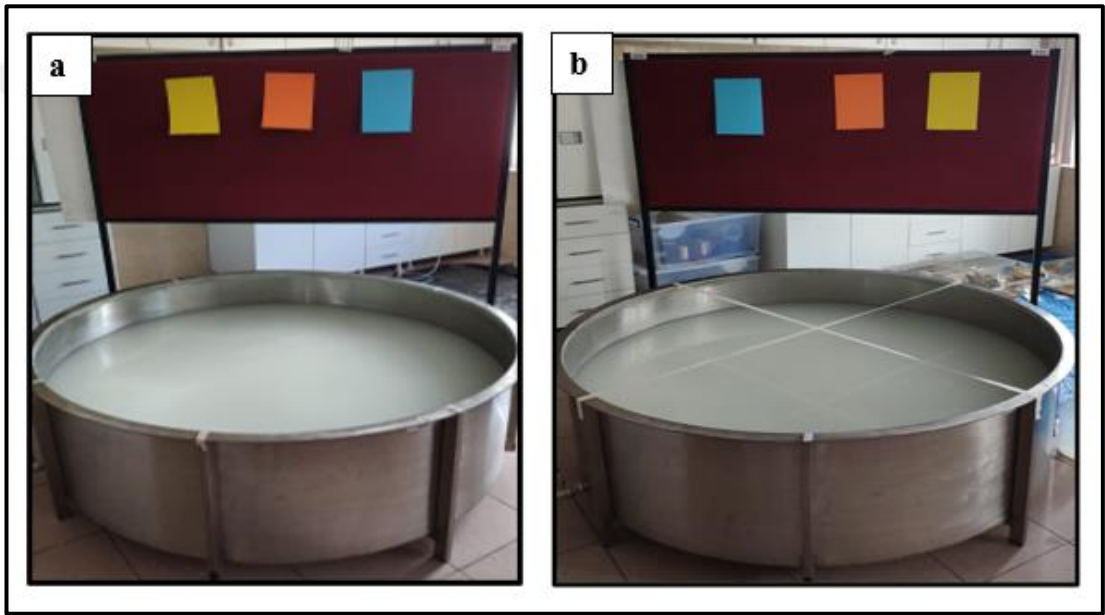
3.3. Vücut Ağırlıklarının Ölçülmesi

Bütün sıçanların vücut ağırlıkları OVX'den hemen önce tartıldı ve haftalık ağırlık takibi yapıldı. Dolayısıyla 1., 7., 14., 21., 28., 35., 42., 49., 54., 63. günlerde vücut ağırlıkları ölçülerek kaydedildi.

3.4. Morris Su Labirenti

Sıçanların bilişsel işlev performansı Morris su labirenti kullanılarak değerlendirildi. 150 cm çapında ve 60 cm derinliğinde dairesel bir havuzdan oluşan labirent 45 cm derinliğe kadar $26 \pm 1^\circ\text{C}$ su ile doldurulmuştur. Labirentin merkezine bir kamera yerleştirildi ve görüntüler kaydedildi. Havuz kuzey (K), doğu (D), güney (G) ve batı (B) olarak adlandırılan dört çeyreğe bölündü ve bir kaçış platformu yerleştirildi. İlk gün platform su yüzeyinin 2 cm üstünde kalacak şekilde alıştırma testi uygulandı. Sonraki 4 gün platform su yüzeyinin 2 cm altına kalacak şekilde yerleştirildi. Platform sıçanlar tarafından görülmemesi için havuzdaki su süt tozu ile karıştırılarak opak hale getirildi. Platformun yerleştirildiği çeyreğin çevresine çeşitli renklerde yönlendirici şekiller asıldı. Öğrenme aşamasında, her bir sıçana günde dört deneme testi yapıldı. Sıçanlar her denemede labirentin duvarına bakacak şekilde farklı bir kadrandan havuza nazikçe bırakıldı. Sıçanların suya girmesinden gizli platformu bulmasına kadar geçen

süre 60 saniyeden az ise kaydedildi; sıçanlar 60 s içinde platformu bulamazlarsa latans süresi 60 s olarak kaydedildi. Tüm sıçanlar, her denemeden sonra 20 saniye boyunca çevrelerini gözlemlmeleri için platforma yerleştirildi. Öğrenme testinden 24 saat sonra hafıza performansını yansıtan *probe trail* testi uygulandı. Platform kaldırıldı ve sıçan platformun karşısındaki kadranda labirentin duvarına bakacak şekilde havuza bırakıldı. Hedef kadranda (platformun yerleştirildiği yer) geçirdikleri süre kaydedildi. Her test bitiminden sonra sıçanlar kurularak kafeslerine yerleştirildi. Tüm öğrenme ve test aşaması davranış çalışmaları, sabit aydınlatma ve sıcaklık kontrollü bir ortamda sabah 9 ile akşam 4 arasında yapıldı (Şekil 21).



Şekil 21: a: İlk 5 gün öğrenme aşamasında labirentin görünümü. b: Son gün test aşamasında labirentin görünümü.

3.5. Kalp Hızı ve Ortalama Arteriyel Kan Basıncı Ölçümü

Deneyin son günü tüm gruplardaki sıçanlar feda edilmeden önce ketamin (70 mg / kg) ve ksilazin (10 mg / kg) i.p. karışımı ile anestezi edildi. Anesteziden sonra daha önce tarif edildiği şekilde sağ ortak karotis arter açığa çıkarıldı. Sağ karotis arter vagus sinirinden nazıkçe izole edildi ve içinde heparin (100 IU/mL) bulunan polietilen tüp ile kanüle edildi. İn-vivo kan basıncı ölçümü için kullanılan transduser (kan basıncı ölçüm cihazı, SS 13 L, Biopac Sistemleri, Kaliforniya, ABD) yardımı ile 10 dakika boyunca ortalama arteriyel kan basıncı monitörize edildi ve sonuçlar kaydedildi.

Ayrıca deri altına elektrodlar yerleştirilerek aynı süre içerisinde kalp hızı ölçülerek kaydedildi.

3.6. Doku Örneklerinin Alınması

Tüm sıçanlar davranış testinin bitiminden sonra kalp hızı ve ortalama arteriyel kan basıncı ölçümü değerlendirilmek üzere ketamin (70 mg / kg) ve ksilazin (10 mg / kg) ile i.p. anestezi edildi. Ölçümden hemen sonra kardiyak kan alınarak hayvanlar feda edildi.

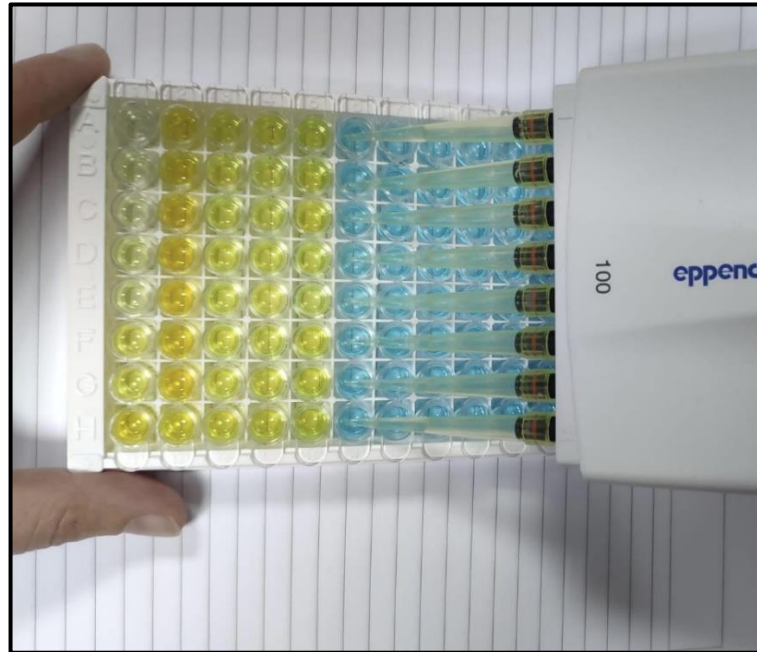
Beyin dokuları buz üstünde hızlıca çıkarıldı ve biyokimyasal ölçümlerin yapılacağı güne kadar alüminyum folyolara sarılarak -80 °C de saklandı. Ayrıca histopatolojik çalışmalar için beyin dokusu hemen formaldehit içine konularak Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na gönderildi (n=4).

3.7. Değerlendirilen Parametreler

3.7.1. NRF2, NLRP3, IL-1 β , TNF-a, JAK2, STAT3, CREB, CaMKII, GLT-1, ve BDNF düzeylerinin belirlenmesi

Hipokampus; Nrf2 düzeyleri, Rat Nfe2I2 ELISA kiti (Fine Test, Çin, katalog no: ER0666), NLRP3 düzeyleri, Rat NLRP3 ELISA kiti (Fine Test, Çin, katalog no: ER1965), IL-1 β düzeyleri, Rat IL-1 β ELISA kiti (Fine Test, Çin, katalog no: ER1094), TNF-a düzeyleri, Rat TNF-a ELISA kiti (Fine Test, Çin, katalog no: ER1393), Jak2 düzeyleri, Rat Jak2 ELISA kiti (Fine Test, Çin, katalog no: ER6703), Stat3 düzeyleri, Rat Stat3 ELISA kiti (Fine Test, Çin, katalog no: ER0163), CREB düzeyleri, Rat CREB ELISA kiti (Fine Test, Çin, katalog no: ER0865), CaMKII düzeyleri, Rat CaMKII ELISA kiti (Fine Test, Çin, katalog no: ER1969), GLT-1 düzeyleri, Rat GLT-1 ELISA kiti (Fine Test, Çin, katalog no: ER1968) ve BDNF düzeyleri, Rat BDNF ELISA kiti (Fine Test, Çin, katalog no: ER0008) kullanılarak ölçüldü. Ölçüm kitin kullanım klavuzuna uygun olacak şekilde protokol basamakları sırasıyla izlendi ve bu basamaklar şu şekildedir:

- 1) Fosfat tampon solüsyonunun (PBS) hazırlandı
- 2) Doku homojenatları hazırlandı
- 3) Kullanılan kite uygun olacak şekilde standartlar ve blank hazırlandı
- 4) 30ml konsantre yıkama tamponu 750ml (25 kat) distile su ile seyreltilir ve iyice karıştırıldı
- 5) 20 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş boş plate 2 kez yıkama tamponu ile yıkandı
- 6) Blank, standartlar ve örneklerden 100µl plate'e eklenir ve üzeri kapatılıp 37°C'de 90dk inkübe edildi
- 7) İnkübasyonun ardından plate 2 kez yıkama tamponu ile yıkandı
- 8) Her kuyucuğa 100µl antikor eklenir ve üzeri kapatılıp 37°C'de 30dk inkübe edildi
- 9) İnkübasyonun ardından plate 3 kez yıkama tamponu ile yıkandı
- 10) Her kuyucuğa HRP-Streptavidin Konjugat (SABC) 100µl eklenir ve 37°C'de 90dk inkübe edildi
- 11) İnkübasyonun ardından plate 5 kez yıkama tamponu ile yıkandı
- 12) Her kuyucuğa 90µl TMB substratı eklenir ve plate alüminyum folyo ile kapatılır ve 37°C'de karanlıkta 10-20 dk inkübe edildi
- 13) Tüm kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu eklenir ve plate 450nm dalga boyunda mikroparka okuyucu ELISA cihazında (Awareness, Chromate 4300, USA) okundu (Şekil 22).



Şekil 22: Stop solüsyonu eklerken anlık gerçekleşen renk değişimi.

3.7.2.0.01M, pH=7.4 fosfat tampon solüsyonunun (PBS) hazırlanması

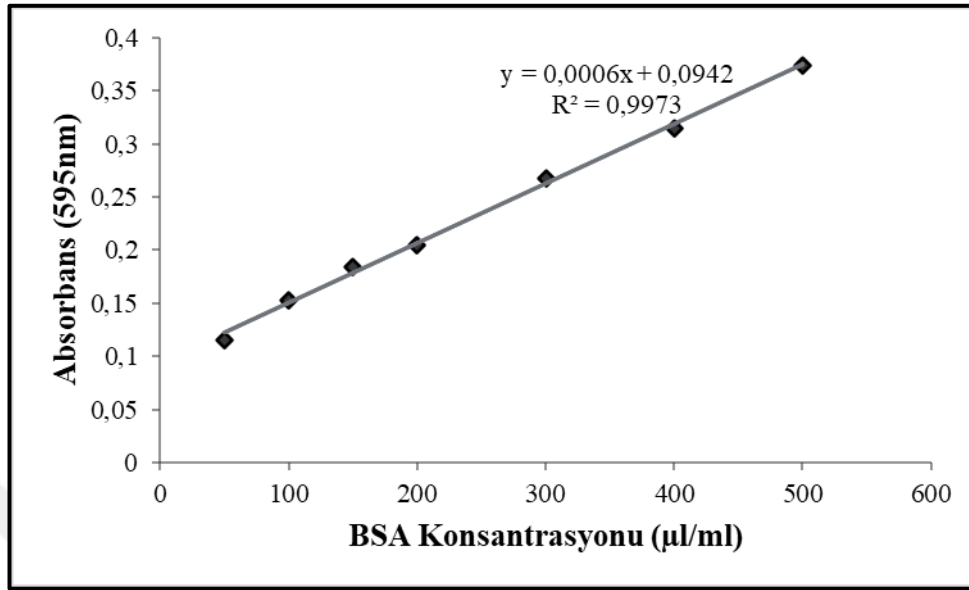
0.8 g NaCl (Merck KGaA, 106404 Darmstadt, Germany), 0.02 g KCl (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA, P9541), 0.144 g Na₂HPO₄ (Merck KGaA, 106580 Darmstadt, Germany) ve 0.024 g KH₂PO₄ (Merck KGaA, 10487, Darmstadt, Germany) tartılıp 100ml'ye distile su ile tamamlandı. Hazırlanan PBS tamponunun içerisine tüm kitlerin kullanım kılavuzunda ortak olarak belirtilen proteaz inhibitörü (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany) eklendi.

3.7.3. Doku homojenatlarının hazırlanması

Deneyin yapılacağı gün hipokampus dokuları -80°C dondurucudan çıkarıldı ve buz üstünde çözümleri sağlandı. Dokular tartıldıktan sonra plastik tüplere alındı ve üzerlerine ağırlığının 19 katı olacak şekilde PBS eklendi. Mekanik homojenizatörde parçalanarak homojenize edildi. Dokuların homojenizasyonu sonrası 3000xg'de 10dk santrifüj edildi. Kılavuzda belirtilen protein konsantrasyonunun mililitrede 0.3mg'ı geçmemesi gerektiği uyarısı dikkate alınarak örneklerde total protein konsantrasyonu belirlendi. Total protein konsantrasyonu Bradford Yöntemi ile belirlendi (168) ve işlem basamakları şu şekildeydi:

- 1) 5ml Brilliant Blue G (BR) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; B0770) üzerine 20ml distile su eklenip ve iyice karıştırıldı
- 2) Standart hazırlamak için 10mg Bumin Serum Albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; A7030) 10ml distile suda çözündürülerek stok solüsyonu hazırlandı
- 3) Hazırlanan 1mg/ml BSA çözeltisinden alınan belirli hacimler distile su ile seyreltilerek ml'de 50, 100, 150, 200, 300, 400 ve 500 µg protein taşıyan standart çalışma çözeltileri hazırlandı
- 4) PBS ile hazırlanmış örnekler ayrı ayrı ependorflarda 2, 5, 10 ve 20 kat olacak şekilde Sample Dilution Buffer ile seyreltilerek hazırlandı
- 5) Hazırlanan standartlardan ve örneklerden 20µl alınıp üzerlerine 1ml sulandırılmış boyadan eklendi ve 595nm dalga boyunda spektrofotometrik (UVmini1240 spectrophotometer, Shimadzu Co., Kyoto, Japan) olarak okundu.
- 6) Kör olarak distile su kullanıldı ve her örnek için 2 kez ölçüm yapıldı.

Absorbans değeri ve protein konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi gösteren standart grafik şu şekildedir (Şekil 23):



Şekil 23: Protein miktar tayini için standart eğri.

Örnekler, elde edilen verilere göre kılavuzun içerisinde bulunan Sample Dilution Buffer ile 10 kat seyreltme ile hazır hale getirildi.

3.7.4. Lipid peroksidasyonunun, protein karbonil gruplarının ve katalaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

Beyin dokusu örnekleri tartıldı ve ağırlığının 9 katı olacak şekilde 4°C’de 140mM KCl’li 20 mM fosfat tamponu (pH 7.4) ile homojenize edildi. 4°C’de 1200xg’de 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatantlar ayrıldı. Elde edilen süpernatantlar MDA seviyeleri, protein karbonil grupları tayini ve katalaz enzim aktivitesi tayini için kullanıldı.

3.7.4.1. İçerisinde 140mM KCl bulunan 20mM, pH=7.4 PBS hazırlanması

15.6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; S9638) tartılıp distile suyla 100ml’ye tamamlanarak 1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi hazırlandı. 26.81g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ tartılıp distile suyla 100ml’ye tamamlanarak 1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi hazırlandı. 22.6ml $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 77.4ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ çözeltileri

kariştırılarak pH'ı 7.4 olan ve 1 M PBS elde edildi. 1 M PBS'den 2 ml alınıp üzeri 100ml'ye distile su ile tamamlanarak 20 mM PBS hazırlandı. 20 mM PBS içerisinde 1.043g KCl çözdürülerek içerisinde 140mM KCl bulunan 20mM ve pH'sı 7.4 olan PBS elde edildi.

3.7.4.2. Protein miktarının belirlenmesi

Beyin dokusu total protein konsantrasyonunun tayini Lowry yöntemi ile gerçekleştirildi (169) ve işlem basamakları şu şekildeydi:

- 1) 0.4g NaOH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; S8045) tartılıp distile su ile 100ml'ye tamamlanarak 0.1 N sodyum hidroksit çözeltisi hazırlandı
- 2) 2g Na₂CO₃ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; S2127) tartılıp 100ml 0.1 N NaOH içinde çözdürülerek %2'lik sodyum karbonat çözeltisi hazırlandı
- 3) %2'lik sodyum potasyum tartarat (Merck, Darmstadt, Germany; 108380) zeltisi hazırlamak için 2g sodyum potasyum tartarat tartılıp 100ml'ye distile su ile tamamlandı
- 4) %1'lik bakır sülfat çözeltisi hazırlamak için 1g CuSO₄ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; Katalog No: C7631) tartılıp distile su ile 100ml'ye tamamlandı
- 5) 100 ml %2'lik Na₂CO₃ çözeltisine 1 ml %2'lik sodyum potasyum tartarat ve 1 ml %1'lik CuSO₄ zelteleri eklenerek taze alkali bakır çözeltisi hazırlandı
- 6) 1ml folin-ciocalteu fenol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; F9252) 1ml distile su ile seyreltilerek 1:1 oranında folin-ciocalteu fenol çözeltisi hazırlandı
- 7) Standart zeltiler hazırlamak için 10mg BSA 10ml distile suda çözdürülerek stok solüsyonu hazırlandı
- 8) Hazırlanan 1mg/ml BSA çözeltisinden alınan belirli hacimler distile su ile seyreltilerek ml'de 25, 50, 100, 150, 200, 300, 400 ve 500 g protein taşıyan standart çalışma çözeltileri hazırlandı
- 9) Süpernatantlar 10 kat distile su ile seyreltildi
- 10) Kr için distile su kullanıldı
- 11) Kr, standart ve örneklerden 40l mikro plakaya konuldu ve üzerlerine 200 l taze alkali bakır çözeltisi eklenip 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi
- 12) Her bir kuyucuğun üzerine 20 l folin-ciocalteu çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 1 saat bekletildi

- 13) Oluşan mavi renk köre karşı 750nm dalga boyunda mikro plaka okuyucuda okundu ve her ölçüm 2 kez tekrarlandı
- 14) Beyin dokusu örneklerinin protein miktarları standart eğri yardımıyla hesaplandı ve protein konsantrasyonu mg/ml cinsinden verildi.

3.7.4.3. MDA düzeyinin belirlenmesi

Lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak MDA seviyesinin belirlenmesinde Draper ve Hadley'in (170) yöntemi kullanıldı ve işlem basamakları şu şekildeydi:

- 1) %10'luk trikloroasetik asit çözeltisi hazırlamak için 10g TCA (Sigma-Chemical, St. Louis, MO, USA, T6399) tartılıp 100ml'ye distile su ile tamamlandı.
- 2) %67'lik tiyobarbitürik asit çözeltisi hazırlamak için 0.67g TBA tartılıp 100ml'ye distile su ile tamamlandı.
- 3) 50 nmol/ml stok TMP çözeltisi hazırlamak için 1 ml 1, 1, 3, 3-tetrametoksipropan (Merck, Darmstadt, Germany; 108383) alınıp distile su ile 100 ml'ye tamamlandı ve bu çözeltiden 823.4µl alınıp ve distile su ile 1 L'ye tamamlandı
- 4) Stok TMP çözeltisinden alınan belirli hacimler, distile su ile seyreltilerek 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 nmol/ml MDA taşıyan standartlar hazırlandı
- 5) Kör için distile su kullanıldı
- 6) Kör, standartlar ve örneklerden 200µl cam tüplere alındı ve üzerlerine 1ml %10'luk TCA eklendi
- 7) 95°C'de 15 dakika bekletildi ve süre sonunda soğumaları için çeşme suyunda bekletildi
- 8) +4°C'de 1.000xg'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar ayrıldı
- 9) Elde edilen süpernatantların üzerine miktarının iki katı olacak şekilde %67'lik TBA eklendi
- 10) 95°C'de 15 dakika bekletildi ve süre sonunda soğumaları için çeşme suyunda bekletildi
- 11) Oluşan pembe renk köre karşı 532nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak okundu ve her ölçüm 2 kez tekrarlandı
- 12) Beyin dokusu örneklerinin MDA seviyeleri standart eğri yardımıyla hesaplandı ve sonuç nmol/mg protein cinsinden verildi

3.7.4.4. Protein karbonil gruplarının belirlenmesi

Beyin dokusu protein karbonil gruplarının tayini Levine ve arkadaşlarının metodu kullanılarak gerçekleştirildi (171) ve işlem basamakları şu şekildeydi:

- 1) 2.5 N hidroklorik asit çözeltisi hazırlamak için 55.175ml %35'lik HCl (Merck, Darmstadt, Germany; 100317) distile su ile 250ml'ye tamamlandı
- 2) 10 mM dinitrofenilhidrazin çözeltisi hazırlamak için 0.099g DNPH (Sigma-Chemical, St. Louis, MO, USA, D199303) tartılıp 2.5 N HCl asit ile 50ml'ye tamamlandı
- 3) %20'lik trikloroasetik asit çözeltisi hazırlamak için 20g TCA tartılıp distile su ile 100ml'ye tamamlandı
- 4) 6 M Guanidin çözeltisi hazırlamak için 28.659g guanidin hidroklorür (Sigma-Chemical, St. Louis, MO, USA, G4505) tartılıp 20 mM PBS ile 50 ml'ye tamamlandı
- 5) %50'lik etanol-etilasetat çözeltisi hazırlamak için eşit hacimde olacak şekilde etanol (Isolab Chemicals IST 64-17-5) ve etilasetatın (Isolab Chemicals IST 141-78-6) karıştırılarak hazırlandı
- 6) Süpernatantlar 10 kat distile su ile seyreltildi
- 7) 200µl seyreltilmiş süpernatantlar 400µl 10 mM DNPH çözeltisi ile karıştırılarak örnekler hazırlandı
- 8) 200µl seyreltilmiş süpernatantlar 400µl 2.5 N HCl çözeltisi ile karıştırılarak örnek körleri hazırlandı
- 9) Hazırlanan örnek ve örnek körleri 1 saat karanlıkta, oda sıcaklığında ve 15 dakika arayla vortekslenerek bekletildi
- 10) Bekleme süresinin sonunda örnek ve örnek körlerinin üzerine 600µl %20'lik TCA eklenip 10 dakika buz üzerinde bekletildi
- 11) 5 dakika 10.000xg'de santrifüj edildikten sonra süpernatantlar atıldı ve peletlerin üzerine 1 ml etanol-etilasetat çözeltisi eklendi
- 12) Tekrar 10.000xg'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar atıldı
- 13) Peletlerin üzerine 800µl 6 M guanidin çözeltisi eklendi
- 14) Önce pipet ucuyla karıştırarak sonra 60°C'de 15 dakika inkübe ederek peletlerin çözünmesi sağlandı
- 15) 3 dakika 10.000xg'de 3 santrifüj edildikten sonra süpernatantlar ölçüm için kullanıldı.

- 16) Örnek ve örnek körlerinin süpernatantlarından 220 µl'lik hacimler halinde mikropalakaya alındı ve 370 nm dalga boyunda mikropalaka okuyucuda okundu. Her ölçüm 2 kez tekrarlandı
- 17) Beyin dokusu protein karbonil düzeyleri (Δ Absorbans/Ekstinksiyon Katsayısı) x Seyreltme Faktörü olarak hesaplandı ve nmol karbonil/mg protein olarak verildi (Δ Absorbans=Absorbans_{örnek}-Absorbans_{örnek körü}) (Ekstinksiyon Katsayısı 0.011 µM⁻¹ olarak hesaplandı)

3.7.4.5. Katalaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

Beyin dokusu katalaz enzim aktivitesinin tayini Goth'un amonyum molibdat ile stabil bir kompleks oluşturan H₂O₂'in spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi metodu kullanılarak gerçekleştirildi (172) ve işlem basamakları şu şekildeydi:

- 1) 60 mM, pH=7 PBS hazırlamak için 6ml 1 M fosfat tamponundan alınıp 100ml'ye distile su ile tamamlandı.
- 2) 50 µl'sinde 6.5 µmol H₂O₂ içeren 130 mM hidrojen peroksit çözeltisi hazırlamak için 1.327ml %30'luk H₂O₂ (Sigma-Chemical, St. Louis, MO, USA, H1009) çözeltisi alınıp 100 ml'ye 60 mM fosfat tamponuyla tamamlandı
- 3) 32.4 mM amonyum molibdat çözeltisi hazırlamak için 4.004 g amonyum molibdat (Sigma-Chemical, St. Louis, MO, USA, A7302) tartılıp 100 ml'ye distile su ile tamamlandı
- 4) Örnekleri hazırlamak için süpernatantlar 10 kat distile su ile seyreltildi
- 5) 50 µl süpernatant 50µl 130 mM H₂O₂ ile 37°C'de 60 saniye inkübe edildi
- 6) İnkübasyonun ardından 100µl 32.4 mM amonyum molibdat çözeltisinin eklenmesi ile reaksiyon durduruldu (Absorbans 1).
- 7) 1. Örnek körünü hazırlamak için 50µl 130 mM H₂O₂ çözeltisi 100µl 32.4 mM amonyum molibdat çözeltisi ile karıştırılıp üzerine 50µl süpernatant eklendi (Absorbans 2)
- 8) 2. Örnek körünü hazırlamak için 50µl 130 mM H₂O₂ çözeltisi 100µl 32.4 mM amonyum molibdat çözeltisi ile karıştırılıp üzerine 60 mM PBS eklendi (Absorbans 3: 6.5 µmol H₂O₂'in 405 nm'de verdiği absorbans değeridir)
- 9) Örnek ve örnek körlerinin süpernatantları mikropalakaya alındı ve 405 nm dalga boyunda mikropalaka okuyucuda okundu. Her ölçüm 2 kez tekrarlandı

10) Beyin dokusu katalaz enzim aktivitesi ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{dk}$) = ($\Delta\text{Absorbans} \times 6.5 \times 1000$ x Seyreltme Faktörü) / (Absorbans 3 x 50) olarak hesaplandı ve $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{dk} / \text{mg}$ protein olarak verildi ($\Delta \text{Absorbans} = \text{Absorbans 2} - \text{Absorbans 1}$)

3.7.5. GSH düzeyinin belirlenmesi

Major endojen antioksidanlardan biri olan GSH düzeyini belirlemek için Aykac ve ark.'nın metodu kullanıldı (173) ve işlem basamakları şu şekildeydi:

- 1) %10'luk trikloroasetik asit çözeltisi hazırlamak için 10g TCA tartılıp 100ml'ye distile su ile tamamlandı.
- 2) 0.3 M Na_2HPO_4 çözeltisi hazırlamak için $2\text{H}_2\text{O}$ 'lu Na_2HPO_4 10.65g tartılıp 200ml'ye distile su ile tamamlandı
- 3) %1'lik 5-5 Na-sitrat çözeltisi hazırlamak için 1.38g 5-5 Na-sitrat (Sigma-Chemical, St. Louis, MO, USA, S4641) tartılıp 100ml'ye distile su ile tamamlandı
- 4) Ditiobisnitrobenzoat çözeltisi hazırlamak için 40mg DTNB tartılıp %1'lik 5-5 Na-sitrat (Sigma-Chemical, St. Louis, MO, USA, D8130) çözeltisi ile 100ml'ye tamamlandı
- 5) Beyin dokuları tartıldı ve ağırlığının 9 katı olacak şekilde %10'luk TCA ile homojenize edildi
- 6) Elde edilen homojenatlar $3000\times g$ 'de $18-20^\circ\text{C}$ 'de 15 dakika santrifüj edildi
- 7) 250 μl süpernatanta 1 ml 0.3 M Na_2HPO_4 çözeltisi eklendi
- 8) 125 μl DTNB çözeltisi eklendi
- 9) Oda sıcaklığında (25°C) 10 dakika bekletildi
- 10) Kör olarak distile su kullanıldı
- 11) Örnekler 412 nm'de spektrofotometrik olarak absorbans değerleri okundu. Her ölçüm 2 kez tekrarlandı
- 12) Beyin dokusu GSH seviyeleri (Absorbans değeri x 4.23) / doku ağırlığı olarak hesaplandı ve $\mu\text{mol}/\text{gram}$ doku cinsinden verildi

3.7.6. AChE enzim aktivitesinin belirlenmesi

Kolinerjik sistemin önemli bir göstergesi olan AChE düzeyini belirlemek için Ellman ve ark.'nın metodu kullanıldı (174) ve işlem basamakları şu şekildeydi:

- 1) 1 M K_2HPO_4 hazırlamak için 17.418g K_2HPO_4 (Sigma-Chemical, St. Louis, MO, USA, P3786) tartılıp 100ml'ye distile su ile tamamlandı
- 2) 1 M KH_2PO_4 hazırlamak için 13.609g KH_2PO_4 tartılıp 100ml'ye distile su ile tamamlandı
- 3) 0.1 M, pH=7.0 PBS hazırlamak için 61.5 ml 1 M K_2HPO_4 ile 38.5 ml 1 M KH_2PO_4 karıştırıldı
- 4) 0.1 M, pH=8.0 PBS hazırlamak için 94ml 1 M K_2HPO_4 ile 6ml 1 M KH_2PO_4 karıştırıldı
- 5) Substrat olarak 0.075 M asetiltiyokolin iyodür hazırlamak için 216.80mg asetiltiyokolin iyodür (Sigma-Chemical, St. Louis, MO, USA, A5751) 10ml'ye distile su ile tamamlandı
- 6) Reaktif olarak 39.6mg DTNB 10ml 0.1 M, pH=7.0 PBS ile çözündürölüp çözeltinin içine 15mg $NaHCO_3$ eklendi
- 7) 20mg doku başına 1ml 0.1 M, pH=8.0 PBS olacak şekilde dokular homojenize edildi
- 8) 5000xg'de 10 dakika 4°C'de santrifüj edildi
- 9) Elde edilen süpernatantlardan 0.2ml alınıp 1.3ml 0.1 M, pH=8.0 PBS içeren tüpe eklendi
- 10) DTNB reaktifinden 50µl eklendi ve oda sıcaklığında (25°C) 20 dakika bekletildi
- 11) Absorbans değeri 412 nm'de ölçüldü absorbans değerindeki artış durduğunda bu değer kör olarak kullanıldı
- 12) 10µl asetiltiyokolin iyodür substratından tüpe eklendi ve 0. ve 5. dakikalardaki absorbans değerleri kaydedildi
- 13) Hipokampus dokusu AChE enzim aktivitesi düzeyi $[\Delta \text{Absorbans}/t(\text{zaman})] \times [\text{toplam hacim}/\text{örnek hacmi}] \times 13.6$ denkleminde hesaplandı ve U/mg protein cinsinden verildi ($\Delta \text{Absorbans} = \text{Absorbans } 5\text{dk} - \text{Absorbans } 0.\text{dk}$)
- 14) Hipokampus dokusu protein konsantrasyonunun tayini yukarıda belirtildiği üzere Lowry yöntemi ile gerçekleştirildi

3.8. Histopatolojik İnceleme

Histopatolojik inceleme için her gruptan 4 hayvan olacak şekilde toplam 16 beyin dokusu kullanıldı. Her ratdan alınan beyin dokusu, %10'luk tamponlu nötral formalin solüsyonunda fikse edildi. Beyin dokularından frontal kutuptan başlayarak

okspital kutup boyunca 2-3 mm kalınlığında seri koronal doku kesitleri alındı ve bu doku kesitleri kasetlenerek doku takip işlemi yapıldı. Doku takip işleminden sonra beyin dokuları parafin bloklara gömüldü. Parafine gömülü beyin doku örneklerinden mikrotom cihazı ile lamlara 3-4µm kalınlığında ince kesitler alındı. Lamlar üzerindeki doku kesitleri daha sonra deparafinize edildi ve hematoksilen-eozin (H&E) boyası ile boyandı. Hipokampal hasar, histopatolojik olarak CA1 ve CA3 alt bölgelerindeki stratum piramidaldeki sağlam nöronların sayısı, ışık mikroskopunda en büyük büyütme alanında (Leica DM2500 ışık mikroskop, x10 oküler lens, x40 objektif lens; BBA= 0.55 mm², Almanya) sayılarak tespit edildi. Sadece normal görünümdeki nükleusa sahip nöronlar sayıldı. Her çalışma grubunun her iki hemisferi için hipokampal bölümlerdeki CA1 ve CA3 alt bölgelerindeki (0.55 mm² deki) ortalama nöron sayısı hesaplandı. Her çalışma grubundan histopatolojik görüntüler (Zeiss Mikroskop, Axio Imager.A2m, ABD) elde edildi.

3.9. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS 22.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Dört grubun sayısal değişkenler bakımından karşılaştırılmasında one-way ANOVA testi kullanıldı. one-way ANOVA testi anlamlı bulunduğunda alt grupların ikişerli karşılaştırılması ise post-hoc Bonferroni testi ile yapıldı. Tekrarlı ölçümlerin değerlendirilmesinde Friedman testinden faydalanıldı. İki sayısal değişken arasındaki ilişki Spearman korelasyon analizi ile incelendi. Ek olarak, haftalık vücut ağırlıklarının yüzde değişimlerinin (yd1, yd2, yd3, gibi) gruplar arası karşılaştırılması için Kruskal-Wallis H Testi kullanılmış; ancak bu değişkenlerde anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$). Tüm analizlerde istatistiksel anlamlılık sınırı $p<0.05$ olarak kabul edilmiştir. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata, ortanca, minimum ve maksimum değerler şeklinde özetlenmiş; tablo ve grafiklerle desteklenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Vücut Ağırlığı Sonuçları

Deneyin ilk günü ve deney süresi boyunca haftalık olacak şekilde vücut ağırlıkları takibi yapıldığında;

Kontrol grubundaki hayvanların haftalık vücut ağırlıklarında artış olduğu görüldü ($p<0.001$). Buna göre yapılan haftalık ikili karşılaştırmalarda 4. hafta ($p=0.013$), 5. hafta ($p=0.001$), 6. hafta ($p=0.004$), 7. hafta ($p<0.001$), 8. hafta ($p<0.001$) ve 9. hafta ($p<0.001$) ağırlıklarında ilk gün ağırlıklarına göre anlamlı bir şekilde arttığı görüldü. 5. hafta ($p=0.015$), 6. hafta ($p=0.042$), 7. hafta ($p=0.001$), 8. hafta ($p<0.001$) ve 9. hafta ($p<0.001$) ağırlıkları 1. hafta ağırlıkları ile kıyaslandığında anlamlı bir şekilde arttığı görüldü. 8. hafta ($p=0.001$) ve 9. hafta ($p=0.001$) ağırlıklarında 2. hafta ağırlıkları ile kıyaslandığında anlamlı bir şekilde arttığı görüldü. Ayrıca 8. hafta ($p=0.029$) ve 9. hafta ($p=0.042$) ağırlıklarının 3. hafta ağırlıkları ile kıyaslandığında anlamlı bir şekilde arttığı görüldü.

KSH grubundaki hayvanların haftalık vücut ağırlıklarında artış olduğu görüldü ($p<0.001$). Buna göre yapılan haftalık ikili karşılaştırmalarda 4. hafta ($p=0.001$), 5. hafta ($p<0.001$), 6. hafta ($p<0.001$), 7. hafta ($p=0.012$), 8. hafta ($p<0.001$) ve 9. hafta ($p<0.001$) ağırlıklarında ilk gün ağırlıklarına göre anlamlı bir şekilde arttığı görüldü. 4. hafta ($p=0.018$), 5. hafta ($p=0.005$), 6. hafta ($p=0.007$), 8. hafta ($p<0.001$) ve 9. hafta ($p<0.001$) ağırlıkları 1. hafta ağırlıkları ile kıyaslandığında anlamlı bir şekilde arttığı görüldü. 8. hafta ($p=0.020$) ve 9. hafta ($p=0.023$) ağırlıklarında 2. hafta ağırlıkları ile kıyaslandığında anlamlı bir şekilde arttığı görüldü.

KSH+SPİ25 grubundaki hayvanların haftalık vücut ağırlıklarında artış olduğu görüldü ($p<0.001$). Buna göre yapılan haftalık ikili karşılaştırmalarda 4. hafta ($p=0.003$), 5. hafta ($p<0.001$), 6. hafta ($p=0.010$), 7. hafta ($p=0.010$), 8. hafta ($p<0.001$) ve 9. hafta ($p<0.001$) ağırlıklarında ilk gün ağırlıklarına göre anlamlı bir şekilde arttığı görüldü. 4. hafta ($p=0.019$), 5. hafta ($p=0.001$), 8. hafta ($p<0.001$) ve 9. hafta ($p<0.001$) ağırlıkları 1. hafta ağırlıkları ile kıyaslandığında anlamlı bir şekilde arttığı görüldü. 8. hafta ($p=0.042$) ve 9. hafta ($p=0.017$) ağırlıklarında 2. hafta ağırlıkları ile kıyaslandığında anlamlı bir şekilde arttığı görüldü.

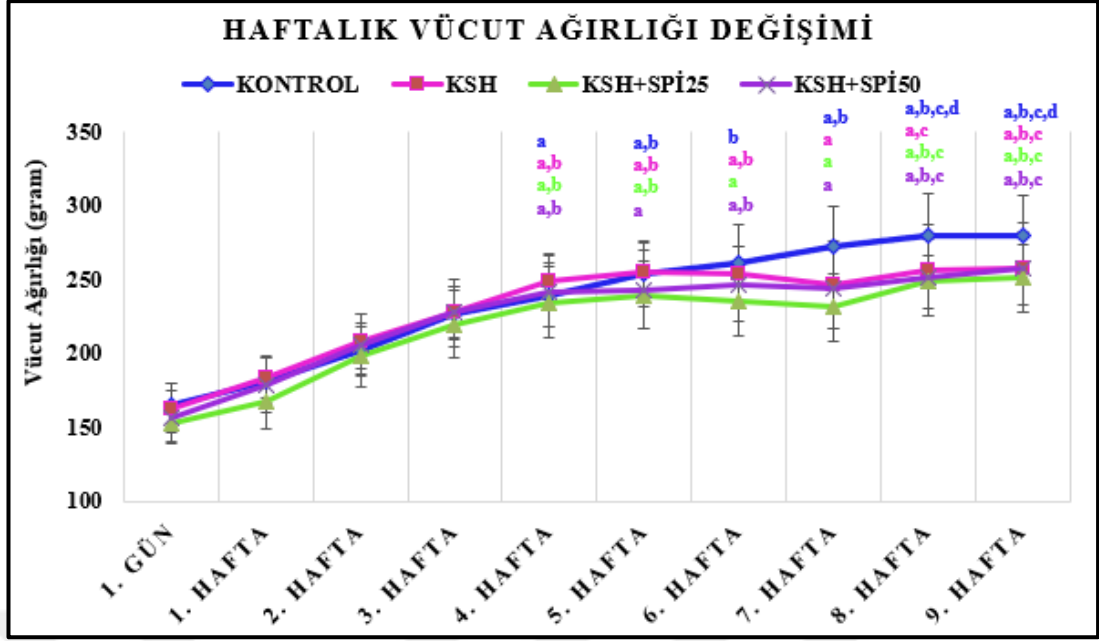
KSH+SPİ50 grubundaki hayvanların haftalık vücut ağırlıklarında artış olduğu görüldü ($p<0.001$). Buna göre yapılan haftalık ikili karşılaştırmalarda 4. hafta

($p<0.001$), 5. hafta ($p=0.003$), 6. hafta ($p<0.001$), 7. hafta ($p=0.005$), 8. hafta ($p<0.001$) ve 9. hafta ($p<0.001$) ağırlıklarında ilk gün ağırlıklarına göre anlamlı bir şekilde arttığı görüldü. 4. hafta ($p=0.010$), 6. hafta ($p=0.010$), 8. hafta ($p<0.001$) ve 9. hafta ($p<0.001$) ağırlıkları 1. hafta ağırlıkları ile kıyaslandığında anlamlı bir şekilde arttığı görüldü. 8. hafta ($p=0.010$) ve 9. hafta ($p=0.001$) ağırlıklarında 2. hafta ağırlıkları ile kıyaslandığında anlamlı bir şekilde arttığı görüldü (Tablo 3) (Şekil 24).

Tablo 3: Haftalık vücut ağırlıklarının grup içi karşılaştırmaları

Ağırlık (g)	Kontrol	KSH	KSH+SPİ25	KSH+SPİ50
1. GÜN	163 (140-191)	169 (140-182)	156 (132-179)	152 (134-191)
1. HAFTA	184 (156-206)	188 (159-202)	160 (137-196)	174 (154-216)
2. HAFTA	204 (178-225)	210.5 (172-237)	193 (167-232)	206 (183-248)
3. HAFTA	230 (197-258)	222.5 (205-261)	219 (188-270)	231 (204-272)
4. HAFTA	240 (200-278) ^a	250.5 (210-273) ^{a, b}	238 (200-285) ^{a, b}	248 (215-288) ^{a, b}
5. HAFTA	257 (216-295) ^{a, b}	252 (223-286) ^{a, b}	244 (200-280) ^{a, b}	240 (218-295) ^a
6. HAFTA	257 (212-301) ^b	251 (225-281) ^{a, b}	237 (193-275) ^a	236 (210-296) ^{a, b}
7. HAFTA	273 (216-315) ^{a, b}	246.5 (193-290) ^a	233 (193-267) ^a	234 (204-293) ^a
8. HAFTA	277 (221-321) ^{a, b, c, d}	252 (197-300) ^{a, c}	250 (218-278) ^{a, b, c}	242 (213-302) ^{a, b, c}
9. HAFTA	279 (224-319) ^{a, b, c, d}	260 (200-303) ^{a, b, c}	246 (210-286) ^{a, b, c}	248 (225-305) ^{a, b, c}
p	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Değerler ortanca (min-max) olarak verilmiştir. ^a1.güne, ^b1.haftaya, ^c2. haftaya, ^d3. haftaya göre anlamlı farkı göstermektedir. $p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.



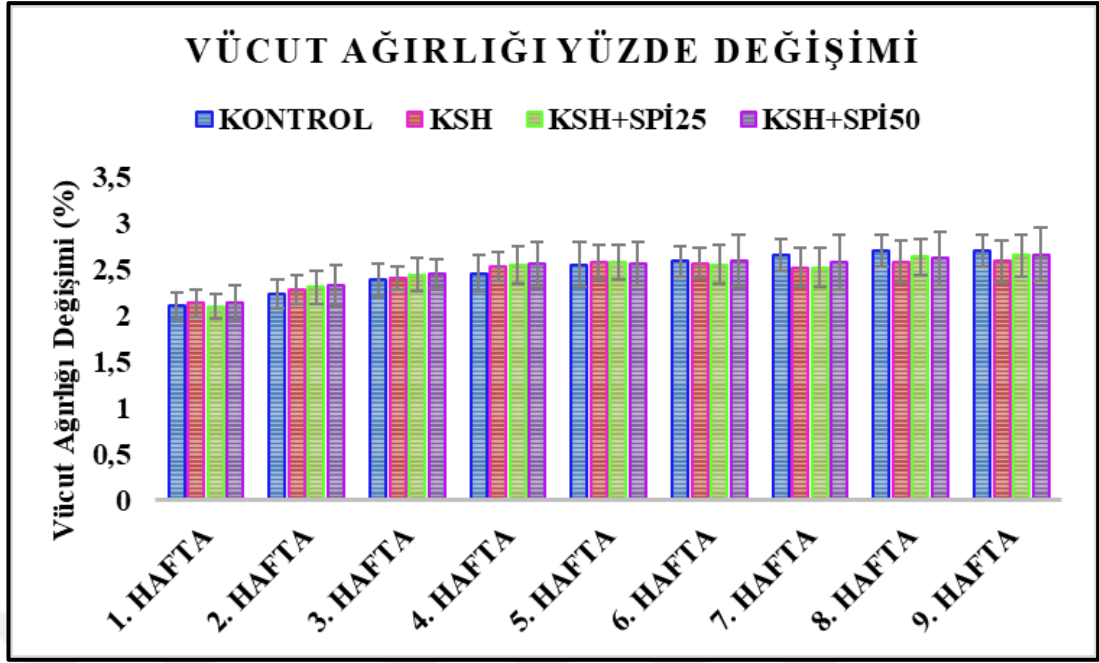
Şekil 24: Tüm grupların haftalık vücut ağırlıklarındaki değişimin grup içi karşılaştırmaları. Sonuçlar Ortalama $\pm$ Standart Sapma olarak gösterilmiştir. ^a1. güne göre, ^b1.haftaya göre, ^c2. haftaya göre, ^d3. haftaya göre istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir, $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Gruplar arasındaki haftalık vücut ağırlığı değişiminin yüzdelik değerleri (yd) hesaplandı. Gruplar arasındaki haftalık vücut ağırlığı değişiminin yd'nde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır $p < 0.05$ (Tablo 4) (Şekil 25).

Tablo 4: Vücut ağırlıklarının haftalık yüzde değişimleri

yd	Kontrol	KSH	KSH+SPİ25	KSH+SPİ50	P
1. HAFTA	2.07 (1.94-2.41)	2.10 (1.95-2.40)	2.09 (1.85-2.34)	2.07 (1.96-2.61)	0.930
2. HAFTA	2.20 (2.03-2.54)	2.27 (2.02-2.51)	2.28 (2.06-2.62)	2.29 (1.99-2.71)	0.674
3. HAFTA	2.37 (2.03-2.58)	2.40 (2.24-2.56)	2.39 (2.20-2.85)	2.50 (2.16-2.67)	0.684
4. HAFTA	2.44 (2.14-2.71)	2.55 (2.31-2.75)	2.52 (2.12-2.82)	2.55 (2.21-3.01)	0.715
5. HAFTA	2.52 (2.13-3.01)	2.59 (2.34-3.01)	2.56 (2.27-2.96)	2.57 (2.16-2.90)	0.991
6. HAFTA	2.57 (2.33-2.84)	2.53 (2.30-2.83)	2.53 (2.17-3.00)	2.53 (2.23-3.21)	0.949
7. HAFTA	2.67 (2.35-2.90)	2.55 (2.07-2.78)	2.51 (2.21-3.02)	2.49 (2.23-2.19)	0.294
8. HAFTA	2.67 (2.38-2.98)	2.61 (2.09-2.85)	2.60 (2.30-3.07)	2.54 (2.29-3.25)	0.537
9. HAFTA	2.68 (2.40-2.97)	2.64 (2.11-2.88)	2.63 (2.25-3.12)	2.62 (2.26-3.20)	0.807

Değerler ortanca (min-max) olarak verilmiştir. Gruplar arasında anlamlı fark bulunmamaktadır ($p > 0.05$).



Şekil 25: Tüm grupların haftalık vücut ağırlıklarındaki yüzde değişimin gruplar arası karşılaştırmaları. Sonuçlar Ortalama $\pm$ Standart Sapma olarak gösterilmiştir. Gruplar arasında anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0.05$).

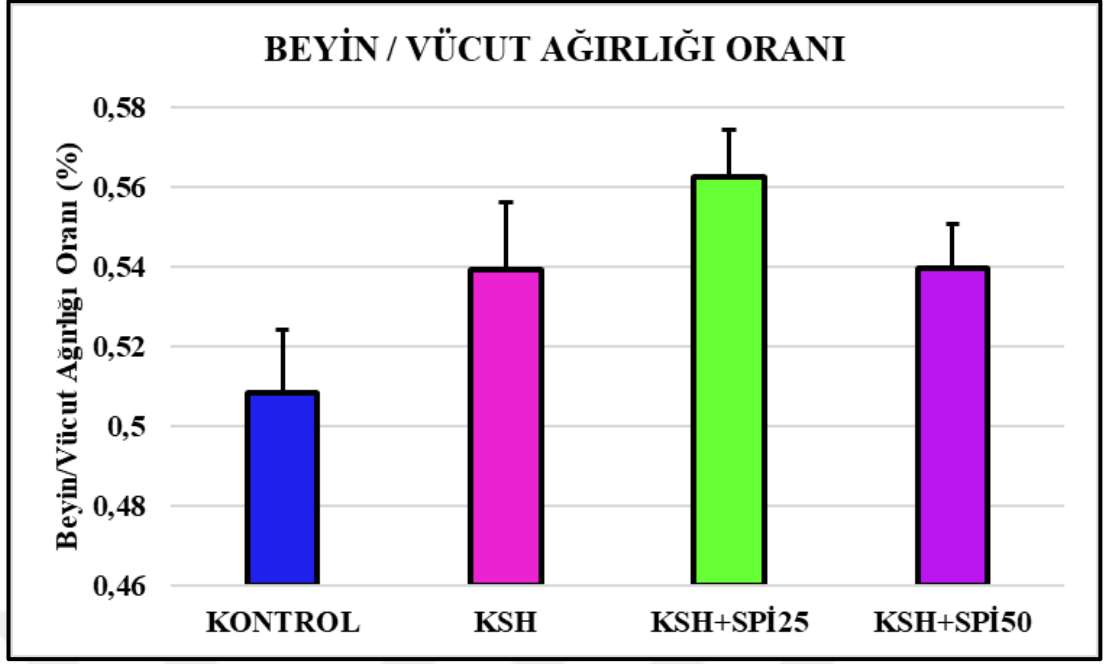
4.2. Beyin/Vücut Ağırlığı Oranı Sonuçları

Gruplardaki hayvanların beyin/vücut ağırlığı oranı gruplar arası karşılaştırıldığında anlamlı bir fark görülmedi ($p=0.073$). Grupların beyin/vücut ağırlığı yüzde oranları Tablo 5 ve Şekil 26 verilmiştir. Gruplar arası ikili karşılaştırmalarda anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Tablo 5: Beyin/Vücut Ağırlığı yüzde oranları

	Kontrol	KSH	KSH+SPI25	KSH+SPI50	p
Beyin/Vücut Ağırlığı (%)	0.50 $\pm$ 0.01	0.53 $\pm$ 0.01	0.56 $\pm$ 0.01	0.53 $\pm$ 0.01	0.073

Değerler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. Gruplar arasında anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0.05$).



Şekil 26: Tüm grupların beyin ağırlıklarının vücut ağırlıklarına yüzde oranlarının karşılaştırmaları. Değerler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. Grupların arasında anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0.05$).

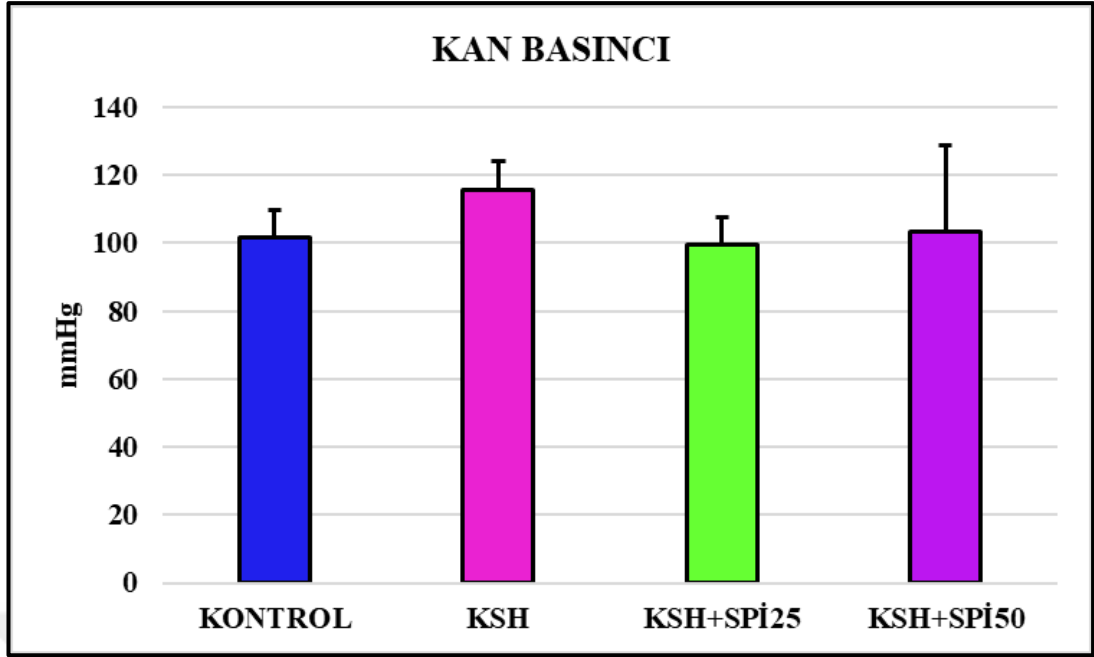
4.3. Kan Basıncı ve Kalp Hızı Sonuçları

Deneyin son günü hayvanlar feda edilmeden önce anestezi altında ölçülen direkt arteriyel kan basıncı ($p=0.294$) ve kalp hızları ($p=0.476$) arasında gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Tüm grupların kan basıncı ve kalp hızı /sonuçları Tablo 6 ve Şekil 27, Şekil 28’de verilmiştir.

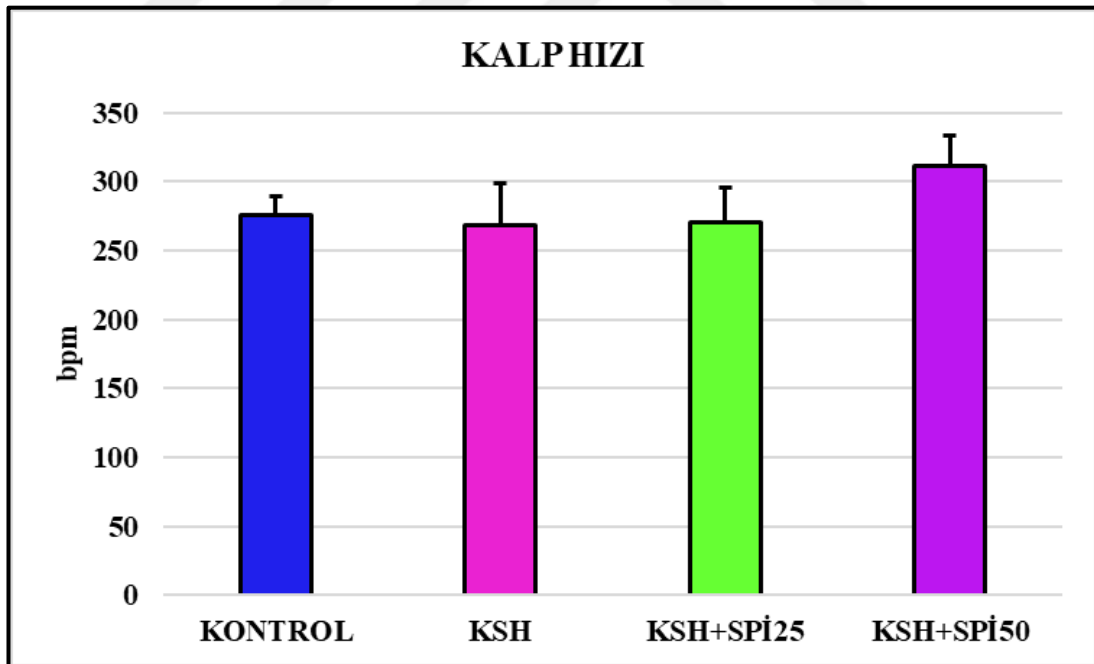
Tablo 6: Tüm grupların kan basıncı ve kalp hızı değerleri

	Kontrol	KSH	KSH+SPİ25	KSH+SPİ50	p
Kan Basıncı (mmHg)	101.63 $\pm$ 8.15	115.8 $\pm$ 8.31	99.7 $\pm$ 8.01	103.27 $\pm$ 25.47	0.294
Kalp Hızı (bpm)	276.09 $\pm$ 13.10	268.10 $\pm$ 30.12	270.34 $\pm$ 24.99	310.84 $\pm$ 22.22	0.476

Değerler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. Gruplar arasında anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0.05$).



Şekil 27: Kan basınçlarının gruplar arası karşılaştırmaları. Değerler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. Gruplar arasında anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0.05$).



Şekil 28: Kalp hızının gruplar arası karşılaştırmaları. Değerler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. Gruplar arasında anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0.05$).

4.4. Morris Su Labirent Testi Sonuçları

4.4.1. Platformu bulma süreleri

Tüm grupların grup içi günlük platformu bulma süreleri kıyaslandığında;

Kontrol grubundaki hayvanların platformu bulma sürelerinin 3. günün 1. güne göre ($p=0.019$), 4. günün 1. güne ($p<0.001$) ve 2. güne ($p=0.003$) göre, 5.günün 1. güne ($p<0.001$) ve 2. güne ($p=0.002$) göre anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur.

KSH grubundaki hayvanların platformu bulma sürelerinin 3. günün 1. güne göre ($p=0.009$), 4. günün 1. güne ($p=0.007$) ve 5.günün 1. güne ($p<0.001$) göre anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur.

KSH+SPİ25 grubundaki hayvanların platformu bulma sürelerinin 3. günün 1. güne göre ($p=0.004$) ve 5.günün 1. güne ($p<0.001$) göre anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur.

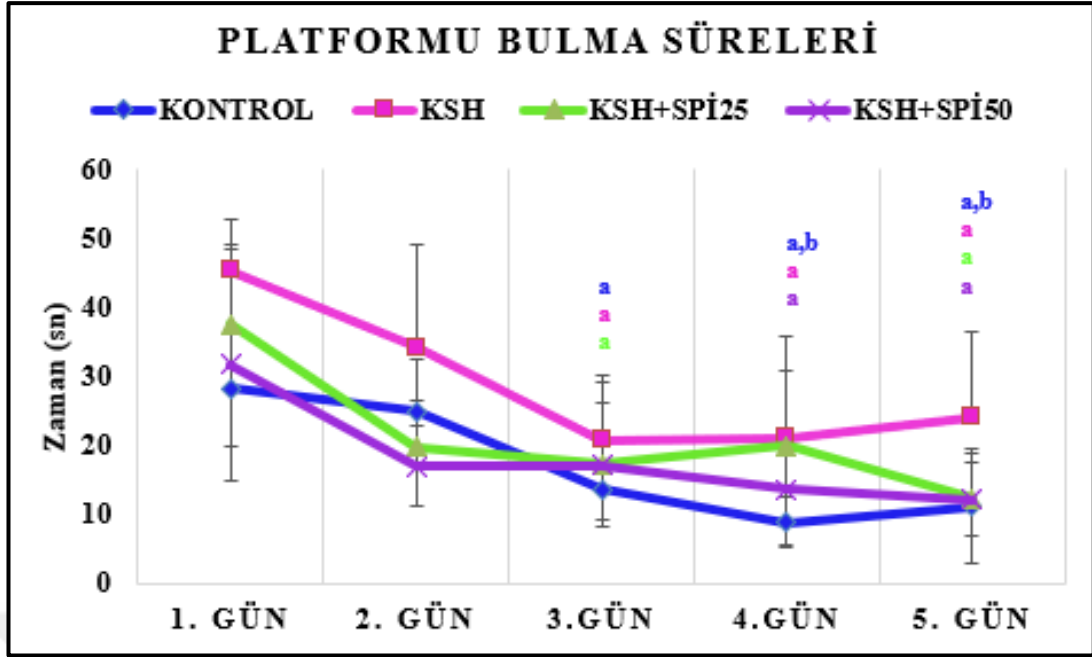
KSH+SPİ50 grubundaki hayvanların platformu bulma sürelerinin 4. günün 1. güne göre ($p=0.006$) ve 5.günün 1. güne ($p=0.019$) göre anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur.

Tüm grupların grup içi günlük platformu bulma süreleri tablo 7 ve şekil 29’da verilmiştir.

Tablo 7: Grup içi günlük platformu bulma süreleri karşılaştırmaları

	Kontrol	KSH	KSH+SPİ25	KSH+SPİ50
1.GÜN	25 (20-46)	47 (37-60)	36 (21-60)	28 (13-60)
2.GÜN	25 (11-37)	35.5 (9-55)	19 (13-30)	15 (10-28)
3.GÜN	13 (7-23) ^a	19 (9-33) ^a	15 (5-50) ^a	16 (5-33)
4.GÜN	8 (5-15) ^{a, b}	17 (5-52) ^a	18 (6-41)	12 (4-28) ^a
5.GÜN	8 (3-27) ^{a, b}	20 (7-48) ^a	10 (4-29) ^a	13 (6-21) ^a
p	<0.001	<0.001	<0.001	0.005

Değerler ortanca (min-max) olarak verilmiştir. ^a1. güne göre, ^b2. güne göre istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir, $p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.



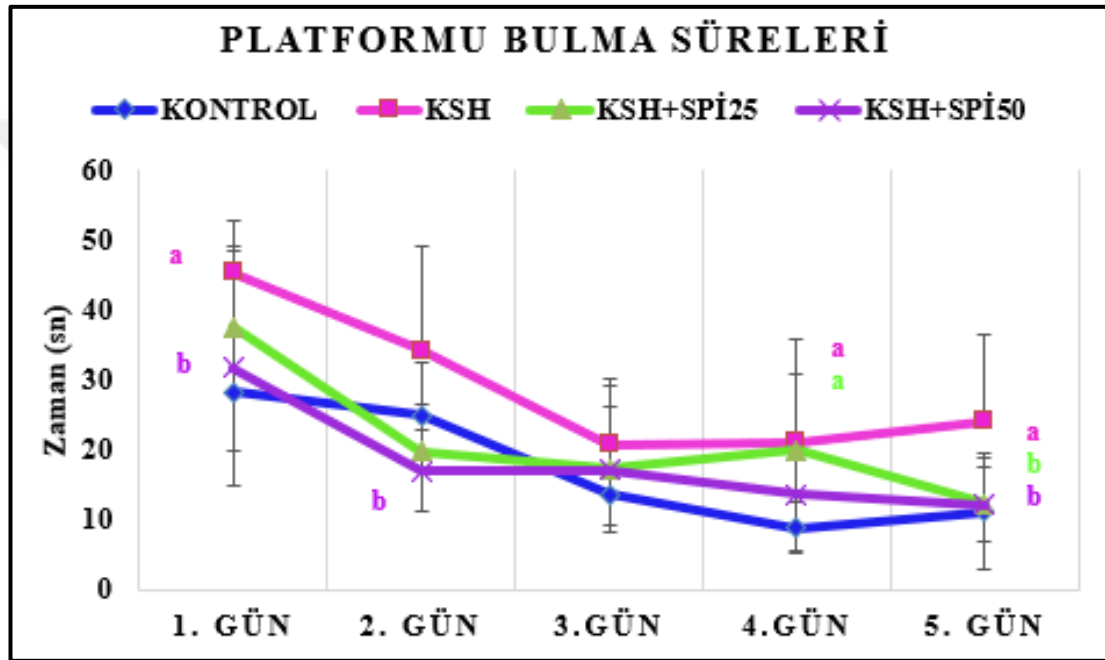
Şekil 29: Tüm grupların grup içi günlük platformu bulma sürelerinin karşılaştırmaları. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. ^a1. güne göre, ^b2. güne göre istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir, $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Tüm grupların gruplar arası günlük platformu bulma süreleri kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farklar görüldü. 1. gün KSH grubu kontrol grubuna kıyasla platformu daha yüksek bir sürede bulurken ($p=0.010$), KSH+SPİ50 grubu KSH grubuna kıyasla platformu daha düşük bir sürede bulduğu görüldü ($p=0.042$). 2. gün KSH+SPİ50 grubunun KSH grubuna kıyasla platformu daha düşük sürede bulduğu görüldü ($p=0.008$). 3. Gün gruplar arası anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0.275$). 4. gün hem KSH grubunun ($p=0.013$) hem de KSH+SPİ25 ($p=0.009$) grubunun kontrol grubuna kıyasla platformu daha yüksek bir sürede buldukları görüldü. 5. gün KSH grubu kontrol grubuna kıyasla platformu daha yüksek bir sürede bulurken ($p=0.002$), hem KSH+SPİ25 ($p=0.024$) grubunun hem de KSH+SPİ50 ($p=0.021$) grubunun KSH grubuna kıyasla platformu daha düşük bir sürede bulduğu görüldü. Gruplar arası günlük platformu bulma süreleri tablo 8 ve şekil 30'da verilmiştir.

Tablo 8: Gruplar arası günlük platformu bulma sürelerinin karşılaştırmaları

	Kontrol	KSH	KSH+SPİ25	KSH+SPİ50	p
1. GÜN	25 (20-46)	47 (37-60) ^a	36 (21-60)	28 (13-60) ^b	0.009
2. GÜN	25 (11-37)	35.5 (9-55)	19 (13-30)	15 (10-28) ^b	0.007
3. GÜN	13 (7-23)	19 (9-33)	15 (5-50)	16 (5-33)	0.275
4. GÜN	8 (5-15)	17 (5-52) ^a	18 (6-41) ^a	12 (4-28)	0.027
5. GÜN	8 (3-27)	20 (7-48) ^a	10 (4-29) ^b	13 (6-21) ^b	0.017

Değerler ortanca (min-max) olarak verilmiştir. ^aKontrol grubuna, ^bKSH grubuna göre istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir, $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 30: Gruplar arası günlük platformu bulma sürelerinin karşılaştırmaları. Sonuçlar Ortalama $\pm$ Standart Sapma olarak gösterilmiştir. ^aKontrol grubuna, ^bKSH grubuna göre istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir, $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

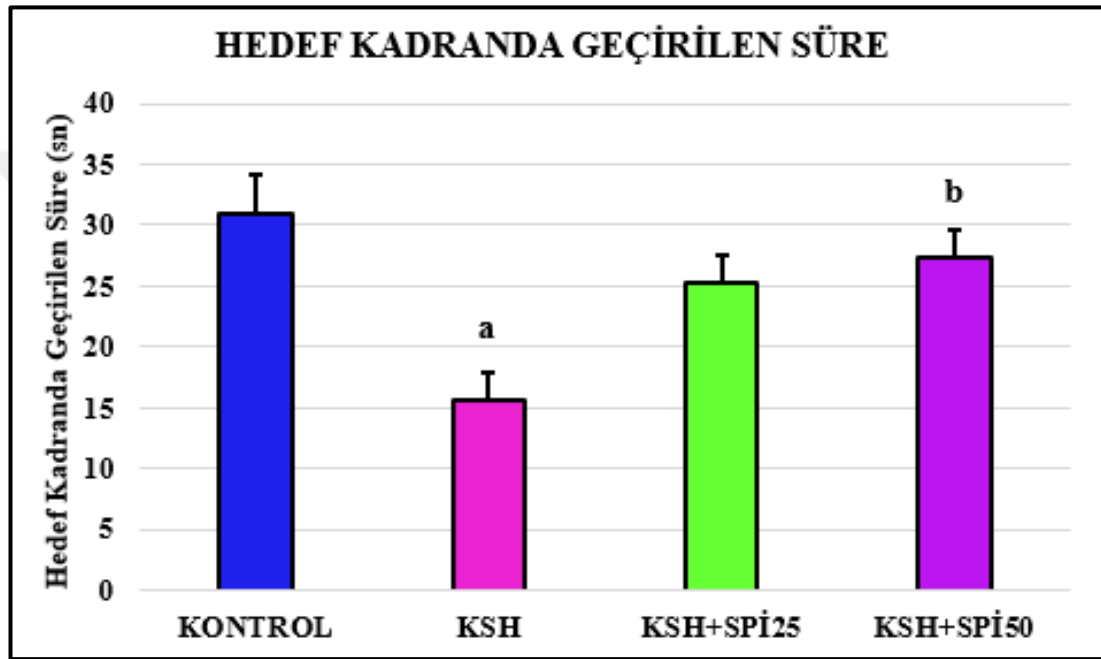
4.4.2. Probe trail sonuçları

Morris labirent testinin son gününde hayvanların hedef kadranda geçirdikleri süre gruplar arası karşılaştırıldığında anlamlı bir fark gözlemlendi ($p=0.004$) ve bu veriler tablo 9 ve şekil 31’de verilmiştir. Yapılan ikili karşılaştırmalarda ise hedef kadranda geçirdikleri süre KSH grubunda kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azaldı ($p=0.002$). KSH+SPİ50 grubunda KSH grubuna kıyasla hedef kadranda geçirilen süre anlamlı olarak arttığı görüldü ($p=0.040$).

Tablo 9: Gruplar arası hedef kadranda geçirilen sürenin karşılaştırmaları

	Kontrol	KSH	KSH+SPI25	KSH+SPI50	p
Hedef Kadranda Geçirilen Süre (sn)	31±3.06	15.57±2.36 ^a	25.18±2.32	27.33±2.20 ^b	0.004

Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. ^aKontrol grubuna, ^bKSH grubuna göre istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir, p<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 31: Gruplar arası hedef kadranda geçirilen süre karşılaştırmaları. Sonuçlar Ortalama ± Standart hata olarak gösterilmiştir. ^aKontrol grubuna, ^bKSH grubuna göre istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir, p<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.

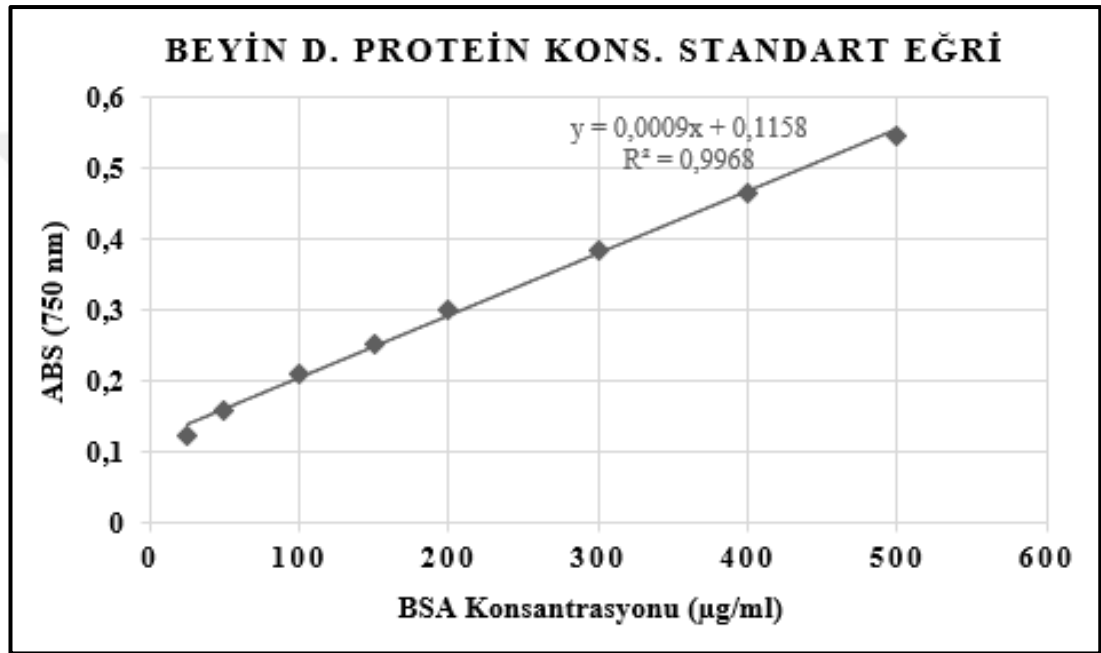
4.5. Oksidatif Stres Parametreleri Sonuçları

4.5.1. Beyin Dokusu Protein Miktar Tayini Standart Eğrisi

Beyin dokusu protein tayini için hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki BSA (25, 50, 100, 150, 200, 300, 400 ve 500 µg/ml) ve 750 nm’de okunan absorbans değerleri tablo 10’da verilmiştir ve elde edilen standart eğri şekil 32’de gösterilmiştir.

Tablo 10: BSA konsantrasyonları ve Absorbans değerleri

STD (µg/ml)	ABS (750 nm)
25	0.122
50	0.158
100	0.209
150	0.253
200	0.301
300	0.383
400	0.464
500	0.546



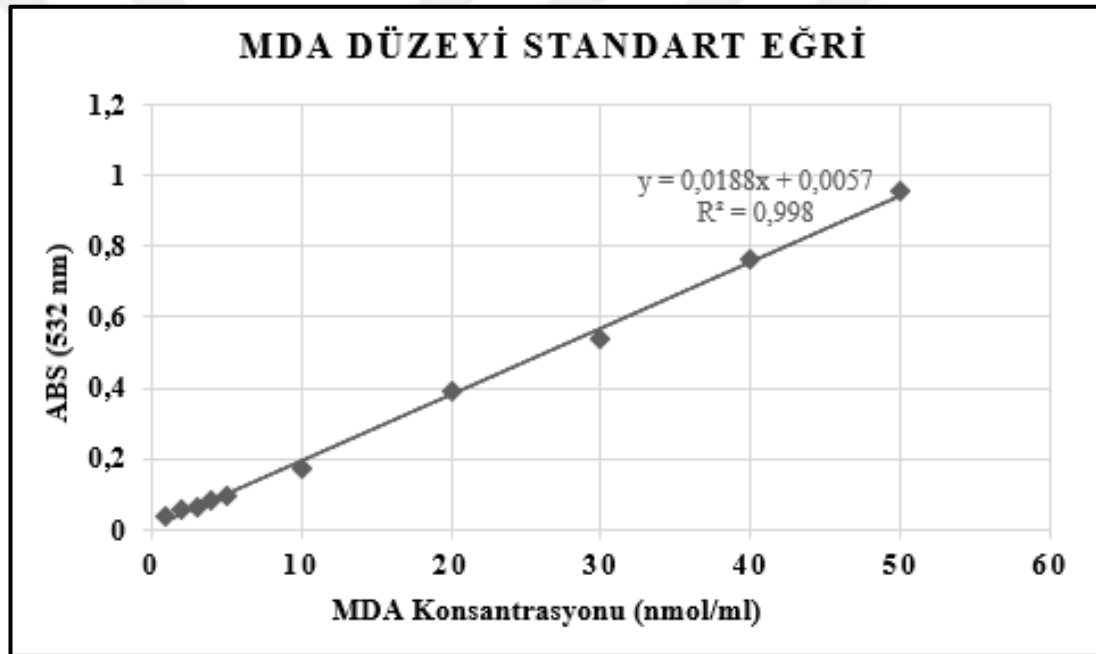
Şekil 32: Tüm hayvanların beyin dokusu protein miktar tayini için elde edilen standart eğri

4.5.2. Beyin MDA sonuçları

Beyin dokusu MDA seviyesi tayini için hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki TMP (1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 nmol/ml) içeren çözeltilerin 532 nm dalga boyundaki absorbans değerleri tablo 11’de ve bu değerlere göre elde edilen standart eğri şekil 33’te gösterilmiştir.

Tablo 11: MDA konsantrasyonları ve Absorbans değerleri

MDA (nmol/ml)	ABS (532 nm)
1	0.040
2	0.054
3	0.065
4	0.080
5	0.092
10	0.174
20	0.389
30	0.538
40	0.764
50	0.956



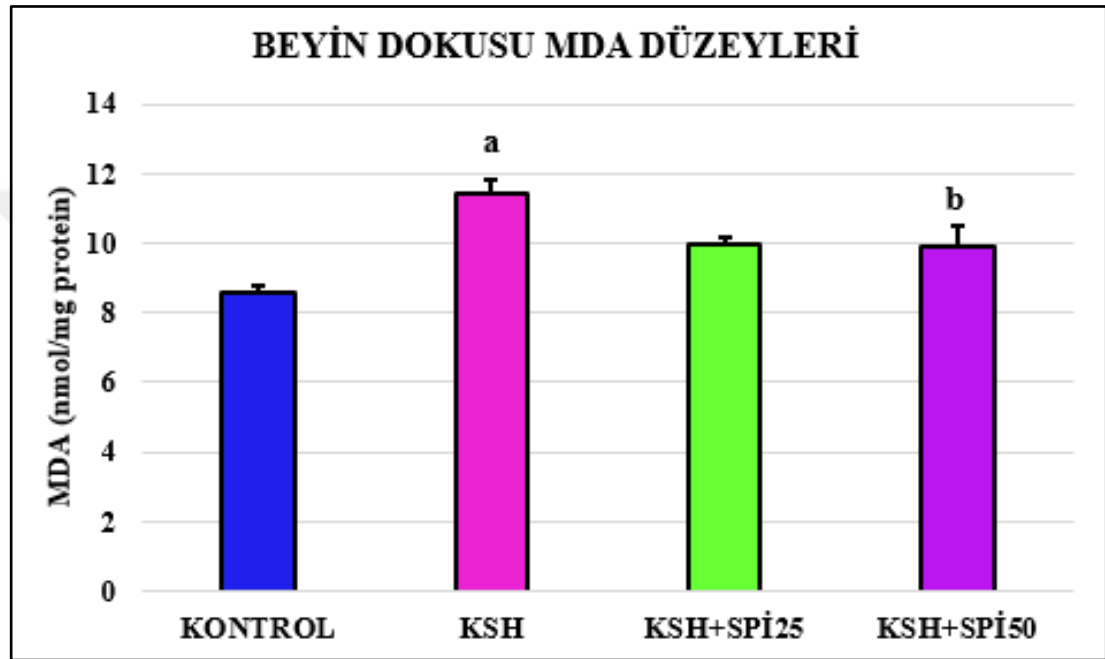
Şekil 33: MDA düzeylerinin tayini için elde edilen standart eğri.

Deney gruplarına ait beyin doku örneklerinden elde edilen MDA düzeyleri gruplar arası anlamlı farklılık görülmüştür ($p < 0.001$) ve bu veriler tablo 12 ve şekil 34’te verilmiştir. Yapılan ikili karşılaştırmalarda beyin dokusu MDA düzeyleri KSH grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde yüksek bulunurken ($p < 0.001$), KSH+SPİ50 grubunda KSH grubuna kıyasla MDA düzeyleri anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ($p = 0.039$).

Tablo 12: Beyin MDA düzeyleri gruplar arası karşılaştırmaları

	Kontrol	KSH	KSH+SPİ25	KSH+SPİ50	p
MDA Düzeyi (nmol/mg protein)	8.58±0.20	11.44±0.35 ^a	9.98±0.19	9.91±0.57 ^b	<0.001

Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. ^aKontrol grubuna, ^bKSH grubuna göre istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir, p<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 34: Gruplar arası beyin dokusu MDA düzeyi karşılaştırmaları. Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak gösterilmiştir. ^aKontrol grubuna, ^bKSH grubuna göre istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir, p<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.

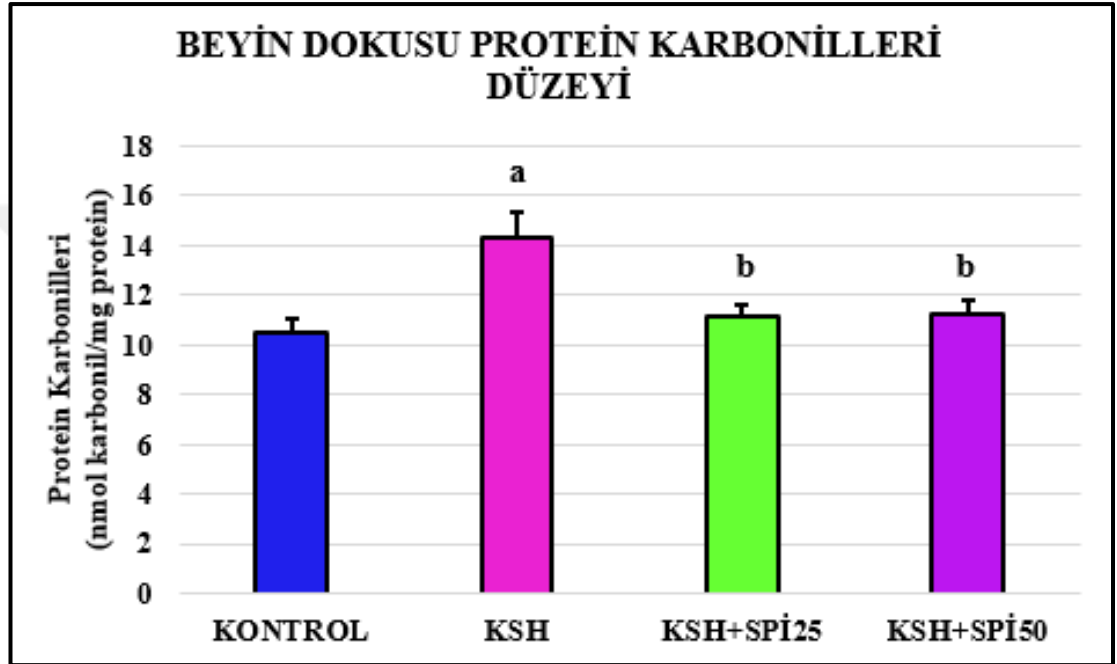
4.5.3. Beyin protein karbonilleri sonuçları

Deney gruplarına ait beyin doku örneklerinden elde edilen protein karbonil düzeyleri arasında gruplar arası anlamlı farklılık görülmüştür (p=0.004) ve bu veriler tablo 13 ve şekil 35'te verilmiştir. Yapılan ikili karşılaştırmalarda beyin dokusu protein karbonilleri düzeyi KSH grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde yüksek bulunurken (p=0.005) hem KSH+SPİ25 grubunda (p=0.027) hem de KSH+SPİ50 grubunda (p=0.037) KSH grubuna kıyasla protein karbonilleri düzeyi anlamlı olarak düşük bulunmuştur (p=0.039).

Tablo 13: Beyin protein karbonilleri düzeyi gruplar arası karşılaştırmaları

	Kontrol	KSH	KSH+SPİ25	KSH+SPİ50	p
Protein Karbonilleri Düzeyi (nmol karbonil/mg protein)	10.53±0.53	14.30±1.08 ^a	11.10±0.47 ^b	11.24±0.57 ^b	0.004

Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. ^aKontrol grubuna, ^bKSH grubuna göre istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir, p<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 35: Gruplar arası beyin dokusu protein karbonilleri düzeyi karşılaştırmaları. Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak gösterilmiştir. ^aKontrol grubuna, ^bKSH grubuna göre istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir, p<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.

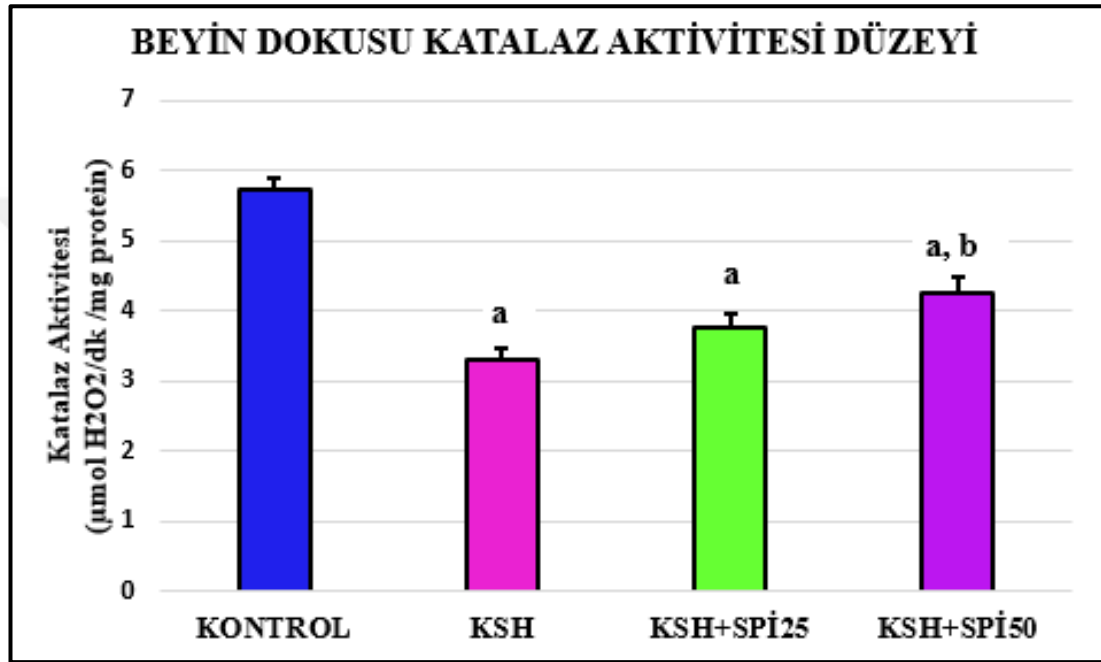
4.5.4. Beyin katalaz aktivitesi sonuçları

Deney gruplarına ait beyin doku örneklerinden elde edilen katalaz enzim aktivitesi düzeyleri arasında gruplar arası anlamlı farklılık görülmüştür (p<0.001) ve bu veriler tablo 14 ve şekil 36'da verilmiştir. Yapılan ikili karşılaştırmalarda beyin dokusu katalaz aktivitesi düzeyi KSH grubunda (p<0.001), KSH+SPİ25 grubunda (p<0.001) ve KSH+SPİ50 grubunda (p<0.001) kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur. KSH+SPİ50 grubunda KSH grubuna kıyasla katalaz aktivitesi düzeyi anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p=0.016).

Tablo 14: Beyin dokusu katalaz aktivitesi düzeyi gruplar arası karşılaştırmaları

	Kontrol	KSH	KSH+SPİ25	KSH+SPİ50	p
Katalaz Aktivitesi Düzeyi ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{dk}/\text{mg}$ protein)	5.71 $\pm$ 0.16	3.30 $\pm$ 0.15 ^a	3.76 $\pm$ 0.18 ^a	4.26 $\pm$ 0.22 ^{a, b}	<0.001

Değerler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. ^aKontrol grubuna, ^bKSH grubuna göre istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir, $p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 36: Gruplar arası beyin dokusu katalaz aktivitesi düzeyi karşılaştırmaları. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. ^aKontrol grubuna, ^bKSH grubuna göre istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir, $p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Yapılan korelasyon analizinde beyin dokusu katalaz aktivitesi düzeyi ve probe trail sonuçları arasında pozitif ($r=0.694$) ve anlamlı ($p<0.001$) korelasyon olduğu görüldü. Ayrıca beyin dokusu katalaz aktivitesi ve MDA düzeyleri ($r=-0.703$) ($p<0.001$) ile protein karbonilleri ($r=-0.582$) ($p=0.003$), 5. Gün platformu bulma süresi ($r=-0.420$) ($p=0.037$) arasında negatif korelasyon olduğu görüldü (Tablo 15).

Tablo 15: Beyin dokusu katalaz aktivitesi ve deneyle ilgili parametreler arasındaki korelasyon analizi

Beyin Dokusu Katalaz Aktivitesi Düzeyi		
	r	p
Morris Su Labirenti Testi 5. Gün Platformu Bulma Süresi	-0.420*	0.037
Probe Trail Testi/Hedef Kadrandaki Geçirilen Süre	0.694*	<0.001
Beyin Dokusu MDA Düzeyi	-0.703*	<0.001
Beyin Dokusu Protein Karbonilleri Düzeyi	-0.582*	0.003

* Anlamli farklılığı göstermektedir (p<0.05).

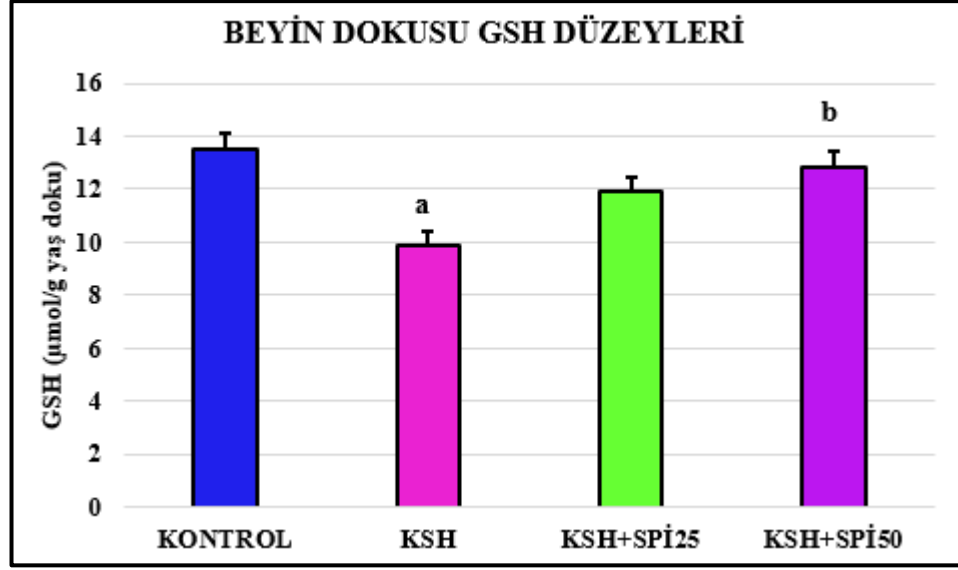
4.5.5. GSH sonuçları

Deney gruplarına ait beyin doku örneklerinden elde edilen GSH düzeyleri arasında gruplar arası anlamlı farklılık görülmüştür (p=0.002) ve bu veriler tablo 16 ve şekil 37’de verilmiştir. Yapılan ikili karşılaştırmalarda beyin GSH düzeyi KSH grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur (p=0.002). KSH+SPI50 grubunda KSH grubuna kıyasla GSH düzeyi anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p=0.016).

Tablo 16: Beyin dokusu GSH düzeyi gruplar arası karşılaştırmaları

	Kontrol	KSH	KSH+SPI25	KSH+SPI50	P
GSH Düzeyleri (µmol/g yaş doku)	13.50±0.65	9.88±0.56 ^a	11.93±0.48	12.81±0.64 ^b	0.002

Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. ^aKontrol grubuna, ^bKSH grubuna göre istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir, p<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 37: Gruplar arası beyin dokusu GSH düzeyi karşılaştırmaları. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. ^aKontrol grubuna, ^bKSH grubuna göre istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir, $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Yapılan korelasyon analizinde beyin dokusu GSH düzeyi ve probe trail testi hedef kadranda geçirilen süre ($r=0.399$) ($p=0.043$) ve beyin dokusu katalaz aktivitesi düzeyi ($r=0.508$) ($p=0.011$) pozitif ve anlamlı korelasyon olduğu görüldü. Ayrıca GSH düzeyi ve beyin dokusu MDA düzeyi arasında negatif ($r=-0.636$) ve anlamlı ($p=0.001$) korelasyon olduğu görüldü (Tablo 17).

Tablo 17: Beyin dokusu GSH düzeyi ve deney ile ilgili parametreler arasındaki korelasyon analizi

	Beyin Dokusu GSH Düzeyi	
	r	p
Probe Trail Testi/Hedef Kadranda Geçirilen Süre	0.399*	0.043
Beyin Dokusu MDA Düzeyi	-0.636*	0.001
Beyin Dokusu Katalaz Aktivitesi Düzeyi	0.508*	0.011

* Anlamlı farklılığı göstermektedir ($p < 0.05$).

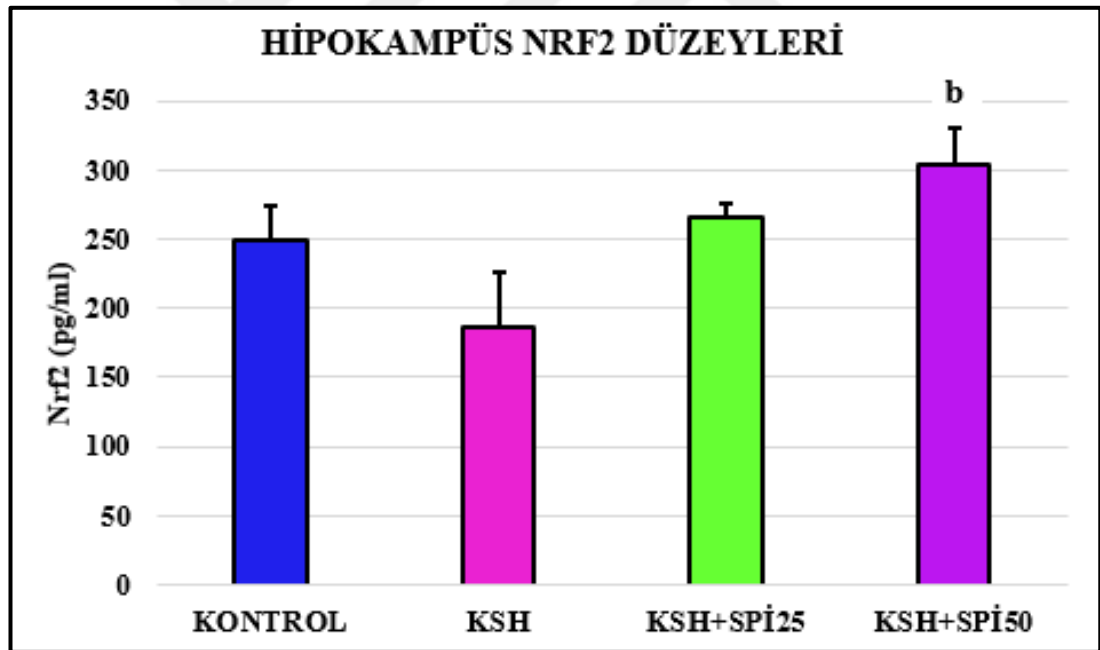
4.6. Hipokampus Nrf2 Sonuçları

Deney gruplarına ait hipokampus örneklerinden elde edilen Nrf2 düzeyleri arasında gruplar arası anlamlı farklılık görülmüştür ($p=0.042$) ve bu veriler tablo ve şekilde verilmiştir. Yapılan ikili karşılaştırmalarda hipokampus Nrf2 düzeyi KSH+SPİ50 grubunda KSH grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0.033$) (Tablo 18) (Şekil 38).

Tablo 18: Hipokampus Nrf2 düzeyi gruplar arası karşılaştırmaları

	Kontrol	KSH	KSH+SPİ25	KSH+SPİ50	p
Nrf2 Düzeyleri (pg/ml)	248.88±25.48	185.91±39.43	265.49±10.54	304.61±25.93 ^b	0.042

Değerler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. ^bKSH grubuna göre istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir, $p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 38: Gruplar arası hipokampus Nrf2 düzeyi karşılaştırmaları. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. ^bKSH grubuna göre istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir, $p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

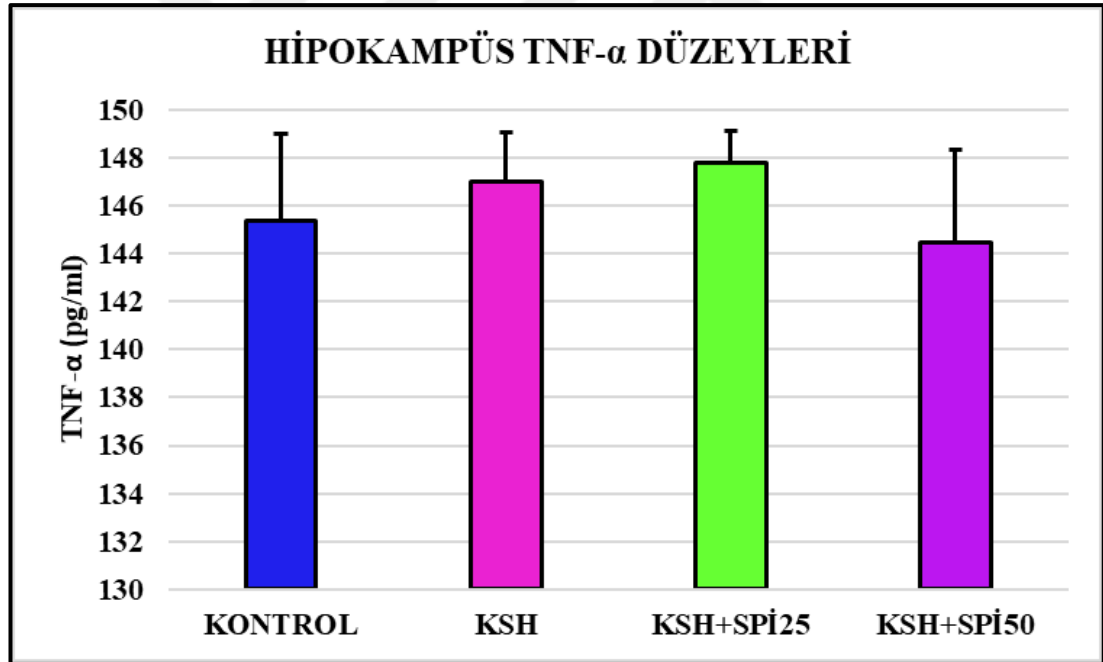
4.7. Hipokampus TNF- α Sonuçları

Deney gruplarına ait hipokampus örneklerinden elde edilen TNF- α düzeyleri arasında hem gruplar arası karşılaştırmada ($p=0.866$) hem de yapılan ikili karşılaştırmalarda anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$) ve bu veriler tablo 19 ve şekil 39’da verilmiştir.

Tablo 19: Hipokampus TNF- α düzeyi gruplar arası karşılaştırmaları

	Kontrol	KSH	KSH+SPİ25	KSH+SPİ50	p
TNF- α Düzeyleri (pg/ml)	145.40 $\pm$ 3.61	146.98 $\pm$ 2.05	147.80 $\pm$ 1.30	144.45 $\pm$ 3.91	0.866

Değerler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. Gruplar arasında anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0.05$).



Şekil 39: Gruplar arası hipokampus TNF- α düzeyi karşılaştırmaları. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. Gruplar arasında anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0.05$).

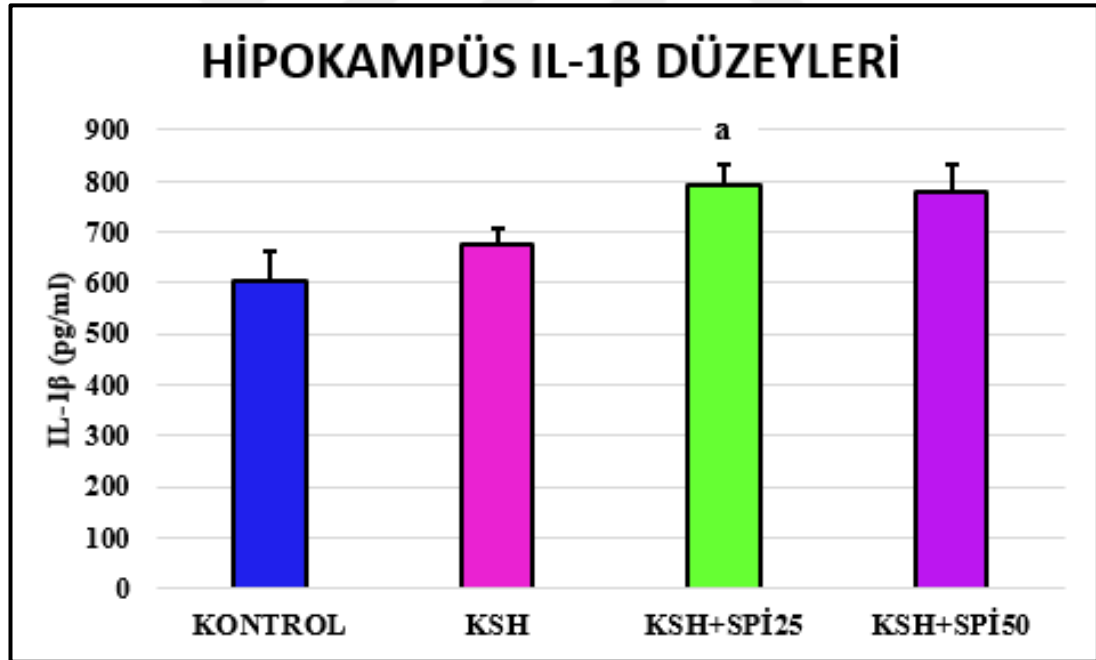
4.8. Hipokampus IL-1 β Sonuçları

Deney gruplarına ait hipokampus örneklerinden elde edilen IL-1 β düzeyleri arasında gruplar arası anlamlı farklılık görülmüştür ($p=0.025$) ve bu veriler tablo 20 ve şekil 40'ta verilmiştir. Yapılan ikili karşılaştırmalarda hipokampus IL-1 β düzeyi KSH+SPİ25 grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0.042$).

Tablo 20: Hipokampus IL-1 β düzeyi gruplar arası karşılaştırmaları

	Kontrol	KSH	KSH+SPİ25	KSH+SPİ50	p
IL-1β					
Düzeyleri	605.39 $\pm$ 57.32	676.74 $\pm$ 28.76	794 $\pm$ 38.32 ^a	778.35 $\pm$ 53.26	0.025
(pg/ml)					

Değerler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. ^aKontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir, $p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 40: Gruplar arası hipokampus IL-1 β düzeyi karşılaştırmaları. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. ^aKontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir, $p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

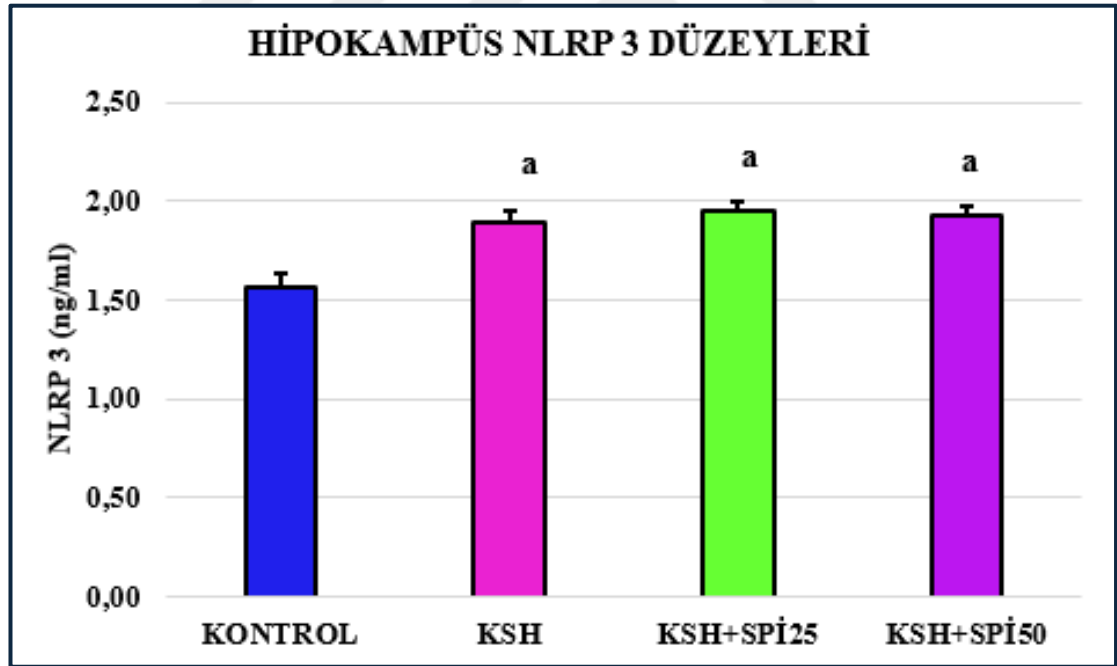
4.9. Hipokampus NLRP 3 Sonuçları

Deney gruplarına ait hipokampus örneklerinden elde edilen NLRP3 düzeyleri arasında gruplar arası anlamlı farklılık görülmüştür ($p<0.001$) ve bu veriler tablo 21 ve şekil 41’de verilmiştir. Yapılan ikili karşılaştırmalarda hipokampus NLRP3 düzeyi KSH grubunda ($p=0.010$), KSH+SPİ25 grubunda ($p=0.001$) ve KSH+SPİ50 grubunda ($p=0.002$) kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

Tablo 21: Hipokampus NLRP 3 düzeyi gruplar arası karşılaştırmaları

	Kontrol	KSH	KSH+SPİ25	KSH+SPİ50	p
NLRP 3 Düzeyleri (ng/ml)	1.57±0.06	1.89±0.06 ^a	1.95±0.05 ^a	1.92±0.05 ^a	<0.001

Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. ^aKontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir, $p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 41: Gruplar arası hipokampus NLRP 3 düzeyi karşılaştırmaları. Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak gösterilmiştir. ^aKontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir, $p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Yapılan korelasyon analizinde hipokampus NLRP3 düzeyi ve beyin MDA düzeyi arasında pozitif ($r=0.509$) ve anlamlı ($p=0.018$) korelasyon olduğu görüldü. Ayrıca hipokampus NLRP3 düzeyi ile beyin katalaz aktivitesi düzeyi arasında negatif ($r=-0.516$) ve anlamlı ($p=0.010$) korelasyon olduğu görüldü (Tablo 22).

Tablo 22: Hipokampus NLRP3 düzeyi ve deney ile ilgili parametreler arasındaki korelasyon analizi

Hipokampus NLRP3 Düzeyi		
	r	p
Beyin Dokusu MDA Düzeyi	0.509*	0.018
Beyin Dokusu Katalaz Aktivitesi Düzeyi	-0.516*	0.010

* Anlamlı farklılığı göstermektedir ($p<0.05$).

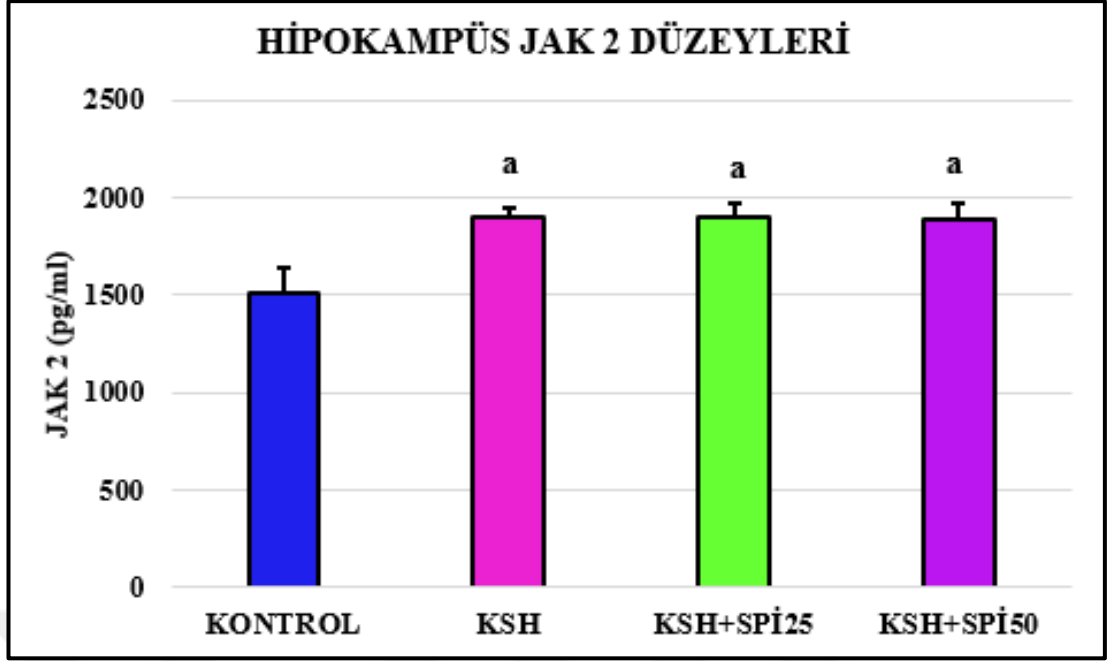
4.10. Hipokampus JAK 2 Sonuçları

Deney gruplarına ait hipokampus örneklerinden elde edilen JAK 2 düzeyleri arasında gruplar arası anlamlı farklılık görülmüştür ($p=0.011$) ve bu veriler tablo 23 ve şekil 42’de verilmiştir. Yapılan ikili karşılaştırmalarda hipokampus JAK 2 düzeyi KSH grubunda ($p=0.036$), KSH+SPİ25 grubunda ($p=0.031$) ve KSH+SPİ50 grubunda ($p=0.049$) kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

Tablo 23: Hipokampus JAK 2 düzeyi gruplar arası karşılaştırmaları

	Kontrol	KSH	KSH+SPİ25	KSH+SPİ50	P
JAK 2					
Düzeyleri	1507.05±128.91	1901.44±45.72 ^a	1893.47±44.59 ^a	1883.42±82.53 ^a	0.011
(pg/ml)					

Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. ^aKontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir, $p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 42: Gruplar arası hipokampus JAK 2 düzeyi karşılaştırmaları. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. ^aKontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir, $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Yapılan korelasyon analizinde hipokampus JAK2 düzeyi ve beyin MDA düzeyi ($r=0.504$) ($p=0.017$), hipokampus IL-1 β düzeyi ($r=0.670$) ($p<0.001$), hipokampus NLRP3 düzeyi ($r=0.537$) ($p=0.007$) arasında pozitif ve anlamlı korelasyon olduğu görüldü. Ayrıca hipokampus JAK2 düzeyi ile beyin dokusu katalaz aktivitesi düzeyi arasında negatif ($r=-0.421$) ve anlamlı ($p=0.041$) korelasyon olduğu görüldü (Tablo 24).

Tablo 24: Hipokampus JAK2 düzeyi ve deney ile ilgili parametreler arasındaki korelasyon analizi

Hipokampus JAK2 Düzeyi		
	r	p
Beyin Dokusu MDA Düzeyi	0.504*	0.017
Beyin Dokusu Katalaz Aktivitesi Düzeyi	-0.421*	0.041
Hipokampus IL-1 β düzeyi	0.670*	<0.001
Hipokampus NLRP3 Düzeyi	0.537*	0.007

* Anlamlı farklılığı göstermektedir ($p < 0.05$).

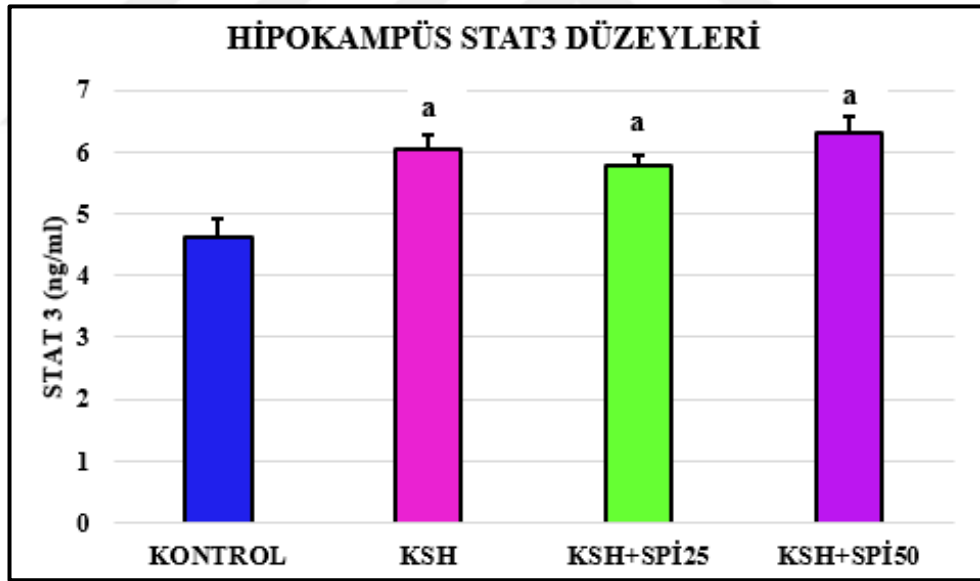
4.11. Hipokampus STAT3 Sonuçları

Deney gruplarına ait hipokampus örneklerinden elde edilen STAT3 düzeyleri arasında gruplar arası anlamlı farklılık görülmüştür ($p=0.001$) ve bu veriler tablo 25 ve şekil 43'te verilmiştir. Yapılan ikili karşılaştırmalarda hipokampus STAT3 düzeyi KSH grubunda ($p=0.005$), KSH+SPİ25 grubunda ($p=0.017$) ve KSH+SPİ50 grubunda ($p<0.001$) kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

Tablo 25: Hipokampus STAT3 düzeyi gruplar arası karşılaştırmaları

	Kontrol	KSH	KSH+SPİ25	KSH+SPİ50	P
STAT3 Düzeyleri (ng/ml)	4.63±0.30	6.03±0.23 ^a	5.79±0.16 ^a	6.32±0.26 ^a	0.001

Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. ^aKontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir, $p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 43: Gruplar arası hipokampus STAT3 düzeyi karşılaştırmaları. Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak gösterilmiştir. ^aKontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir, $p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Yapılan korelasyon analizinde hipokampus STAT3 düzeyi ve beyin dokusu protein karbonilleri düzeyi ($r=0.467$) ($p=0.021$), hipokampus IL-1 β düzeyi ($r=0.742$) ($p<0.001$), NLRP3 düzeyi ($r=0.635$) ($p=0.001$), JAK2 düzeyi ($r=0.800$) ($p<0.001$)

arasında pozitif ve anlamlı korelasyon görüldü. Ayrıca hipokampus STAT3 düzeyi ile beyin dokusu katalaz aktivitesi düzeyi arasında negatif ($r=-0.474$) ve anlamlı ($p=0.019$) korelasyon olduğu görüldü (Tablo 26).

Tablo 26: Hipokampus STAT3 düzeyi ve deney ile ilgili parametreler arasındaki korelasyon analizi

Hipokampus STAT3 Düzeyi		
	r	p
Beyin Dokusu Protein Karbonilleri Düzeyi	0.467*	0.021
Beyin Dokusu Katalaz Aktivitesi Düzeyi	-0.474*	0.019
Hipokampus IL-1 β düzeyi	0.742*	<0.001
Hipokampus NLRP3 Düzeyi	0.635*	0.001
Hipokampus JAK2 Düzeyi	800*	<0.001

* Anlamlı farklılığı göstermektedir ($p<0.05$).

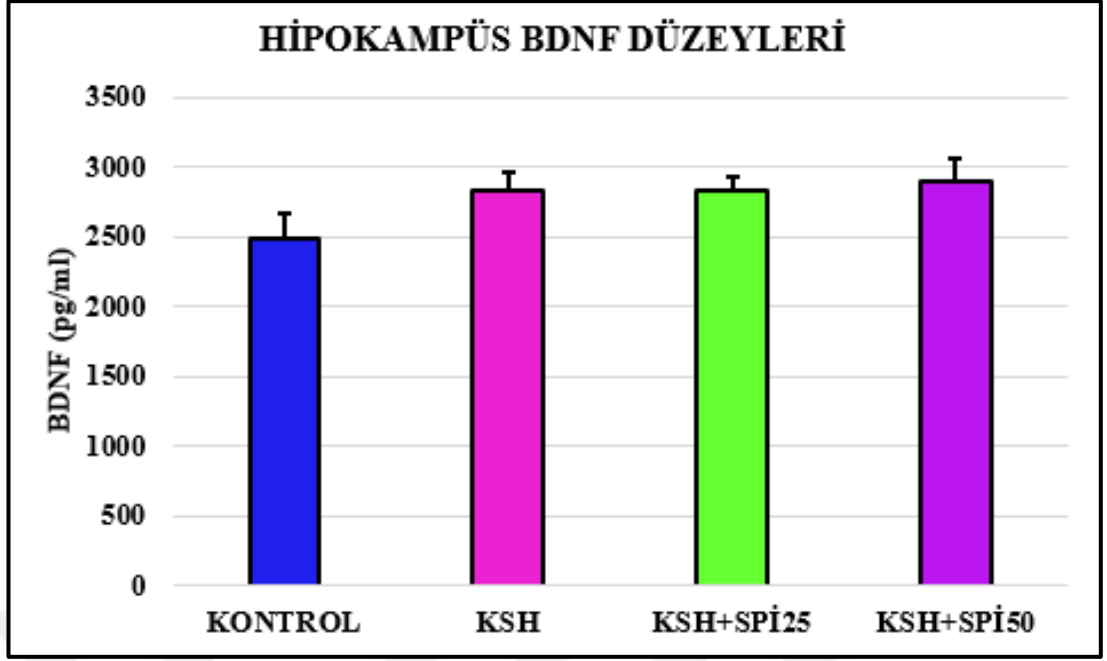
4.12. Hipokampus BDNF Sonuçları

Deney gruplarına ait hipokampus örneklerinden elde edilen BDNF düzeyleri arasında gruplar arası anlamlı farklılık görülmemiştir ($p=0.229$) ve bu veriler tablo 27 ve şekil 44’te verilmiştir.

Tablo 27: Hipokampus BDNF düzeyi gruplar arası karşılaştırmaları

	Kontrol	KSH	KSH+SPİ25	KSH+SPİ50	p
BDNF					
Düzeyleri	2486.41 $\pm$ 183.62	2833.33 $\pm$ 132.03	2827.15 $\pm$ 105.55	2890.12 $\pm$ 161.37	0.229
(pg/ml)					

Değerler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. Gruplar arasında anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0.05$).



Şekil 44: Gruplar arası hipokampus BDNF düzeyi karşılaştırmaları. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir ($p>0.05$).

Yapılan korelasyon analizinde hipokampus BDNF ve Nrf2 düzeyleri arasında pozitif ($r=0.502$) ve anlamlı ($p=0.011$) korelasyon görüldü (Tablo 28).

Tablo 28: Hipokampus BDNF ve Nrf2 düzeyleri korelasyon analizi

Hipokampus BDNF Düzeyi		
	r	p
Hipokampus Nrf2 Düzeyi	0.502*	0.011

* Anlamlı farklılığı göstermektedir ($p<0.05$).

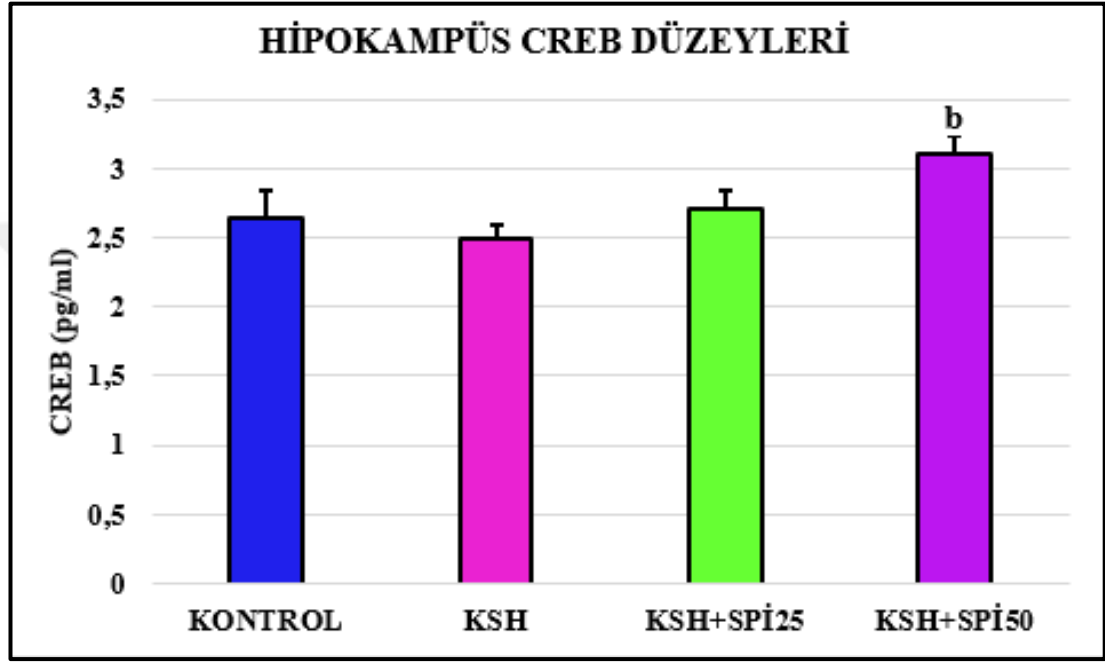
4.13. Hipokampus CREB Sonuçları

Deney gruplarına ait hipokampus örneklerinden elde edilen CREB düzeyleri arasında gruplar arası anlamlı farklılık görülmüştür ($p=0.035$) ve bu veriler tablo 29 ve şekil 45'te verilmiştir. Yapılan ikili karşılaştırmalarda hipokampus CREB düzeyi KSH+SPİ50 grubunda KSH grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0.042$).

Tablo 29: Hipokampus CREB düzeyi gruplar arası karşılaştırmaları

	Kontrol	KSH	KSH+SPİ25	KSH+SPİ50	p
CREB					
Düzeyleri	2.63±0.19	2.48±0.09	2.70±0.13	3.11±0.12 ^b	0.035
(pg/ml)					

Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. ^bKSH grubuna göre istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir, p<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 45: Gruplar arası hipokampus CREB düzeyi karşılaştırmaları. Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak gösterilmiştir. ^bKSH grubuna göre istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir, p<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.

Yapılan korelasyon analizinde hipokampus CREB düzeyi ve probe trail testi hedef kadranda geçirilen süre ($r=0.432$) ($p=0.014$), beyin dokusu GSH düzeyi ($r=0.546$) ($p=0.004$), hipokampus BDNF düzeyi ($r=0.414$) ($p=0.032$) arasında pozitif ve anlamlı korelasyon görüldü (Tablo 30).

Tablo 30: Hipokampus CREB düzeyi ve deney ile ilgili parametreler arasındaki korelasyon analizi

Hipokampus CREB Düzeyi				
		r	p	
Probe Trail Testi Hedef	Kadrandaki Geçirilen Süre	0.432*	0.014	
Beyin Dokusu GSH Düzeyi		0.546*	0.004	
Hipokampus BDNF düzeyi		0.414*	0.032	

* Anlamlı farklılığı göstermektedir ($p<0.05$).

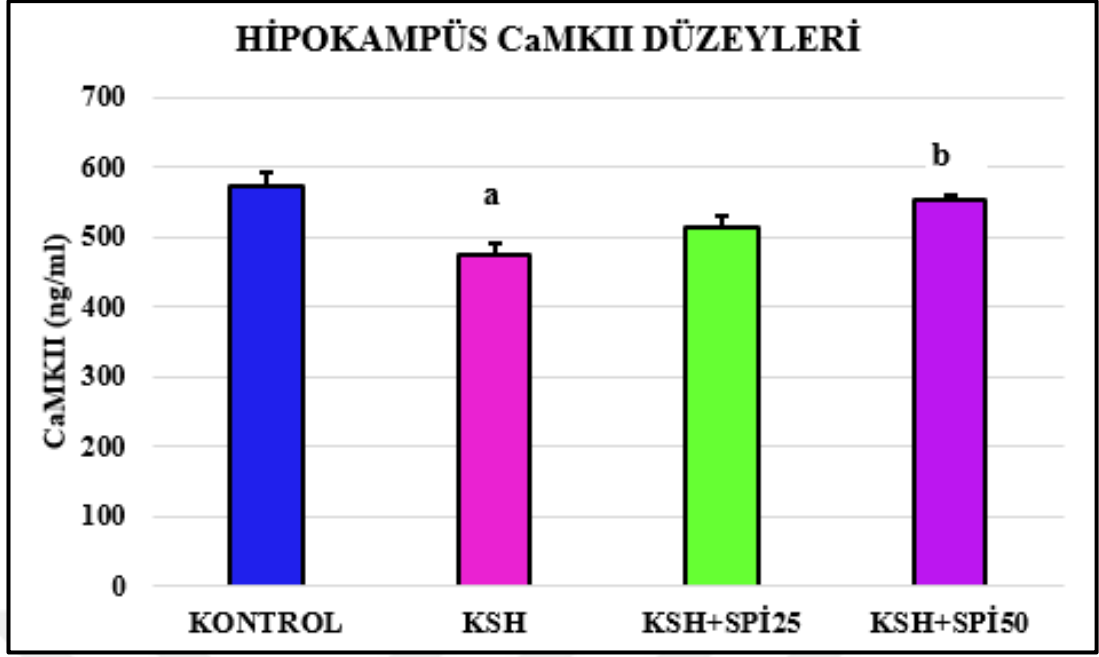
4.14. Hipokampus CaMKII Sonuçları

Deney gruplarına ait hipokampus örneklerinden elde edilen CaMKII düzeyleri arasında gruplar arası anlamlı farklılık görülmüştür ($p=0.004$) ve bu veriler tablo 31 ve şekil 46’da verilmiştir. Yapılan ikili karşılaştırmalarda hipokampus CaMKII düzeyi KSH grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p=0.006$). KSH+SPI50 grubunda KSH grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0.026$).

Tablo 31: Hipokampus CaMKII düzeyi gruplar arası karşılaştırmaları

	Kontrol	KSH	KSH+SPI25	KSH+SPI50	p
CaMKII					
Düzeyleri	571.05±20.88	473.88±15.66 ^a	514.45±16.30	552.04±8.26 ^b	0.004
(ng/ml)					

Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. ^aKontrol grubuna, ^bKSH grubuna göre istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir, $p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 46: Gruplar arası hipokampus CaMKII düzeyi karşılaştırmaları. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. ^aKontrol grubuna, ^bKSH grubuna göre istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir, $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Yapılan korelasyon analizinde hipokampus CaMKII düzeyi ve probe trail testi hedef kadranda geçirilen süre ($r=0.612$) ($p=0.002$), beyin dokusu katalaz aktivitesi düzeyi ($r=0.557$) ($p=0.011$), hipokampus Nrf2 düzeyi ($r=0.479$) ($p<0.028$), CREB düzeyi ($r=0.646$) ($p=0.001$) arasında pozitif ve anlamlı korelasyon görüldü. Ayrıca hipokampus CaMKII düzeyi ile morris su labirenti testi 5. gün platformu bulma süresi ($r=-0.576$) ($p=0.005$), beyin dokusu MDA düzeyi ($r=-0.698$) ($p=0.001$) arasında negatif ve anlamlı korelasyon olduğu görüldü (Tablo 32).

Tablo 32: Hipokampus CaMKII düzeyi ve deney ile ilgili parametreler arasındaki korelasyon analizi

Hipokampus CaMKII Düzeyi		
	r	p
Morris Su Labirenti 5. Gün Platformu Bulma Süresi	-576*	0.005
Probe Trail Testi Hedef Kadrandaki Geçirilen Süre	612*	0.002
Beyin Dokusu MDA Düzeyi	-698*	0.001
Beyin Dokusu Katalaz Aktivitesi Düzeyi	557*	0.011
Hipokampus Nrf2 Düzeyi	479*	0.028
Hipokampus CREB Düzeyi	646*	0.001

* Anlamlı farklılığı göstermektedir (p<0.05).

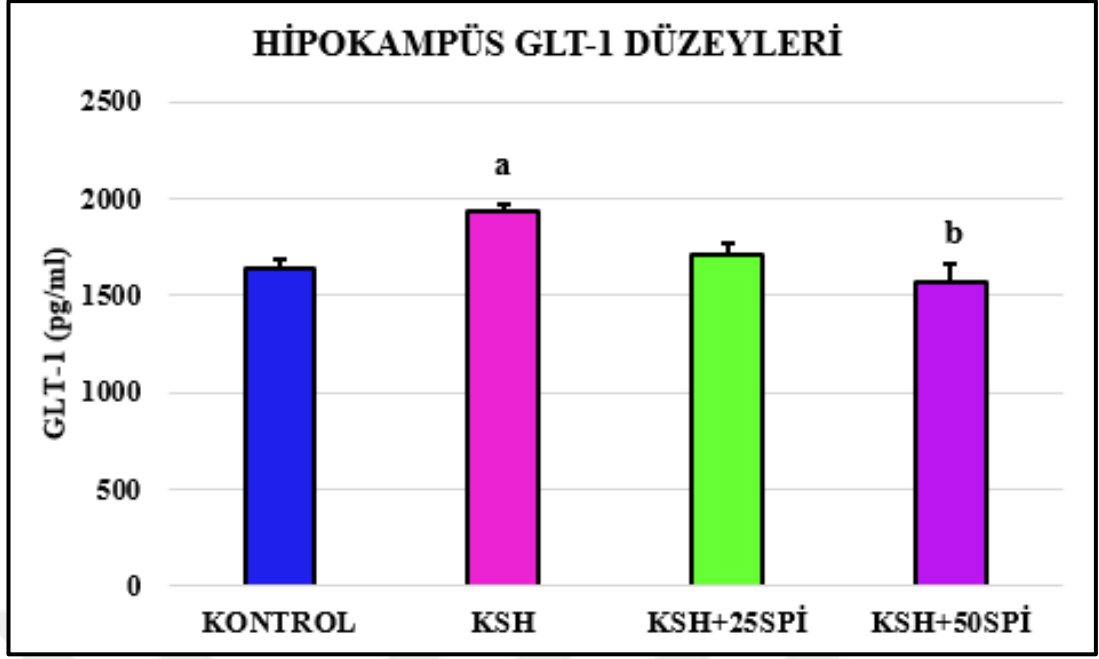
4.15. Hipokampus GLT-1 Sonuçları

Deney gruplarına ait hipokampus örneklerinden elde edilen GLT-1 düzeyleri arasında gruplar arası anlamlı farklılık görülmüştür (p=0.001) ve bu veriler tablo 33 ve şekil 47’de verilmiştir. Yapılan ikili karşılaştırmalarda hipokampus GLT-1 düzeyi KSH grubunda hem kontrol grubuna (p=0.005) hem de KSH+SPI50 grubuna (p=0.001) göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

Tablo 33: Hipokampus GLT-1 düzeyi gruplar arası karşılaştırmaları

	Kontrol	KSH	KSH+SPI25	KSH+SPI50	p
GLT-1					
Düzeyleri (pg/ml)	1634.51±49.33	1936.33±31.15 ^a	1712.42±60.54	1568.13±91.79 ^b	0.001

Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. ^aKontrol grubuna, ^bKSH grubuna göre istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir, p<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 47: Gruplar arası hipokampus GLT-1 düzeyi karşılaştırmaları. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. ^aKontrol grubuna, ^bKSH grubuna göre istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir, $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Yapılan korelasyon analizinde hipokampus GLT-1 düzeyi ve probe trail testi hedef kadranda geçirilen süre ($r = -0.387$) ($p = 0.026$), beyin dokusu katalaz aktivitesi düzeyi ($r = -0.446$) ($p = 0.025$), beyin dokusu GSH düzeyi ($r = -0.579$) ($p = 0.002$) arasında negatif ve anlamlı korelasyon görüldü. Ayrıca hipokampus GLT-1 düzeyi ile beyin dokusu MDA düzeyi arasında pozitif ($r = 0.499$) ve anlamlı ($p = 0.002$) korelasyon olduğu görüldü (Tablo 34).

Tablo 34: Hipokampus GLT-1 düzeyi ve deney ile ilgili parametreler arasındaki korelasyon analizi

Hipokampus GLT-1 Düzeyi		
	r	p
Probe Trail Testi Hedef Kadranda Geçirilen Süre	-0.387	0.026
Beyin Dokusu MDA Düzeyi	0.499	0.015
Beyin Dokusu Katalaz Aktivitesi Düzeyi	-0.446	0.025
Beyin Dokusu GSH Düzeyi	-0.579	0.002

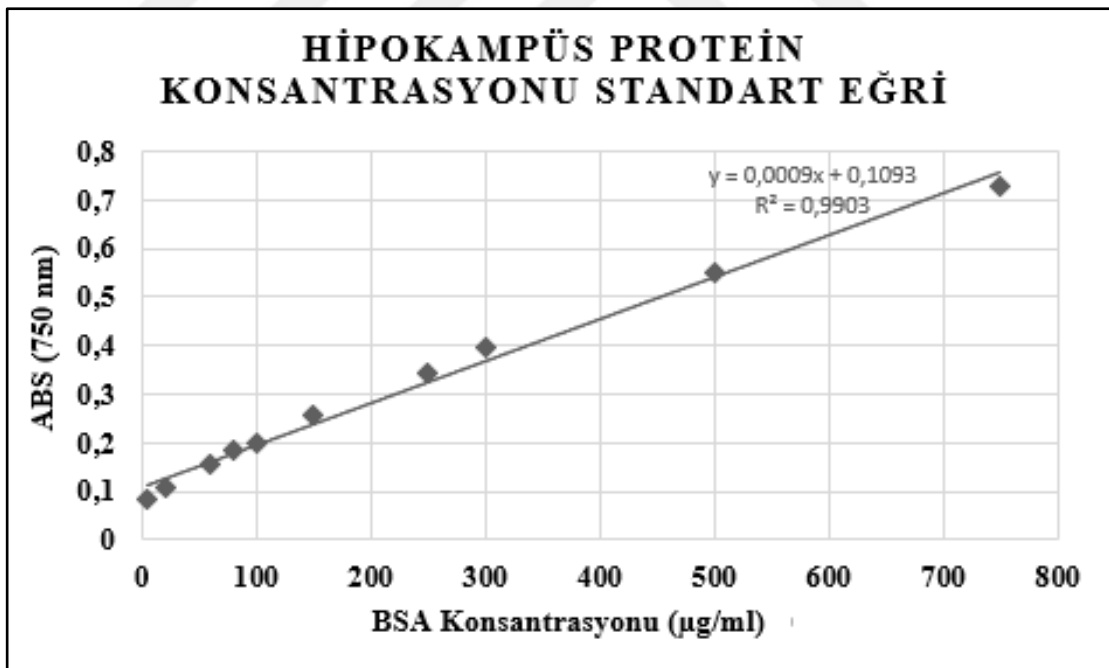
* Anlamlı farklılığı göstermektedir ($p < 0.05$).

4.16. Hipokampus AChE Aktivitesi Sonuçları

Hipokampus protein tayini için hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki BSA (5, 20, 60, 80, 100, 150, 250, 300, 500 µg/ml) ve 750 nm’de okunan absorbens değerleri tablo 35’te verilmiştir ve elde edilen standart eğri şekil 48’de gösterilmiştir.

Tablo 35: BSA konsantrasyonları ve Absorbans değerleri

STD (µg/ml)	ABS (750 nm)
5	0.084
20	0.106
60	0.155
80	0.183
100	0.199
150	0.256
250	0.345
300	0.398
500	0.549
750	0.729



Şekil 48: Tüm hayvanların hipokampus protein miktar tayini için elde edilen standart eğri

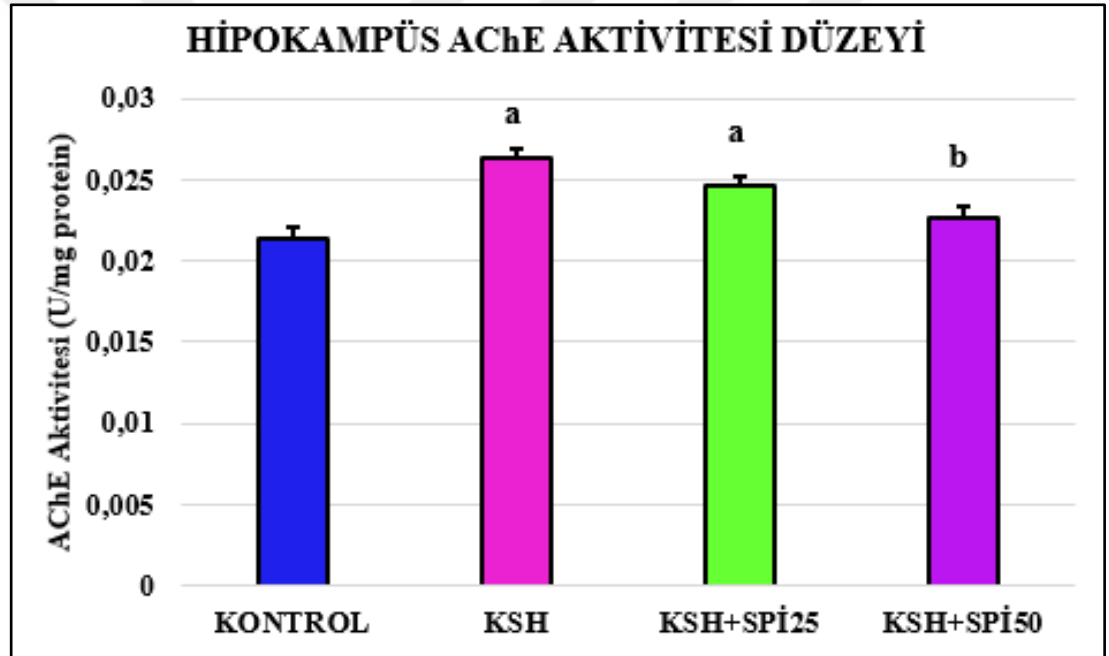
Deney gruplarına ait hipokampus örneklerinden elde edilen AChE aktivitesi düzeyleri arasında gruplar arası anlamlı farklılık görülmüştür ($p < 0.001$) ve bu veriler tablo 36 ve şekil 49’da verilmiştir. Yapılan ikili karşılaştırmalarda hipokampus AChE

aktivitesi düzeyi KSH grubunda ($p<0.001$), KSH+SPİ25 grubunda ($p=0.003$) kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. KSH+SPİ50 grubunda ise KSH grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p=0.001$).

Tablo 36: Hipokampus AChE aktivitesi düzeyi gruplar arası karşılaştırmaları

	Kontrol	KSH	KSH+SPİ25	KSH+SPİ50	p
AChE Aktivitesi Düzeyleri (U/mg protein)	0.021±0.0006	0.026±0.0004 ^a	0.024±0.0005 ^a	0.022±0.0006 ^b	<0.001

Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. ^aKontrol grubuna, ^bKSH grubuna göre istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir, $p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 49: Gruplar arası hipokampus AChE düzeyi karşılaştırmaları. Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak gösterilmiştir. ^aKontrol grubuna, ^bKSH grubuna göre istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir, $p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Yapılan korelasyon analizinde hipokampus AChE aktivitesi düzeyi ve beyin dokusu MDA düzeyi ($r=0.638$) ($p=0.001$), beyin dokusu protein karbonilleri düzeyi ($r=0.591$) ($p=0.002$), hipokampus NLRP3 düzeyi ($r=0.426$) ($p=0.034$), hipokampus GLT-1 düzeyi ($r=0.570$) ($p=0.002$) arasında anlamlı pozitif korelasyon görüldü. Ayrıca hipokampus AChE aktivitesi düzeyi ile beyin dokusu katalaz aktivitesi düzeyi ($r=-0.700$)

(<0.001), beyin dokusu GSH düzeyi ($r=-0.678$) ($p<0.001$), hipokampus CaMKII düzeyi ($r=-0.608$) ($p=0.003$) arasında negatif ve anlamlı korelasyon görüldü (Tablo 37).

Tablo 37: Hipokampus AChE aktivitesi düzeyi ve deney ile ilgili diğer parametreler arasındaki korelasyon analizi

Hipokampus AChE Aktivitesi Düzeyi		
	r	p
Beyin Dokusu MDA Düzeyi	0.638*	0.001
Beyin Dokusu Protein Karbonilleri Düzeyi	0.591*	0.002
Beyin Dokusu Katalaz Aktivitesi Düzeyi	-0.700*	<0.001
Beyin Dokusu GSH Düzeyi	-0.678*	<0.001
Hipokampus NLRP3 Düzeyi	0.426*	0.034
Hipokampus CaMKII Düzeyi	-0.608*	0.003
Hipokampus GLT-1 Düzeyi	0.570*	0.002

* Anlamlı farklılığı göstermektedir ($p<0.05$).

4.17. Histopatolojik Sonuçlar

4.17.1. Hipokampal CA1 ve CA3 Bölgelerindeki Sağlam Nöron Sayılarının Sonuçları

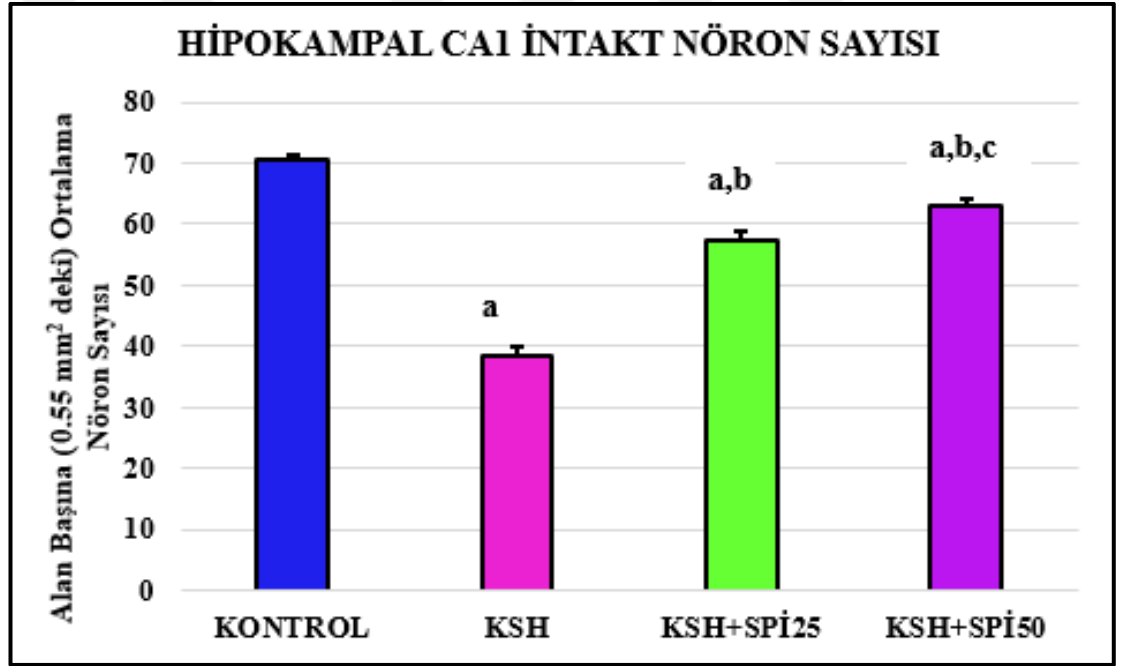
Hipokampal hasar, histopatolojik olarak her çalışma grubunun her iki hemisferi için hipokampal bölümlerdeki CA1 ve CA3 alt bölgelerindeki stratum piramidaldeki sağlam nöronların sayısı sayılarak ortalama nöron sayısı hesaplandı. Deney gruplarına ait hipokampal CA1 ($p<0.001$) ve CA3 ($p<0.001$) bölgesindeki intakt nöron sayılarında gruplar arası anlamlı farklılık görülmüştür ve bu veriler tablo 38 ve şekil 50, şekil 51’de verilmiştir. CA1 bölgesindeki intakt nöron sayısında yapılan ikili karşılaştırmalarda KSH grubunda ($p<0.001$), KSH+SPİ25 grubunda ($p<0.001$) ve KSH+SPİ50 grubunda ($p=0.001$) kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük bulunmuştur. KSH+SPİ25 grubunda ($p<0.001$) ve KSH+SPİ50 grubunda ($p<0.001$) KSH grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0.001$). Ayrıca KSH+SPİ50 grubunda KSH+SPİ25 grubuna kıyasla intakt nöron sayısında anlamlı artış bulunmuştur ($p=0.025$). Benzer şekilde CA3 bölgesindeki intakt nöron sayısında yapılan ikili karşılaştırmalarda KSH grubunda ($p<0.001$), KSH+SPİ25 grubunda ($p<0.001$) kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük bulunmuştur. KSH+SPİ50

grubunda ise KSH grubuna ($p=0.001$) KSH+SPİ25 grubuna ($p=0.004$) kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

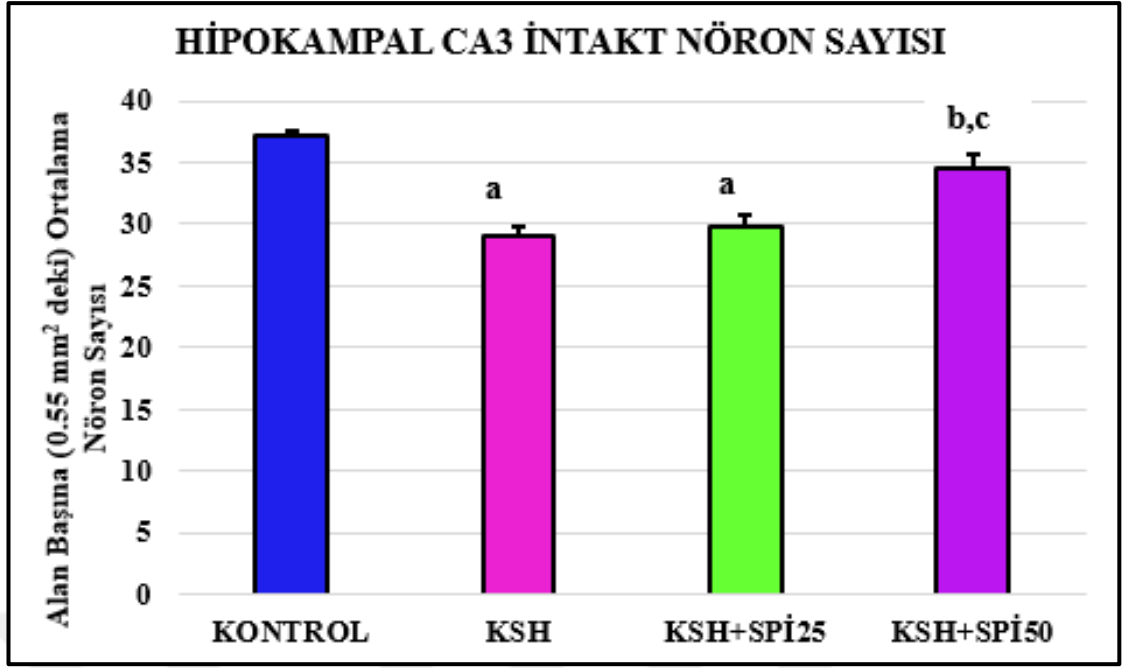
Tablo 38: Hipokampal CA1 ve CA3 bölgelerindeki sağlam nöron sayılarının gruplar arası karşılaştırmaları

	Kontrol	KSH	KSH+SPİ25	KSH+SPİ50	p
CA1 Bölgesi İntakt Nöron Sayısı	70.5±0.90	38.5±1.56 ^a	57.5±1.37 ^{a, b}	63±1.01 ^{a, b, c}	<0.001
CA3 Bölgesi İntakt Nöron Sayısı	37.12±0.51	29±0.77 ^a	29.87±0.95 ^a	34.62±1.11 ^{b, c}	<0.001

Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. ^aKontrol grubuna, ^bKSH grubuna, ^cKSH+SPİ25 grubuna göre istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir, $p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 50: Gruplar arası hipokampal CA1 bölgesi alan başına sağlam hücre sayısının karşılaştırmaları. Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak gösterilmiştir. ^aKontrol grubuna, ^bKSH grubuna, ^cKSH+SPİ25 grubuna göre istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir, $p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 51: Gruplar arası hipokampal CA3 bölgesi alan başına sağlam hücre sayısının karşılaştırmaları. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. ^aKontrol grubuna, ^bKSH grubuna, ^cKSH+SPİ25 grubuna göre istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir, $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Yapılan korelasyon analizinde hipokampal CA1 intakt nöron sayısı ve morris su labirenti testi 5. Gün platformu bulma süresi ($r = -0.426$) ($p = 0.015$), beyin dokusu MDA düzeyi ($r = -0.789$) ($p < 0.001$), beyin dokusu protein karbonilleri düzeyi ($r = -0.525$) ($p = 0.007$), hipokampus NLRP3 düzeyi ($r = -0.517$) ($p = 0.008$), hipokampus JAK2 düzeyi ($r = -0.419$) ($p = 0.033$), hipokampus STAT3 düzeyi ($r = -0.395$) ($p = 0.046$), hipokampus GLT-1 düzeyi ($r = -0.517$) ($p = 0.002$), hipokampus AChE aktivitesi düzeyi ($r = -0.783$) ($p < 0.001$) arasında negatif ve anlamlı korelasyon bulundu. Ayrıca CA1 intakt nöron sayısı ve probe trail testi hedef kadranda geçirilen süre ($r = 0.456$) ($p = 0.010$), beyin dokusu katalaz aktivitesi düzeyi ($r = 0.849$) ($p < 0.001$), beyin dokusu GSH düzeyi ($r = 0.602$) ($p = 0.001$), hipokampus CaMKII düzeyi ($r = 0.732$) ($p < 0.001$) arasında anlamlı ve pozitif korelasyon görüldü (Tablo 38).

Tablo 39: Hipokampal CA1 İntakt Nöron Sayısı ve deney ile ilgili diğer parametreler arasındaki korelasyon analizi

Hipokampal CA1 İntakt Nöron Sayısı		
	r	p
Morris Su Labirenti Testi 5. Gün Platformu Bulma Süresi	-0.426*	0.015
Probe Trail Testi Hedef Kadranda Geçirilen Süre	0.456*	0.010
Beyin Dokusu MDA Düzeyi	-0.789*	<0.001
Beyin Dokusu Protein Karbonilleri Düzeyi	-0.525*	0.007
Beyin Dokusu Katalaz Aktivitesi Düzeyi	0.849*	<0.001
Beyin Dokusu GSH Düzeyi	0.602*	0.001
Hipokampüs NLRP3 Düzeyi	-0.517*	0.008
Hipokampüs JAK2 Düzeyi	-0.419*	0.033
Hipokampüs STAT3 Düzeyi	-0.395*	0.046
Hipokampüs CaMKII Düzeyi	0.732*	<0.001
Hipokampüs GLT-1 Düzeyi	-0.517*	0.002
Hipokampüs AChE Aktivitesi Düzeyi	-0.783*	<0.001

* Anlamli farklılığı göstermektedir (p<0.05).

Yapılan korelasyon analizinde hipokampal CA3 intakt nöron sayısı ve beyin dokusu MDA düzeyi ($r=-0.626$) ($p=0.001$), beyin dokusu protein karbonilleri düzeyi ($r=-0.488$) ($p=0.013$), hipokampüs NLRP3 düzeyi ($r=-0.480$) ($p=0.015$), hipokampüs AChE aktivitesi düzeyi ($r=-0.746$) ($p<0.001$) arasında negatif ve anlamlı korelasyon bulundu. Ayrıca CA3 intakt nöron sayısı ve beyin dokusu katalaz aktivitesi düzeyi ($r=0.823$) (<0.001), beyin dokusu GSH düzeyi ($r=0.450$) ($p=0.021$), hipokampüs CaMKII düzeyi ($r=0.558$) ($p=0.007$), hipokampal CA1 intakt nöron sayısı ($r=826$) ($p<0.001$) arasında anlamlı ve pozitif korelasyon görüldü (Tablo 40).

Tablo 40: Hipokampal CA3 Sağlam Nöron Sayısı ve deney ile ilgili diğer parametreler arasındaki korelasyon analizi

Hipokampal CA3 İntakt Nöron Sayısı		
	r	p
Beyin Dokusu MDA Düzeyi	-0.626	0.001
Beyin Dokusu Protein Karbonilleri Düzeyi	-0.488*	0.013
Beyin Dokusu Katalaz Aktivitesi Düzeyi	0.823*	<0.001
Beyin Dokusu GSH Düzeyi	0.450*	0.021
Hipokampus NLRP3 Düzeyi	-0.480*	0.015
Hipokampus CaMKII Düzeyi	0.558*	<0.001
Hipokampus AChE Aktivitesi Düzeyi	-0.746*	0.007
Hipokampal CA1 İntakt Nöron Sayısı	0.826*	<0.001

* Anlamli farklılığı göstermektedir (p<0.05).

4.17.2. Hipokampal CA1 ve CA3 bölgesinin histopatolojik görünümleeri

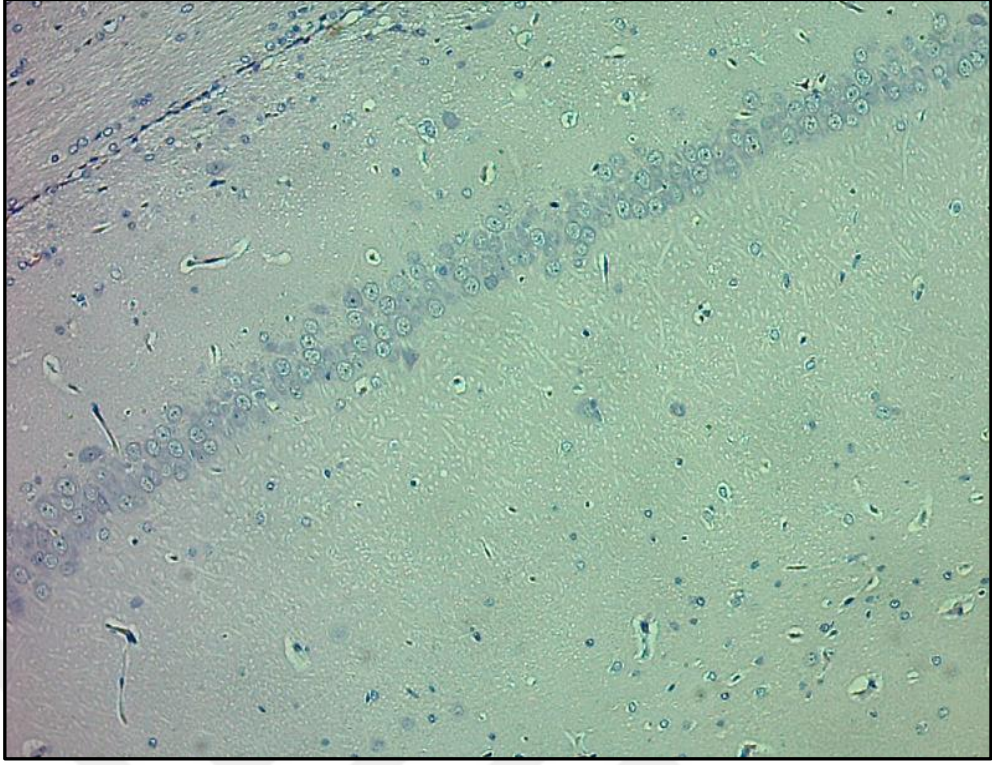
Çalışma gruplarına ait beyin dokularından hazırlanan H&E kesitlerdeki hipokampal CA1 ve CA3 bölgesinin histopatolojik görünümleerinde:

Kontrol grubuna ait hipokampal CA1 ve CA3 bölgesinde intakt nöronlar izlenmekte, nöronal kayıp gözlenmemektedir (Şekil 52, Şekil 53).

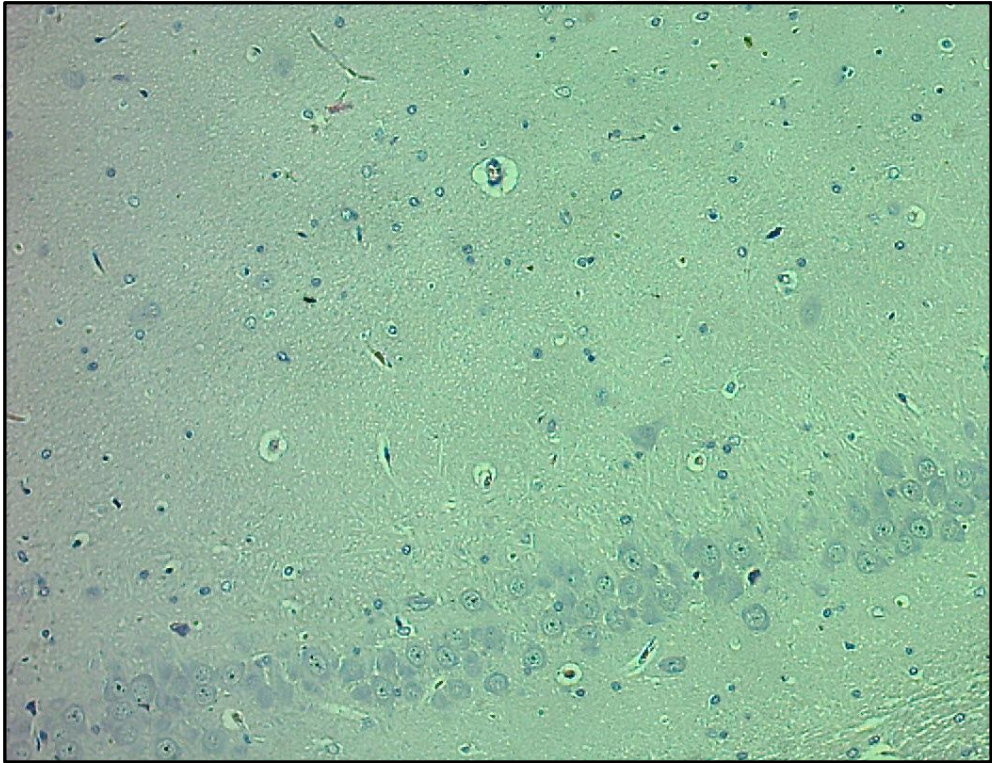
KSH grubu; diğler gruplara kıyasla daha belirgin olarak hipokampal CA1 ve CA3 bölgesinde nöronal hücre kaybı izlenmektedir (Şekil 54, Şekil 55).

KSH+SPİ25 grubunda, her iki bölgede de kontrol grubuna göre daha fazla, KSH grubuna kıyasla daha az nöron kaybı mevcuttur (Şekil 56, Şekil 57).

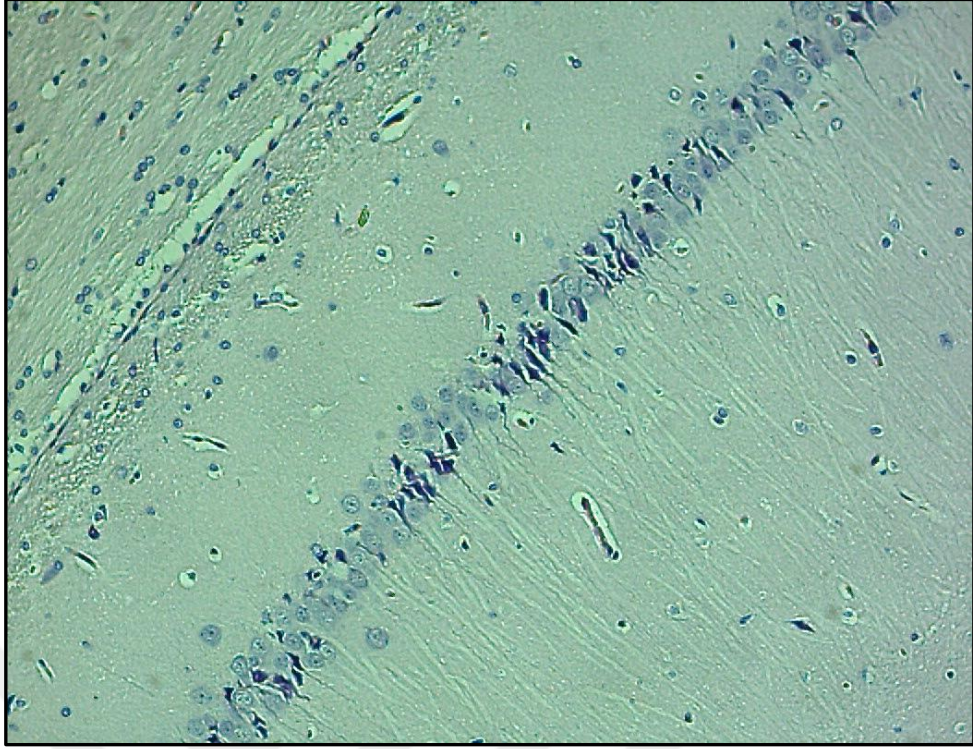
KSH+SPİ50 grubunda, hipokampal CA1 ve CA3 bölgelerinde kontrol grubuna benzer görünümde intakt nöronlar gözlendi (Şekil 58, Şekil 59).



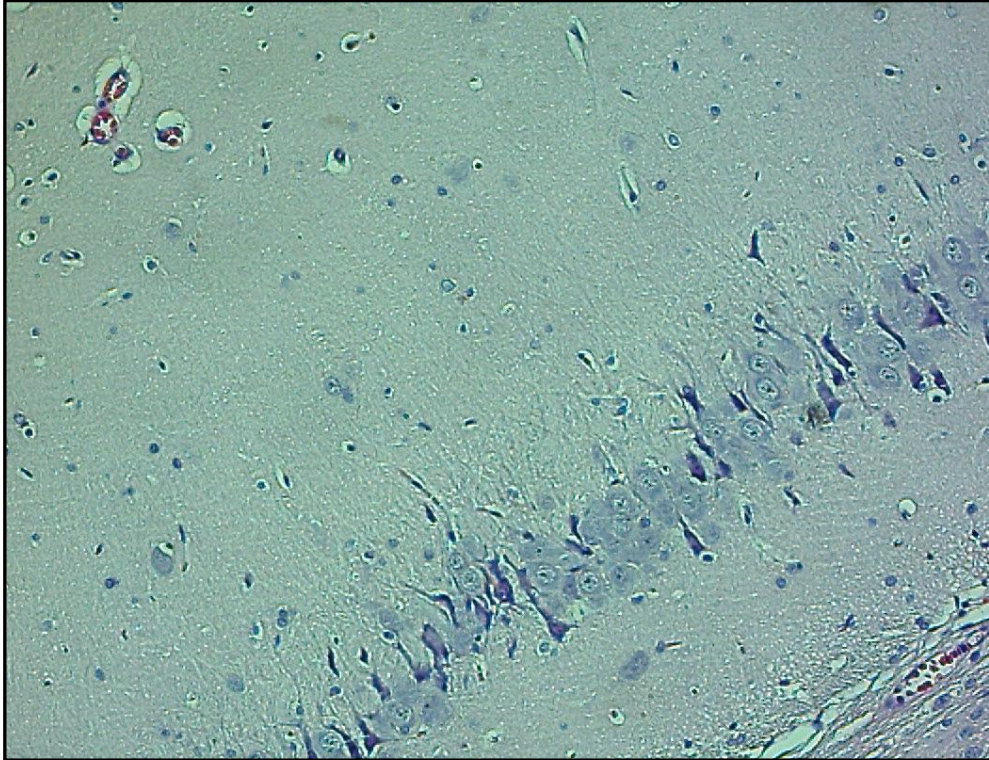
Şekil 52: Kontrol grubuna ait hipokampal CA1 bölgesinin histopatolojik görünümü



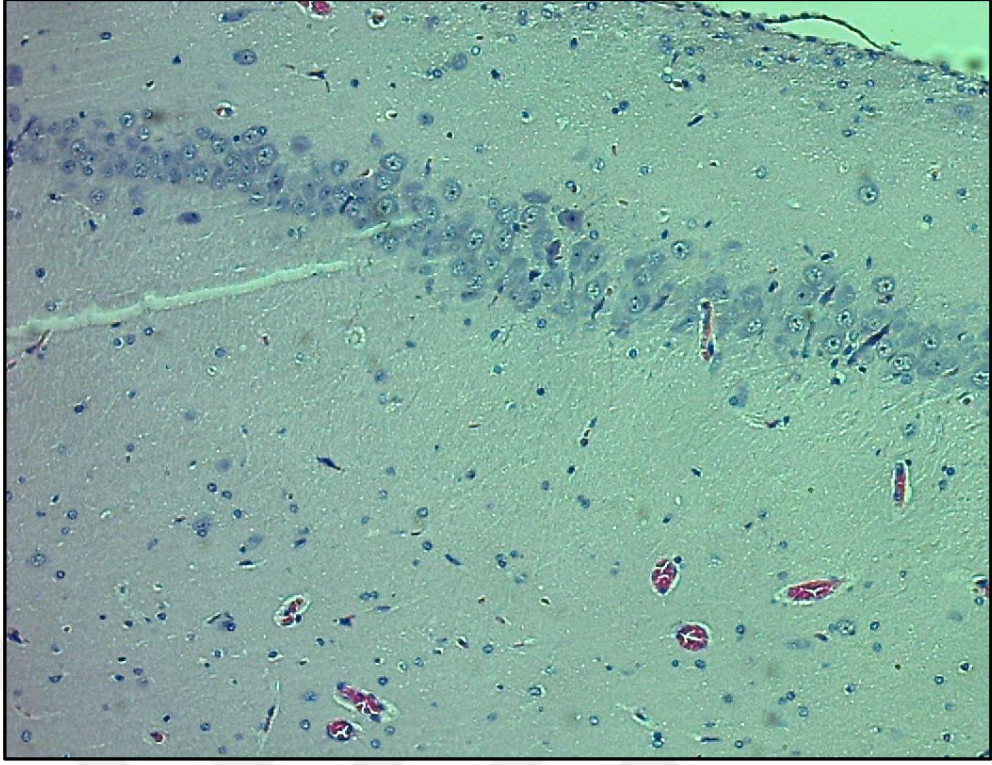
Şekil 53: Kontrol grubuna ait hipokampal CA3 bölgesinin histopatolojik görünümü



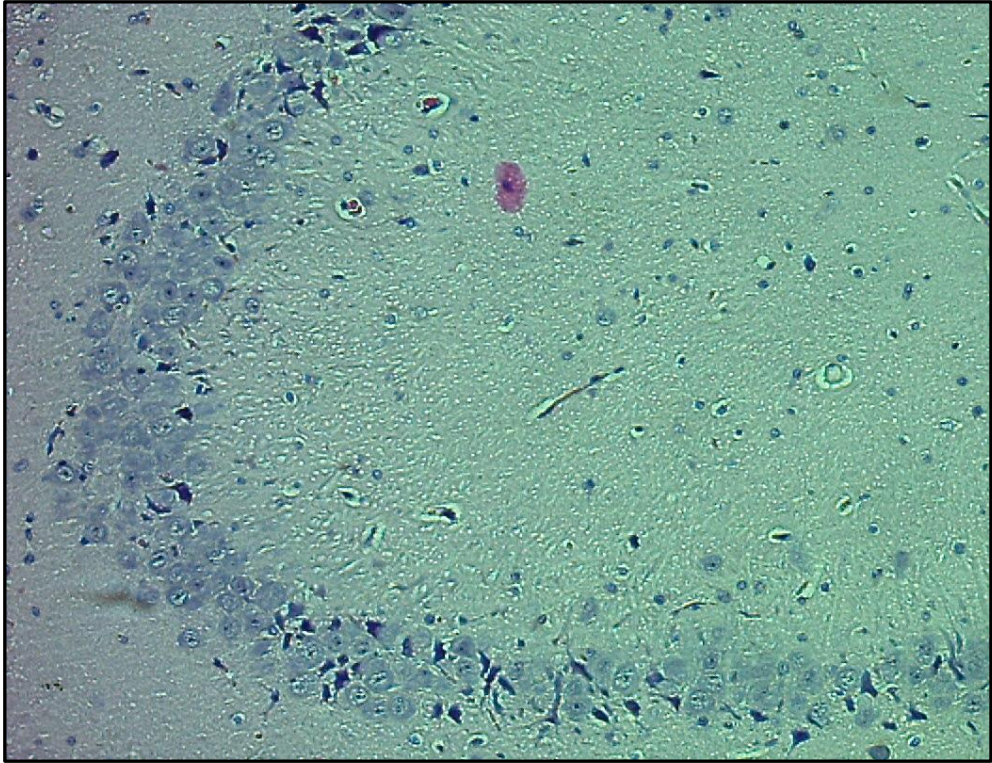
Şekil 54: KSH grubuna ait hipokampal CA1 bölgesinin histopatolojik görünümü



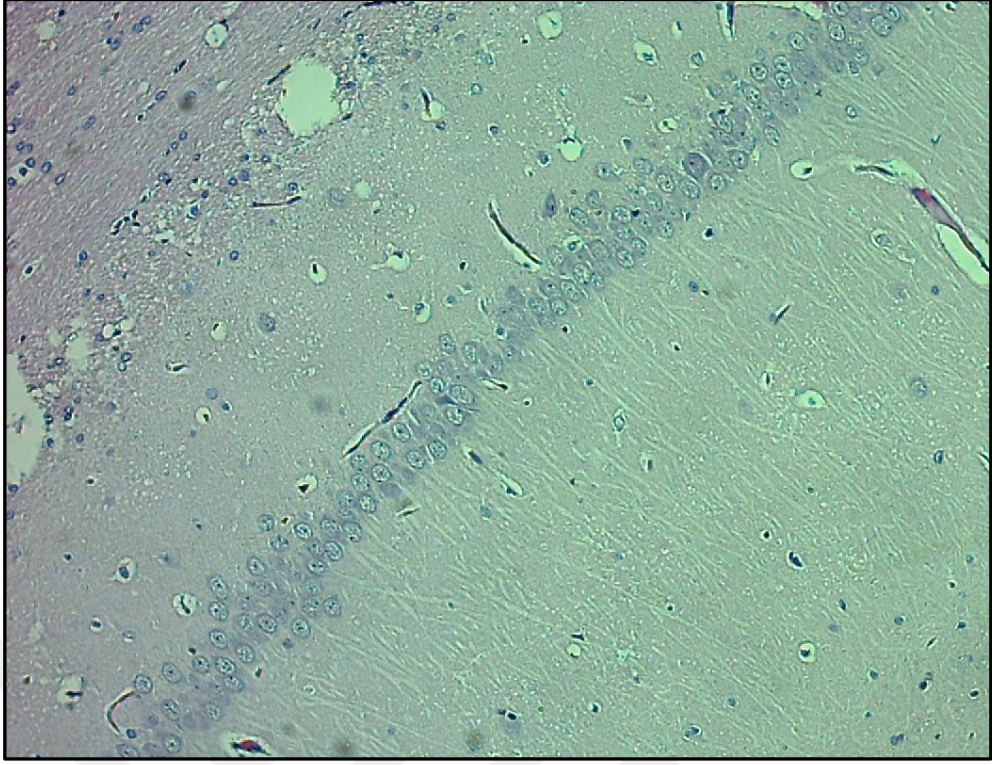
Şekil 55: KSH grubuna ait hipokampal CA3 bölgesinin histopatolojik görünümü



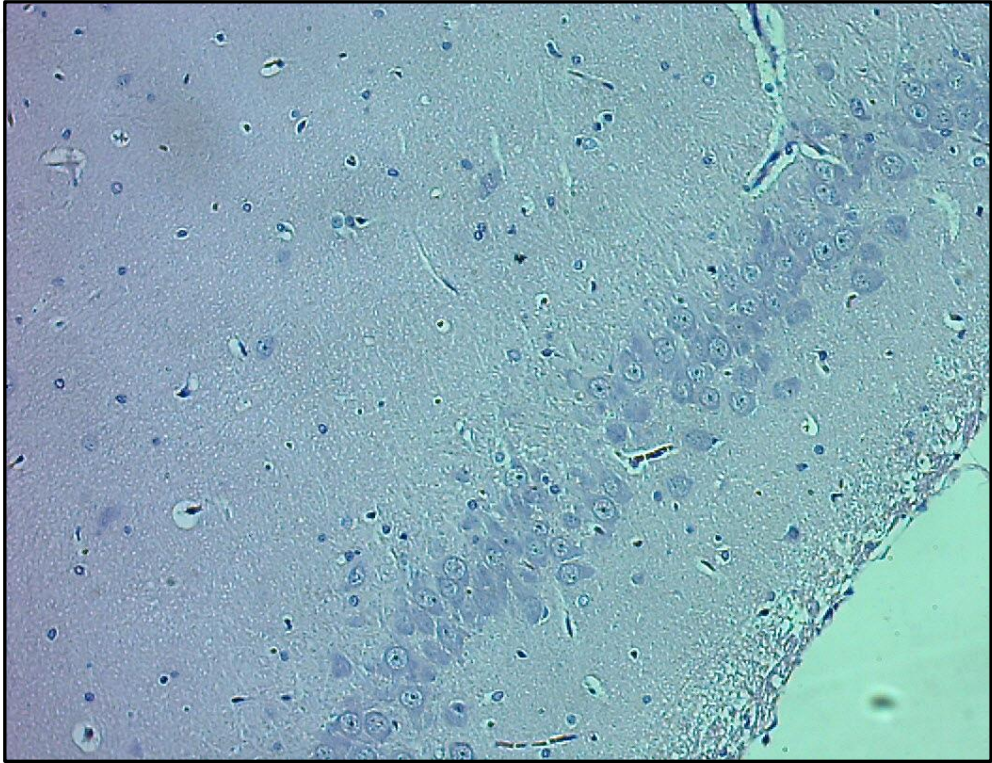
Şekil 56: KSH+SPİ25 grubuna ait hipokampal CA1 bölgesinin histopatolojik görünümü



Şekil 57: KSH+SPİ25 grubuna ait hipokampal CA3 bölgesinin histopatolojik görünümü



Şekil 58: KSH+SP150 grubuna ait hipokampal CA1 bölgesinin histopatolojik görünümü



Şekil 59: KSH+SP150 grubuna ait hipokampal CA3 bölgesinin histopatolojik görünümü

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada KSH oluşturulan overektomize dişi sıçanlarda bir mineralokortikoid reseptör antagonisti olan spironolaktonun 25mg/kg ve 50mg/kg dozlarında uygulamasının hipokampal fonksiyonlar üzerine etkileri incelenmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre spironolaktonun özellikle 50mg/kg dozunun, kan basıncı üzerine etkilerinden bağımsız, beyin dokusunda MDA ve protein karbonilleri düzeylerini azaltarak ve katalaz, GSH ve hipokampüste Nrf2 düzeylerini artırarak oksidatif hasarı azaltabileceğini gösterdi. Ayrıca hipokampal CREB, CaMKII düzeylerini artırarak KSH'nin neden olabileceği sinaptik disfonksiyonu, AChE düzeylerini azaltarak kolinerjik sistemdeki bozulmayı iyileştirebileceğini gösterdi. GLT-1 düzeyini KSH grubuna kıyasla azaltması glutamat salınımını azaltabileceğini aşırı glutamat salınımı ile oluşacak eksitoksisiteyi engelleyebileceğini düşündürdü. Histolojik boyutta hipokampal CA1 ve CA3 bölgelerindeki sağlam hücre sayısını koruyarak hücre apoptozunu ve doku harabiyetini önleyebileceği de gözlenmiştir. Dahası tüm bu parametrelerdeki protektif ve tedavi edici etkileri ile Morris su labirenti testi ile saptanan bilişsel fonksiyonlarda bozulmayı iletirebileceği de saptanmıştır. Hipokampal BDNF düzeylerini ve IL-1 β , TNF- α olmak üzere proinflatuar sitokinlerin ve inflamasyonla ilişkili NLRP3, JAK2 ve STAT3 düzeylerini 3 haftalık spironolakton uygulamasının her iki dozda da etkilemediği saptanmıştır.

VaD yaşlılarda Alzheimer hastalığından sonra ikinci en sık görülen demans şeklidir (85). Dikkat çekici bir şekilde dünya genelinde demansı olan kadınların erkeklerden daha fazla olduğu bildirilmektedir (11). Postmenopozal kadınlarda demans görülme sıklığındaki artış mitokondriyal disfonksiyon ve azalmış hipokampus hacimleri, glikoz metabolizmasındaki değişiklikler ve vasküler disfonksiyon gibi VaD biyobelirteçleriyle örtüşen menopozla ilişkili değişiklikler tarafından hızlandırıldığı düşünülmektedir (12,13,55). Östrojen reseptörleri öğrenme ve hafıza için kritik öneme sahip beyin bölgelerinde, hipokampusun her bir alt alanında, prefrontal kortekste, amigdalada, singulat kortekste ve retrosplenial kortekste bulunur (146,147). Östrojenlerin reseptörleriyle etkileşimleri hayvan ve insan çalışmalarında, hipokampal yapısal ve işlevsel bütünlük üzerindeki yararlı etkilerine dair güçlü destek sağlamaktadır (28). Kemirgenlerde, 17 β -estradiol, hipokampal uyarıcı nörotransmisyonu, nörogenezi ve sinaptogenezi artırır ve Cornu Ammonis alt alanı CA1 ve dentat girus içindeki çeşitli mekanizmaları düzenler (29). Üreme çağındaki kadınlarda, daha yüksek estradiol

seviyeleri gelişmiş mekansal hafıza ile ilişkiliyken, progesterondaki dalgalanmalar değişmiş hipokampal alt alan (CA2/3) ve medial temporal lob korteks hacimleri ile ilişkilidir (36). Ancak menopoza birlikte overlerde östrojen üretimi durur ve bu da merkezi sinir sisteminin işlevi üzerinde olumsuz bazı etkilere neden olur (3). Menopozun etkilerine bağlı olarak, kadın ve erkeklerin demansa duyarlılık ve ilerlemesi açısından farklılıklar gösterdiği kabul edilmektedir. Kadınlarda nörodejenerasyon ve demansın klinik semptomlarının daha hızlı ilerlediği bilinmektedir (2). Postmenopozal kadınlarda, estradiol veya estron bazlı hormon tedavisi daha büyük hipokampal hacimlerle ve gelişmiş sözel hafızayla ilişkilidir; estradiol baskılanması ise ilişkisel kodlama sırasında sözel ve kaynak hafızasını ve hipokampal aktiviteyi azaltır (175). Sonuçta bu etkiler 15 yıl kadar önce menopoza ortaya çıkan hipokampal atrofi de dahil birçok patofizyolojik mekanizma VaD'deki hipokampal bilişsel gerileme ile benzerlik göstermektedir (13,55). VaD insidansındaki cinsiyete özgün bu fark ve patofizyolojik mekanizmalar göz önüne alındığında mevcut çalışmada dişi sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlarda menopoz cerrahi olarak bilateral over dokularının çıkarılmasıyla taklit edilebilmektedir (15,16). Bu nedenle tüm gruplara dorsal yaklaşımla bilateral overektomi uygulayıp daha önceki çalışmalarla uyumlu olarak menopozun yerleşmesi için 5 hafta beklenildi.

VaD'da bilişsel düşüşü hafifletmek için mevcut tedavi stratejileri ağırlıklı olarak donepezil, memantin ve pirasetam gibi ilaçların kullanımına dayanmaktadır (54). Çalışmamızda, 65 yaş üstü kişilerin %1-4'ünü etkileyen ve morbiditesi yaşla birlikte artan (65) deneysel olarak oluşturulabilen VaD'nin hem fizyolojik parametreler ve öğrenme-bellek süreci üzerindeki olumsuz etkilerinin neler olduğunu hem de bu durumları tersine çevirebilecek bir tedavi ajanı olarak ön gördüğümüz spironolaktonun etkilerini araştırdık. Klinikte kalp yetmezliği ve hipertansiyonu tedavi etmek için yaygın olarak kullanılan bir K⁺ tutucu diüretiktir (45). Spironolakton KBB'yi kolaylıkla geçebilir ve beyinde aldosteron aracılı olumsuz etkilerin azaltılmasında aracılık edebilir (176). Daha önceki nörodejeneratif hastalıkların deneysel modellerinde spironolakton 25 ve 50mg/kg dozlarında kullanılmıştır (49, 159). Bu dozların kan basıncı, kalp hızını, vücut ve beyin ağırlığını etkilemediği bu çalışmalarda gösterilmiştir (48, 122). Çalışmamızda hayvanların haftalık olarak vücut ağırlıkları takip edilmiş ve beyin/vücut ağırlığı yüzde oranı, kan basıncı ve kalp hızı gibi önemli fizyolojik parametrelere bakılmıştır. Tüm grupların haftalık vücut ağırlıklarındaki değişimin grup içi karşılaştırmalarında anlamlı artışlar olmuş ve gruplar arasındaki haftalık vücut ağırlığı

yüzde değişimlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Beyin ağırlığının vücut ağırlığına yüzde oranında da anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Benzer şekilde kan basınçlarında ve kalp hızlarında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu sonuçlar literatürle uyumlu olarak kullanılan spironolakton dozlarının diüretik ve antihipertansif etkilerinden bağımsız olarak beyin ve hipokampal dokuda pozitif etkilerini gösterdiğini ortaya koymuştur.

VaD etiyojisi karmaşıklığını korusa da nörogörüntüleme ve nöropatolojik çalışmalar, mikro enfarktların ve iskemik lezyonların serebral kan akımında kronik bir azalmaya ve sonuçta KSH'a neden olduğunu göstermektedir (61,177). Yapılan çalışmalar KSH'nin oksidatif strese, nörotransmitter sistemde bozulmaya, nöroinflamasyona, nöronal apoptoza, lipid peroksidasyonuna, nörotrofik ve büyüme faktörlerindeki değişikliklere ve sinaptik disfonksiyona neden olduğu gösterilmiştir (10,73,87). Dahası KBB'de bozulmaya, beyaz cevher lezyonlarına, anormal glial aktivasyona, nöronal hasar ve kayıplarına yol açarak ve sonuçta da VaD ile karakterize bilişsel disfonksiyona neden olmaktadır (3,4,73,87). Deneysel olarak KSH sıçanlarda bilateral ortak karotis arterlerin tam ligasyonu ile oluşturulmaktadır (10,62) ve bilişsel fonksiyonlar sıklıkla Morris su labirenti testi ile değerlendirilmektedir (3,64). Öğrenme ve hafıza performanslarını Morris su labirenti ile değerlendirdiğimiz çalışmada grup içi günlük platform bulma süreleri kıyaslandığında 5. gün platform bulma sürelerinin 1. güne oranla düştüğünü gözledik. Gruplar arası günlük platform bulma sürelerinin karşılaştırdığımızda ise 5. gün KSH grubunda kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde uzadığını gözledik. Ayrıca son gün *probe trail* testinde hedef kadranda geçirilen süre KSH grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak kısaldığı görüldü. Bu sonuçlar literatürle uyumlu olarak KSH' nin öğrenme ve hafıza fonksiyonunu bozulduğunu göstermektedir.

RAAS kan basıncının düzenlenmesinde önemli rol oynar. Aldosteron, Anjiotensin II dahil olmak üzere çeşitli uyarılara yanıt olarak salınan ve etkilerini MR'lerine bağlanarak ortaya çıkaran bir steroid hormondur (151). Aldosteronun MR'ye bağlanması vücuttaki elektrolit ve su dengesine katkıda bulunurken uygun olmayan MR aktivasyonunun kan basıncından bağımsız çeşitli doku ve organlarda zararlı etkiler göstererek patolojiyi tetikleyebileceği bildirilmektedir (21,43,179). Literatürde mineralokortikoid reseptörlerinin aktivasyonunun bilişsel bozuklukla ilişkili olabileceğini ve bu reseptörlerin blokajının bilişsel fonksiyonu iyileştirmede faydalı olabileceğini göstermiştir (162,164). Klinik olarak MR'lerin blokajı vasküler

perfüzyonu iyileştirerek, nörohormonal aktivasyonu ve sistemik inflamasyonu azaltarak kardiyovasküler kaynaklı mekanizmalar ve HPA eksen ve nörovasküler fonksiyon dahil olmak üzere birden fazla fizyolojik yol aracılığıyla bilişsel fonksiyonu etkilediği öne sürülmektedir (43,50,51). Ayrıca Alzheimer (49,159), şizofreni (164), akut stres (161), postoperatif bilişsel bozukluk (162) ve korku modelinde (163), spontan hipertansif ve (164) obez sıçanlarda (165) gibi prelinik çalışmalarda da MR blokajının hipokampal fonksiyonları etkileyerek öğrenme ve hafızayı iyileştirdiği gösterilmiştir. Ancak, bu çalışma spironolaktonun, VaD tipi KSH kaynaklı bilişsel bozukluk üzerine etkilerini gösteren ilk çalışmadır. Bu konuda daha önce yapılmış herhangi bir çalışma bulunmadığı için spironolaktonun öğrenme ve hafıza üzerindeki etkileri 25 ve 50mg/kg olmak üzere farklı 2 doz kullanılarak araştırıldı. Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular önceki çalışmalarla uyumlu olarak platformu bulma süresinin her iki dozda da KSH grubuna kıyasla iyileştirdiğini gösterdi. Ayrıca spironolaktonun 50mg/kg dozunun KSH grubuna göre hedef kadranda geçirilen süreyi artırdığını gözledik. Bu sonuçlar spironolakton uygulamasının KSH ile oluşan bilişsel düşüşü iyileştirebileceğini göstermektedir.

KSH'nin, beyaz cevher lezyonlarına yol açan temel faktörlerden biri olan lipid peroksidasyonunu indüklediği bilinmektedir. ROS'nin artışı lipid peroksidasyonuna ek olarak protein oksidasyonunu da indükleyebilir ve hücrel makromolekül hasarına ve sonunda hücre ölümüne yol açan bir dizi reaksiyonu tetikleyebilir (5,17,18). MDA lipid peroksidasyonunun, protein karbonilleri ise protein oksidasyonunun önemli bir göstergesidir ve deneysel çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (3,16). KSH tarafından indüklenen enerji yetersizliğinin bir sonucu olarak beyin dokusunda lipid peroksidasyonunun, MDA seviyelerinin ve protein karbonillerinin önemli ölçüde arttığını bulduk. 25mg/kg spironolakton uygulamasının protein karbonil düzeyinde bir düşüşe neden olurken, 50mg/kg spironolakton uygulaması hem MDA hem de protein karbonil düzeylerini düşürmede başarılı olmuştur. Bu sonuç spironolakton uygulamasının, KSH grubuna kıyasla sıçan beyinlerinde serbest radikal sistemini yavaşlattığını düşündürmektedir.

KSH ROS üretimini artırırken antioksidan enzim ve proteinlerin tüketimini artırır (76). Oksidatif stresi azaltmak veya beyin antioksidan seviyesini artırmak iskemik/hipoksik hasarı azaltabilir. Glutasyon sistemi beyindeki ROS'un ortadan kaldırılması için birincil savunma mekanizması sağlamada önemli bir rol oynar. Katalaz beyin gibi hidrojen peroksit üretiminin fazla olduğu dokularda yoğun olarak bulunur ve hidrojen peroksitin su ve oksijene dönüştürülmesinde önemli rol oynar (80,81).

Çalışmamızda KSH'nin beyin dokusu GSH ve katalaz enzim aktivitesinde anlamlı bir azalmaya neden olduğunu gözlemledik. Spironolakton daha önce yapılan çalışmalarda göz (46), böbrek (47), karaciğer (48) gibi dokularda antioksidan etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Benzer şekilde mevcut çalışmada spironolaktonun özellikle 50mg/kg dozunun GSH ve katalaz enzim aktivitesini KSH grubuna kıyasla önemli ölçüde artırdığı bulunmuştur. Bu sonuçlar spironolaktonun lipid peroksidasyonunu ve protein oksidasyonunu azaltarak ve antioksidan maddelerin düzeylerini artırarak KSH'nin neden olduğu oksidatif hasara karşı etkili olabileceğini ortaya koymaktadır.

Nrf2, hücrelerde oksidatif stres, inflamasyon ve detoksifikasyon süreçlerinde önemli rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür (84). Hücrel antioksidan tepkisinin ana düzenleyicisi olan Nrf2, ARE'lere bağlanır ve GPX4, HO-1 ve NQO1 gibi çeşitli genlerin transkripsiyonlarını kontrol eder. NRF2/ARE etkileşimi antioksidan kapasiteyi artırıcı etkilere sahiptir ve lipid peroksidasyonunun ve ferroptozun temel bir negatif düzenleyicisidir (82,84). Önceki çalışmalar, spironolaktonun hipokampus ve PFC'de (49) ve böbrek (47), karaciğer (48) gibi çeşitli dokularda Nrf2 düzeylerini artırdığını göstermiştir. Mevcut çalışmada 50mg/kg SPI uygulamasının hipokampal Nrf2 düzeylerini KSH grubuna kıyasla önemli ölçüde artırdığını bulduk. Bu sonuç, spironolakton tedavisinin, Nrf2/ARE sinyal yolunu aktive ederek hipokampüste KSH kaynaklı lipid peroksidasyonunu hafifletebileceğini, böylece hipokampal nöronal hasarını ve kaybını azaltarak nöroprotektif bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Nöroinflamasyon, serebrovasküler ve nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde önemli bir role sahiptir ve mikroglialar bu konuda önemli bir rol oynar. Aktive edilmiş mikroglialar, AD ve KSH modelinde nöronal dejenerasyonu daha da artıran IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX-2 ve iNOS gibi proinflamatuvar faktörleri salgırlar (19). Bu nedenle, mikrogliaların aktivasyonunu engelleyerek nöroinflamasyonu azaltmak, demansı tedavi etmek için umut verici bir strateji olarak kabul edilmektedir (88). MR aktivasyonu IL-1 β , TNF- α inflamatuvar sitokin üretimini artırdığı (100), spironolakton uygulamasının ise MR'yi bloke ederek antiinflamatuvar etkiler gösterdiğini bildiren çalışmalar mevcuttur (49, 159). Mevcut çalışmada nöroinflamasyonu değerlendirebilmek için IL-1 β , TNF- α , NLRP3 ve inflamasyonla ilişkili JAK2 ve STAT3'ün hipokampal düzeylerine bakılmıştır. Çalışmadan elde ettiğimiz bulgulara göre hipokampal TNF-a düzeylerinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmazken, 25 mg spironolakton uygulaması kontrol grubuna kıyasla IL-1 β düzeylerini artırdığı görülmüştür. Bu sonuçlar literatürde bildirilen bazı çalışmaların

sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Örneğin spironolaktonun intratekal enjeksiyonu spinal kord dorsal kökte IL-1 β , TNF- α ekspresyonunu önemli ölçüde azaltırken, IL-6 ekspresyonunu etkilemediği bildirilmiş (180). Başka bir çalışmada ise hepatik iskemi/reperfüzyon hasarında karaciğer dokusunda IR grubuna kıyasla IL-6 seviyelerini artırırken TNF- α ve IL-1 β düzeylerine etki etmediği gösterilmiştir (181). Randomize klinik bir çalışmada ise böbrek nakli olan hastalarda transplantasyon öncesi ve sonrası plazma interferon- γ , IL-17A, TNF- α , IL-6, IL-1 β ve IL-10'un konsantrasyonları bir yıllık spironolakton tedavisiyle değişmediği bildirilmiştir (182). Spironolaktonun inflamatuvar cevap üzerine olan gözlenen bu etkileri kullanıldığı hastalık modeliyle yakından ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

NLRP3 inflamazomunun aktivasyonu, piroptozu ve proinflamatuvar sitokinler IL-1 β ve IL-18'in salınımını indüklemektedir (94). Son çalışmalarda, NLRP3 inflamazomunun beyinde nöroinflamasyonu indüklemek için aktive olduğu ortaya konmuştur (95). Vasküler demans sırasında oksidatif stres, kalsiyum dengesizliği, hücre içi potasyum kaybı ve cAMP sinyallemedeki değişiklikler gibi çeşitli hücre içi sinyaller NLRP3'ü aktive edebilir ve bu durum nöronal hasar ve bilişsel bozulmaya katkıda bulunabilir (94,95). Spironolakton ve eplerenon gibi MR antagonistlerinin, diyabet, hipertansiyon ve metabolik bozukluk modellerinde NLRP3 inflamazom aktivitesini baskıladığı ve proinflamatuvar sitokin salınımını azalttığı gösterilmiştir (90, 183, 184). Fakat KSH modelinde spironolaktonun NLRP3 düzeylerine etkisi bilinmemektedir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgulara göre hipokampal NLRP3 düzeylerinde KSH oluşturulan gruplarda önemli bir artış olduğu bulundu. Spironolakton uygulamasının her iki dozda da bu artışı durdurmada etkisiz kaldığı gözlemlendi. Bu, kullanılan modellerdeki deneysel koşullardaki farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir. KSH koşullarında NLRP3 ekspresyonu MR dışında güçlü yollar aracılığıyla indüklenebileceğini düşündürmektedir. Bazı durumlarda inflamasyon sadece MR sinyaliyle değil, TLR4-MyD88-NF- κ B yolu, IL-6-STAT3 eksenini Th17-IL-17A çevrimi gibi süreç ve yollarla sürdürülebilir (20-22). Bu durumda MR blokajı yetersiz kalabilir çünkü inflamasyonun ilerlemesinde asıl sorumlu yolak MR dışıdır.

JAK2 ve STAT3, merkezi sinir sisteminde özellikle nöroinflamasyon süreçlerinde önemli rol oynayan sinyal iletim proteinleridir. Bu yolak, özellikle mikrogliya ve astroglia hücreleri üzerinden inflamatuvar ve anti-inflamatuvar yanıtların düzenlenmesinde görev alır (185). KSH oluşturulmuş sıçanlarda mikrogliyal aktivasyonun, C1q, TNF- α ve IL-1 α seviyelerinin ve JAK2 ve STAT3

fosforilasyonundaki artış ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (6). Literatürle uyumlu olarak çalışmamızda KSH'nin hipokampal JAK2/STAT3 düzeyini artırdığını fakat spironolakton uygulamasının bu artışı engellemediği görüldü. Literatürde spironolaktonun JAK2/STAT3 yolağına etkisini inceleyen çalışmalar sınırlıdır. Farelerde isoproterenol ile indüklenen kardiyak hipertrofi modelinde, spironolaktonun 14 günlük 200mg/kg tedavisi p-JAK2/JAK2 ve p-STAT3/STAT3 oranlarını azaltarak proinflamatuvar sitokin üretimini (TNF- α , IL-6) düşürmüş ve kardiyak hipertrofiyi anlamlı biçimde baskıladığı bildirilmiştir (96). Mevcut çalışmada kullanılan deneysel model ve spironolakton dozları etkisiz kalmış olabilir. Mineralokortikoid reseptör aktivasyonunun nöroinflamasyonda rol oynadığı bilinse de merkezi sinir sistemi ile ilgili spironolaktonun JAK2/STAT3 sinyal yolağı üzerinde etkilerini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Bu anlamda mevcut çalışma spironolaktonun hipokampal JAK2/STAT3 düzeylerini araştıran ilk çalışmadır. KSH'de TNF- α , IL-1 β , NLRP3 ve JAK2/STAT3 düzeylerinin artması dikkat çekicidir. İskemik inme modelinde JAK2/STAT3 yolunun inhibisyonu NLRP3 inflamazom aktivasyonunu azaltarak iskemik hasarı ve nöroinflamasyonu iyileştirdiği bildirilmiştir (23). Benzer şekilde Xi ve arkadaşları (2025) serebral iskemi reperfüzyonu sonrası JAK2/STAT3 sinyal yolağının inhibisyonunun proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu ve oksidatif hasarı azalttığını bildirmişler (26). Literatürle uyumlu olarak yapılan korelasyon analizlerinde JAK2/STAT3 arasında pozitif anlamlı ilişki bulundu. Bu anlamlı pozitif korelasyon KSH modelinde de JAK2 ve STAT3 arasında sıkı bir bağlantının olduğunu, göstermektedir. Ayrıca yine literatürle uyumlu olarak JAK2 ve STAT3 düzeyleri ile NLRP3, MDA, protein karbonilleri ve katalaz düzeyleri arasındaki anlamlı korelasyonlar JAK2/STAT3 sinyal yolağının hem inflamasyonla hem de oksidatif hasarla yakından ilişkili olduğunu göstermektedir. KSH'de JAK2/STAT3 sinyal yolağının hedeflenmesi inflamasyonun ve oksidatif hasarın azaltılmasında etkili olabileceğini düşündürmektedir ve bu anlamda ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Özet olarak çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgulara göre KSH'un nöroinflamasyonu artırdığı fakat spironolakton uygulamasının her iki dozda da nöroinflamasyon ile ilgili belirteçleri azaltmada etkisiz kaldığını tespit ettik. Bu sonuçların uygulanan KSH modeliyle ya da uygulanan spironolakton dozlarıyla ya da uygulama süresiyle ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz. Belki de çoklu ve karmaşık bir süreç olan nöroinflamasyonda rol oynayan IL-6, IL-10 gibi sitokinlerin düzeylerine ya da NF- κ B yolu üzerinden etki etmiş olabilir. Öyle ki sıkı bir şekilde koordine edilmiş

GR ve MR aktivitesi, mikroglia hücrelerindeki NF- κ B yolunu ve inflamatuvar mediatörlerin kontrolünü düzenlediği bildirilmiştir (186). Ayrıca spironolaktonun, insan mononükleer hücrelerde NF- κ B yolunu inhibe ederek IL-6 ve IFN- γ gibi pro-inflamatuvar sitokin üretimini azalttığı (187) aynı zamanda LPS ile indüklenen sepsis modelinde spironolakton uygulaması, pro-inflamatuvar IL-1 β seviyelerini azaltırken anti-inflamatuvar IL-10 düzeylerini artırdığını (188) bildiren çalışmalar mevcuttur. Bu anlamda çalışmamızda NF- κ B, IL-1, IL-6, IL-10, IFN- γ , mikroglial aktivasyon düzeylerine bakılmamıştır ve spironolaktonun nöroinflamasyon süreciyle ilgili etkilerini ve olası etki mekanizmalarının aydınlatılacağı daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

BDNF, başta hipokampus olmak üzere beyinde yaygın olarak eksprese edilir ve bilişsel işlevle yakından ilişkilidir. BDNF TrkB aktive eder ve sinaptik plastisitede, nöronal aktivitede, nöronal sağkalımda, sinaptik yeniden şekillenmede, nörojenezde önemli rol oynar (30). BDNF, ERK ve CREB ve CaMKII gibi alt akış protein aktivasyonunu başlatır (31). CREB mitokondriyal ve nükleer DNA'ya bağlanabilir, sinaptogenezi ve hafıza oluşumunu indükleyebilir, nöronun hayatta kalmasına katkıda bulunan genleri eksprese edebilir ve çok sayıda nöronal aktiviteye katılabilir (34). NMDA reseptörleri, presinaptik ve postsinaptik sinyalizasyonun önemli ateşleyicileri olarak hareket ederler ve birçok sinaptik aktivite formunun indüklenmesinde önemli bir rol oynarlar. Bu glutamat reseptörleri aracılığıyla giren Ca^{+2} , sinaptik sinyallemeği düzenlemek için postsinaptik yoğunlukta veya yakınında bulunan CaMKII'yı aktive eder (32). VaD'nin deneysel modelinde p-CaMKII, ve p-CREB seviyelerinin azaldığı ve aynı şekilde MWM testinde hayvanlarda öğrenme ve hafıza davranışlarında bozulma olduğu bildirilmiştir (35). Dolayısıyla CaMKII, nörotransmitter iletiminde ve sinaptik plastisitenin düzenlenmesinde önemli rol oynar ve çalışmalar azalmasının bilişsel bozuklukla ilişkili olduğunu göstermiştir (33). Yapılan çalışmalar serebral hipoperfüzyonda BDNF, CREB, NMDA reseptörü ve CaMKII düzeylerinin azaldığını ve sonunda öğrenme ve hafıza fonksiyonunun bozulduğunu bildirmişlerdir (7,102). Alzheimer modelinde hem epleronon hem de spironolakton uygulamasının hipokampus ve PFC dokularında BDNF düzeylerini artırdığı, öğrenme ve hafıza fonksiyonunun iyileştirilmesine katkı sağladığı bildirilmiştir (49). Travmatik beyin hasarından sonra düşük doz kortikosteron uygulaması BDNF ve CREB seviyelerini artırırken spironolakton uygulaması bu artışı durduğu bildirilmiştir (189). Bir çalışmada kortikosteron kaynaklı LTP'deki zayıflamanın spironolakton varlığında bloke edildiği

ve hatta fosforile edilmiş CaMKII'de kortikosteron kaynaklı azalma yine spironolakton varlığında arttığı bildirilmiştir (52). Çalışmamızda gruplar arasında BDNF düzeylerinde anlamlı bir fark bulunmazken 50mg/kg dozunda spironolakton uygulamasının hipokampal CREB düzeyini KSH grubuna göre anlamlı olarak artırdığı bulunmuştur. Ayrıca KSH hipokampal CaMKII düzeyinde azalmaya neden olurken 50mg/kg spironolakton uygulamasının KSH grubuna kıyasla anlamlı olarak artırmıştır. CREB, yalnızca BDNF ile değil; glutamat, dopamin, serotonin, IGF-1, östrojen gibi çeşitli nörotransmitterler, büyüme faktörleri ve hormonlarla da aktive olur. Bu ligandlar genellikle cAMP/PKA, Ca^{2+} /CaMKII, PI3K/Akt ve MAPK/ERK yolları üzerinden CREB'in Ser133 fosforilasyonunu sağlayarak transkripsiyonel etkinliğini başlatır (106). Yapılan korelasyon analizinde hipokampus CREB düzeyi ile probe trail testi hedef kadranda geçirilen süre, beyin dokusu GSH düzeyi arasında pozitif ve anlamlı korelasyon görüldü. Ayrıca CAMKII düzeyleri ile Morris su labirenti 5. gün platformu bulma süresi, beyin dokusu MDA düzeyi arasında anlamlı ve negatif korelasyon bulunurken, probe trail testi hedef kadranda geçirilen süre, beyin dokusu katalaz aktivitesi düzeyi, hipokampus Nrf2 düzeyi, hipokampus CREB düzeyi arasında pozitif anlamlı korelasyon bulunmuştur. Çalışmamızdan elde ettiğimiz bu bulgular spironolaktonun 50mg/kg dozunun CREB ve CaMKII düzeylerinin artırarak sinaptik fonksiyonların sürdürülmesine katkıda bulunduğunu ve bu durumun bilişsel fonksiyonlardaki iyileşmeyle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Glutamat beyinde en çok kullanılan eksitatör nörotransmitter maddedir ve aşırı birikimi nörotoksiseteye neden olmaktadır. Astrositler, özellikle VaD'deki glutamaterjik sinyal düzenlemesindeki çeşitli ve önemli rolleri nedeniyle ilgi odağı haline gelmiştir (37). Astrositlerin düşük ekstraselüler glutamat seviyelerinin korunmasında ve beyinde glutamatın ortadan kaldırılmasında ve geri dönüştürülmesinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir (38). Astrositik GLT-1 ve GLAST, beyindeki ekstraselüler glutamat seviyelerinin birincil denetleyicileridir (39). GLT-1 ve/veya GLAST'ın farmakolojik blokerleri ekstraselüler glutamat seviyelerini yükselterek nöronal ölüme neden olduğu bildirilmektedir (40). Fakat KSH oluşturulan hayvanların beyin dokusunda kontrol grubuna kıyasla oksidatif hasar, proinflatuar sitokin düzeyleri ve GFAP ekspresyonları artarken GLT-1 ve GLAST düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmadığı bildirilmiştir (8). Benzer şekilde postmortem bir çalışmada ise VaD, AH ve kontrol grubu kişilerin Brodmanın 9 ve 20/21 nolu alanlarından alınan örneklerde VGLUT1 arasında anlamlı farklar bulunurken GLT-1 (EAAT2) düzeyleri arasında

anlamalı bir fark bulunmadığı bildirilmiştir (190). Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgulara göre KSH grubu hayvanlarında GLT-1 seviyesi kontrol grubu hayvanlarına kıyasla artarken KSH+50SPI grubunda KSH grubuna kıyasla azalmıştır. Bu bulgunun KSH grubu hayvanlarında artan glutamat salınımına bağlı olarak kompensatuvar bir mekanizma aracılığıyla GLT-1 düzeyinin arttığını, spironolaktonun ise glutamat salınımını azalttığı için GLT-1 düzeylerini kontrol grubuna benzer düzeylerde tuttuğunu düşünmekteyiz. Çünkü sinaptik aralıkta glutamat birikimi olmadığı durumda, GLT-1 ubiquitinasyona uğrar, yıkılır ve dolayısıyla ekspresyonu azalır. Sinaptik boşlukta glutamat biriktiğinde ise, GLT-1 ekspresyonu artar (39). Öyle ki Neiva ve arkadaşlarının (2020) hipokampal sinir terminallerinden glutamat salınımı etkileyen faktörleri değerlendirdikleri bir çalışmada, metilprednizolon ile artan glutamat salınımının spironolakton varlığında azaldığı bildirilmiştir (191). Beyinde, mineralokortikoid reseptörleri yalnızca aldosteron tarafından aktive edilmez, aynı zamanda glukokortikoidler de bu reseptörlere çok yüksek bir afiniteyle bağlanır. Beyindeki glukokortikoid konsantrasyonu, aldosterondan yaklaşık 100 kat daha yüksektir ve glukokortikoidlerin metabolizmasından sorumlu olan 11 β -hidroksisteroid dehidrogenaz 2 nucleus tractus solitarii hariç beyinde neredeyse yoktur (186,192). Glukokortikoidlerin mineralokortikoid reseptörlerine afinitesi glukokortikoid reseptörlerine olan afinitesinden 10 kat daha fazladır (49). KSH glutamat taşıma ve temizlemede bozulmaya yol açarken (192); eş zamanlı stres/kortikosteron artışı, glutamat salınımını presinaptik yollardan artırarak birikimi daha da şiddetlendirebilir (191). Spironolakton ile MR'lerin blokajı kortikosteron kaynaklı glutamat salınımını azaltmış olabileceğini düşünmekteyiz. Fakat çalışmamızda hipokampal glutamat ve kortikosteron düzeylerine bakılmamıştır. Bir diğer önemli konu ise astroglial aktivitenin değerlendirilmemesidir. Literatürde VaD'ın hem deneysel hem de klinik çalışmalarında GLT-1 düzey ile ilişkisini inceleyen çalışma çok sınırlıdır. Çalışmamız spironolaktonun GLT-1 üzerine etkilerini araştıran literatürdeki ilk çalışma olmasıyla birlikte KSH varlığında spironolaktonun glutamaterjik sistem üzerindeki etkilerini daha doğru değerlendirebilmek için hipokampal glutamat düzeylerini ve astroglial aktivitenin değerlendirildiği daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Merkezi kolinerjik nöronlar, çoğunlukla hipokampus, striatum ve korteks gibi serebral hipoperfüzyona duyarlı bölgelerde dağılmıştır (36). VaD hastalarının beyin omurilik sıvısındaki ACh konsantrasyonunun kontrollerden önemli ölçüde daha düşük olduğu ve demans ölçeği puanlarıyla önemli bir pozitif korelasyon gösterdiği

bildirilmiştir (114). Kolinerjik nörotransmitter eksikliği bilişsel bozukluğa yol açabileceğinden, aşırı asetilkolin hidrolizinin inhibisyonu bilişselliği iyileştirmeye yardımcı olabilir. Bu nedenle, kolinesteraz inhibitörleri hastalığın ilerlemesini yavaşlatmak için kullanılmaktadır (193). ACh, AChE tarafından hızla ortamdaki uzaklaştırıldığından, doğrudan tespiti oldukça zordur. Dolayısıyla çoğu çalışma, kolinerjik sistemin hasarının ve onarımının, ChAT ve AChE'nin ekspresyonu ve aktivitesinin saptanmasıyla dolaylı olarak değerlendirilebileceğini göstermiştir (9,194). AH'nin deneysel modelinde hipokampal AChE düzeylerinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (70). Mevcut çalışmada hipokampal AChE aktivite düzeyine bakıldı ve KSH grubunda AChE aktivite düzeyinin arttığı görüldü. Daha önce spironolaktonun AChE aktivitesi üzerine etkilerini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Bu anlamda bu çalışma spironolakton ve AChE arasındaki ilişkiyi inceleyen ilk çalışmadır. Spironolaktonun 25mg/kg dozu AChE aktivite düzeyini etkilemezken, 50mg/kg dozu KSH grubuna kıyasla anlamlı olarak azaltmıştır. Bu da VaD'teki bilişsel düşüşü yavaşlatmak için klinikte yaygın olarak kullanılan kolinesteraz inhibitörleri göz önüne alındığında spironolaktonun umut verici bir yaklaşım olabileceğini düşündürmektedir. Yapılan korelasyon analizlerinde AChE ile GSH ve katalaz düzeyleri arasında negatif, MDA ve protein karbonilleri arasında ise pozitif korelasyon bulunmuştur.

Çalışmalar, hipokampusun, kodlama, kısa ve uzun vadeli konsolidasyon ve çıkarma mekanizmaları yoluyla hafızayı bütünleştiren epizodik hafızanın öğrenilmesinden ve çalışmasından sorumlu birincil bölge olduğunu göstermiştir (195). CA1 bölgesi bilginin entegrasyonu, kortekse gönderiminde ve plastisitede, CA3 ise otoasosyatif bellek ve eksik bilginin tamamlanmasında daha baskın rol oynar (196,197). Hipokampus CA1 bölgesi başta olmak üzere serebral iskemi ve hipoksiye karşı en hassas beyin fonksiyonel bölgesidir. Ayrıca yoğun mikrogial içeriğinden dolayı da iskemiye karşı oldukça duyarlıdır (42). Çalışmamızda histopatolojik olarak hipokampal hasar H&E boyama ile ortalama sağlam nöronların sayısı hesaplanarak belirlendi. Sonuçlar KSH'nin hipokampal hem CA1 hem de CA3 bölgelerinde sağlam nöron sayısında bir azalmaya neden olduğunu gösterdi. CA1 bölgesindeki nöron sayıları spironolakton uygulanan gruplarda anlamlı olarak yüksek bulundu. 50mg/kg dozundaki nöron sayısı KSH+SPI25 grubuna kıyasla da daha yüksekti. CA3 bölgesindeki intakt nöron sayısı KSH+SPI50 grubunda hem KSH hem de KSH+SPI25 grubuna göre daha yüksekti. Bu sonuçlar Spironolaktonun özellikle 50mg/kg dozunda uygulamasının hipokampal nöronal hasarın azaltılmasında etkili olduğunu gösteriyor. Özellikle yapılan

korelasyon analizlerinde hem CA1 hem de CA3 bölgelerindeki sağlam nöron sayıları ile Morris su labirenti testi 5. gün platformu bulma süresi arasında negatif, probe trail testi hedef kadranda geçirilen süre ile pozitif korelasyon ilişkisinin bulunması KSH'nun hipokampal nöron kayıplarına ve bilişsel işlevlerde bozulmaya neden olurken spironolaktonun bu durumu tersine çevirmede başarılı olduğu hem davranışsal hem de histopatolojik olarak desteklenmiştir. Dahası CA1 ve CA3 bölgelerindeki sağlam nöron sayıları ile MDA, protein karbonilleri, GLT-1, AChE arasında negatif katalaz, GSH, CaMKII arasında pozitif korelasyon bulunmuştur. KSH'de hücre ölümüne neden olan mekanizmalar düşünüldüğünde oksidatif hasar, sinaptik disfonksiyon, glutamaterjik ve kolinerjik bozulmalar ve bu fizyopatolojik mekanizmalar arasındaki komorbid ilişkiler çalışmamızdaki korele veriler ile desteklenmiştir. Spironolaktonun kısmen 25mg/kg özellikle 50mg/kg dozu KSH'da hipokampal hasara ve bilişsel düşüşe neden olan bu fizyopatolojik süreçleri azaltmada etkili olabileceği gösterilmiştir. Deneysel çalışmamızdan elde ettiğimiz bu veriler ışığında KSH altta yatan moleküler mekanizmaların aydınlatıldığı ve spironolaktonun etkilerinin daha kapsamlı değerlendirildiği hem deneysel hem de klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Overektomi sonrası oluşturulan KSH modelinde elde edilen bulgular, beyin dokusunda oksidatif strese artma ve hipokampal dokuda sinaptik proteinlerde azalma ve nörotransmisyon sisteminde bozulma olduğunu ortaya koymuş; bu değişikliklerin öğrenme ve bellek üzerinde olumsuz etkilerinin olduğu kanıtlamıştır. KSH sonrası beyin dokularında MDA ve protein karbonilleri düzeylerinin arttığı, GSH ve katalaz düzeylerinin ise azaldığı saptanmıştır. Hipokampal dokuda NRF2, CREB ve CaMKII düzeylerinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir; ayrıca CA1 ve CA3 bölgelerinde hücre kayıpları tespit edilmiştir.

Antioksidan etkiler gösteren ve çalışmamızda iki farklı dozda kullanılan mineralokortikoid reseptör antagonisti spironolaktonun, KSH sonrası gelişen öğrenme ve bellek bozuklukları üzerindeki etkileri daha önce araştırılmamıştır. Bu çalışmada, söz konusu etkilerin; antioksidan yanıt, NRF2, CaMKII, CREB gibi sinyal yolları ve kolinerjik sistemin güçlendirilmesi aracılığıyla gerçekleştiği gösterilmiştir.

Ayrıca bu çalışma, KSH ile öğrenme ve hafıza bozukluğu geliştirilmiş sıçan modellerinde, mineralokortikoid reseptör inhibisyonu sonrasında hipokampal AChE ve GLT-1 düzeylerini değerlendiren ilk araştırmadır. Kolinerjik sistemin önemli bir göstergesi olan ve bilişsel düşüşü hafifletmek amacıyla inhibitörleri yaygın olarak kullanılan AChE düzeylerinin KSH ile birlikte arttığı; bu artışın, nöronal hasar sonucu ortaya çıkan öğrenme ve bellek bozukluklarıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Spironolakton uygulamasının ise bu durumu tersine çevirerek KSH sonrası gelişen öğrenme ve bellek hasarını iyileştirmede etkili olduğu saptanmıştır. Ayrıca, KSH'nin hipokampüste IL-1 β , TNF- α , NLRP3 ve JAK2/STAT3 düzeylerinde artışa neden olduğu gözlenmiştir; ancak spironolaktonun her iki dozunun da bu nöroinflamatuvar yanıtı tamamen engellemediği belirlenmiştir. Bu çalışma literatürde spironolaktonun JAK2/STAT3 düzeylerine etkisini inceleyen ilk çalışmadır.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında spironolaktonun, KSH sonrası ortaya çıkan oksidatif, sinaptik, nörotransmisyonel ve nöronal hasar üzerinde koruyucu etkiler göstererek bilişsel fonksiyonları iyileştirdiği ortaya konmuştur. Bu bağlamda, vasküler demans tedavisinde potansiyel bir ajan olarak değerlendirilebileceği ve etkilerinin altında yatan mekanizmaların daha kapsamlı biçimde inceleneceği ileri çalışmalara ihtiyaç duyulduğu sonucuna varılmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Rajeev V, Chai YL, Poh L, Selvaraji S, Fann DY, Jo DG, De Silva TM, Drummond GR, Sobey CG, Arumugam TV, Chen CP, Lai MKP. Chronic cerebral hypoperfusion: a critical feature in unravelling the etiology of vascular cognitive impairment. *Acta Neuropathol Commun* 11(1):93, 2023.
2. Lana D, Ugolini F, Giovannini MG. An Overview on the Differential Interplay Among Neurons–Astrocytes–Microglia in CA1 and CA3 Hippocampus in Hypoxia/Ischemia. *Front Cell Neurosci* 11;14, 2020.
3. Ozacmak HS, Ozacmak VH, Turan I. Ethyl pyruvate prevents from chronic cerebral hypoperfusion via preserving cognitive function and decreasing oxidative stress, caspase 3 activation and IL-1beta level. *Bratisl Lek Listy* 119(8):469-475, 2018.
4. Won JS, Annamalai B, Choi S, Singh I, Singh AK. S-nitrosoglutathione reduces tau hyper-phosphorylation and provides neuroprotection in rat model of chronic cerebral hypoperfusion. *Brain Res* 22;1624:359-369, 2015.
5. Ozacmak VH, Sayan H, Cetin A, Akyildiz-Igdem A. AT1 receptor blocker candesartan-induced attenuation of brain injury of rats subjected to chronic cerebral hypoperfusion. *Neurochem Res* 32(8):1314-21, 2007.
6. Fan B, Lin J, Luo Q, Liao W, Hao C. Enriched Environment Inhibits Neurotoxic Reactive Astrocytes via JAK2-STAT3 to Promote Glutamatergic Synaptogenesis and Cognitive Improvement in Chronic Cerebral Hypoperfusion Rats. *Neurotox Res* 2;42(2):22, 2024.
7. Niu HM, Ma DL, Wang MY, Chen XP, Zhang L, Li YL, Zhang L, Li L. Epimedium flavonoids protect neurons and synapses in the brain via activating NRG1/ErbB4 and BDNF/Fyn signaling pathways in a chronic cerebral hypoperfusion rat model. *Brain Res Bull* 162:132-140, 2020.
8. Ma J, Chen J, Bo S, Lu X, Zhang J. Protective effect of carnosine after chronic cerebral hypoperfusion possibly through suppressing astrocyte activation. *Am J Transl Res* 7(12):2706-15, 2015.
9. Sun Y, Zhao Z, Li Q, Wang C, Ge X, Wang X, Wang G, Qin Y. DL-3-n-butylphthalide regulates cholinergic dysfunction in chronic cerebral hypoperfusion rats. *J Int Med Res* 48(7):300060520936177, 2020.

10. Kimura S, Iwata M, Takase H, Lo EH, Arai K. Oxidative stress and chronic cerebral hypoperfusion: An overview from preclinical rodent models. *J Cereb Blood Flow Metab* 45(3):381-395, 2025.
11. Huque H, Eramudugolla R, Chidiac B, Ee N, Ehrenfeld L, Matthews FE, Peters R, Anstey KJ. Could Country-Level Factors Explain Sex Differences in Dementia Incidence and Prevalence? A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Alzheimers Dis* 91(4):1231-1241, 2023.
12. Mishra A, Wang Y, Yin F, Vitali F, Rodgers KE, Soto M, Mosconi L, Wang T, Brinton RD. A tale of two systems: Lessons learned from female mid-life aging with implications for Alzheimer's prevention & treatment. *Ageing Res Rev* 74:101542, 2022.
13. Mosconi L, Rahman A, Diaz I, Wu X, Scheyer O, Hristov HW, Vallabhajosula S, Isaacson RS, de Leon MJ, Brinton RD. Increased Alzheimer's risk during the menopause transition: A 3-year longitudinal brain imaging study. *PLoS One* 13(12):e0207885, 2018.
14. Abzhandadze T, Hoang MT, Raaschou P, Norgren J, Mo M, Molnar C, Xu H, Kananen L, Åkerman M, Religa D, Eriksdotter M, Garcia-Ptacek S. Temporal trends in sex differences in dementia care-results from the Swedish registry for cognitive/dementia disorders, SveDem. *Sci Rep* 15(1):18890, 2025.
15. Xu C, Dai Y, Bai J, Ren B, Xu J, Gao F, Wang L, Zhang W, Wang R. 17 β -oestradiol alleviates endoplasmic reticulum stress injury induced by chronic cerebral hypoperfusion through the Haemoglobin/HIF 1 α signalling pathway in ovariectomized rats. *Neurochem Int* 148:105119, 2021.
16. Ozacmak VH, Sayan-Ozacmak H, Barut F. Chronic treatment with resveratrol, a natural polyphenol found in grapes, alleviates oxidative stress and apoptotic cell death in ovariectomized female rats subjected to chronic cerebral hypoperfusion. *Nutr Neurosci* 19(4):176-86, 2016.
17. Luca M, Luca A, Calandra C. The Role of Oxidative Damage in the Pathogenesis and Progression of Alzheimer's Disease and Vascular Dementia. *Oxid Med Cell Longev* 2015:504678, 2015.
18. Salim S. Oxidative Stress and the Central Nervous System. *J Pharmacol Exp Ther* 360(1):201-205, 2017.

19. Novoa C, Salazar P, Cisternas P, Gherardelli C, Vera-Salazar R, Zolezzi JM, Inestrosa NC. Inflammation context in Alzheimer's disease, a relationship intricate to define. *Biol Res* 55(1):39, 2017.
20. Liu LL, Liu X, Zhao S, Li Z, Liu JX, Ma DY, Wang XL. Necroptosis of hippocampal neurons in paclitaxel chemotherapy-induced cognitive impairment mediates microglial activation via TLR4/MyD88 signaling pathway. *Open Med (Wars)* 20(1):20251182, 2025.
21. Chen XW, Zhou SF. Inflammation, cytokines, the IL-17/IL-6/STAT3/NF-kappaB axis, and tumorigenesis. *Drug Des Devel Ther* 9:2941-6, 2015.
22. Oike T, Kanagawa H, Sato Y, Kobayashi T, Nakatsukasa H, Miyamoto K, et al. IL-6, IL-17 and Stat3 are required for auto-inflammatory syndrome development in mouse. *Sci Rep* 8(1):15783, 2018.
23. Zhu H, Jian Z, Zhong Y, Ye Y, Zhang Y, Hu X, Pu B, Gu L, Xiong X. Janus Kinase Inhibition Ameliorates Ischemic Stroke Injury and Neuroinflammation Through Reducing NLRP3 Inflammasome Activation via JAK2/STAT3 Pathway Inhibition. *Front Immunol* 12:714943, 2021.
24. Matsuyama H, Shindo A, Shimada T, Yata K, Wakita H, Takahashi R, Tomimoto H. Chronic cerebral hypoperfusion activates AIM2 and NLRP3 inflammasome. *Brain Res* 1736:146779, 2020.
25. O'Shea JJ, Schwartz DM, Villarino AV, Gadina M, McInnes IB, Laurence A. The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. *Annu Rev Med* 66:311-28, 2015.
26. Xi Y, Hou X, Huang Y, Zhou Y, Chen Y, Wang Y, Cheng H. Loganin attenuates the inflammation, oxidative stress, and apoptosis through the JAK2/STAT3 pathway in cerebral ischemia-reperfusion injury. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 34(1):108114, 2025.
27. Kennedy MB. Synaptic Signaling in Learning and Memory. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8(2):a016824, 2013.
28. Sheppard PAS, Choleris E, Galea LAM. Structural plasticity of the hippocampus in response to estrogens in female rodents. *Mol Brain* 12(1):22, 2019.
29. Foy MR, Baudry M, Diaz Brinton R, Thompson RF. Estrogen and hippocampal plasticity in rodent models. *J Alzheimers Dis* 15(4):589-603, 2008.
30. Leal G, Bramham CR, Duarte CB. BDNF and Hippocampal Synaptic Plasticity. *Vitam Horm* 104:153-195, 2017.

31. Schirò G, Iacono S, Ragonese P, Aridon P, Salemi G, Balistreri CR. A Brief Overview on BDNF-Trk Pathway in the Nervous System: A Potential Biomarker or Possible Target in Treatment of Multiple Sclerosis? *Front Neurol* 13:917527, 2022.
32. Yong J, Song J. CaMKII activity and metabolic imbalance-related neurological diseases: Focus on vascular dysfunction, synaptic plasticity, amyloid beta accumulation, and lipid metabolism. *Biomed Pharmacother* 175:116688, 2024.
33. Rumian NL, Freund RK, Dell'Acqua ML, Coultrap SJ, Bayer KU. Decreased nitrosylation of CaMKII causes aging-associated impairments in memory and synaptic plasticity in mice. *Sci Signal* 16(795):eade5892, 2023.
34. Atsumi Y, Iwata R, Kimura H, Vanderhaeghen P, Yamamoto N, Sugo N. Repetitive CREB-DNA interactions at gene loci predetermined by CBP induce activity-dependent gene expression in human cortical neurons. *Cell Rep* 43(1):113576, 2024.
35. Min D, Guo F, Zhu S, Xu X, Mao X, Cao Y, Lv X, Gao Q, Wang L, Chen T, Shaw C, Hao L, Cai J. The alterations of Ca²⁺/calmodulin/CaMKII/CaV1.2 signaling in experimental models of Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurosci Lett* 538:60-5, 2013.
36. Song J. BDNF Signaling in Vascular Dementia and Its Effects on Cerebrovascular Dysfunction, Synaptic Plasticity, and Cholinergic System Abnormality. *J Lipid Atheroscler* 13(2):122-138, 2024.
37. Zhou Y, Danbolt NC. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *J Neural Transm (Vienna)* 121(8):799-817, 2014.
38. Price BR, Norris CM, Sompol P, Wilcock DM. An emerging role of astrocytes in vascular contributions to cognitive impairment and dementia. *J Neurochem* 144(5):644-650, 2018.
39. Pajarillo E, Rizor A, Lee J, Aschner M, Lee E. The role of astrocytic glutamate transporters GLT-1 and GLAST in neurological disorders: Potential targets for neurotherapeutics. *Neuropharmacology* 161:107559, 2019.
40. Yang HJ, Hempel BJ, Bi GH, He Y, Zhang HY, Gardner EL, Xi ZX. Elevation of Extracellular Glutamate by Blockade of Astrocyte Glutamate Transporters Inhibits Cocaine Reinforcement in Rats via a NMDA-GluN2B Receptor Mechanism. *J Neurosci* 42(11):2327-2343, 2022.

41. Wang J, Zhang HY, Tang XC. Cholinergic deficiency involved in vascular dementia: possible mechanism and strategy of treatment. *Acta Pharmacol Sin* 30(7):879-88, 2009.
42. Nairuz T, Heo JC, Lee JH. Differential Glial Response and Neurodegenerative Patterns in CA1, CA3, and DG Hippocampal Regions of 5XFAD Mice. *Int J Mol Sci* 25(22):12156, 2024.
43. Gorini S, Kim SK, Infante M, Mammi C, La Vignera S, Fabbri A, Jaffe IZ, Caprio M. Role of Aldosterone and Mineralocorticoid Receptor in Cardiovascular Aging. *Front Endocrinol (Lausanne)* 10:584, 2019.
44. Paul SN, Wingenfeld K, Otte C, Meijer OC. Brain mineralocorticoid receptor in health and disease: From molecular signalling to cognitive and emotional function. *Br J Pharmacol* 179(13):3205-3219, 2022.
45. Carone L, Oxberry SG, Twycross R, Charlesworth S, Mihalyo M, Wilcock A. Spironolactone. *J Pain Symptom Manage* 53(2):288-292, 2017.
46. Wilkinson-Berka JL, Tan G, Jaworski K, Harbig J, Miller AG. Identification of a retinal aldosterone system and the protective effects of mineralocorticoid receptor antagonism on retinal vascular pathology. *Circ Res* 120(8):e31, 2017.
47. Awadalla A, Hamam ET, El-Senduny FF, Omar NM, Mahdi MR, Barakat N, Ammar OA, Hussein AM, Shokeir AA, Khirallah SM. Zinc oxide nanoparticles and spironolactone-enhanced Nrf2/HO-1 pathway and inhibited Wnt/beta-catenin pathway in adenine-induced nephrotoxicity in rats. *Redox Rep* 27(1):249-258, 2022.
48. Queisser N, Happ K, Link S, Jahn D, Zimnol A, Geier A, Schupp N. Aldosterone induces fibrosis, oxidative stress and DNA damage in livers of male rats independent of blood pressure changes. *Toxicol Appl Pharmacol* 280(3):399-407, 2014.
49. Chen L, Shi R, She X, Gu C, Chong L, Zhang L, Li R. Mineralocorticoid receptor antagonist-mediated cognitive improvement in a mouse model of Alzheimer's type: possible involvement of BDNF-H(2) S-Nrf2 signaling. *Fundam Clin Pharmacol* 34(6):697-707, 2020.
50. Pastena P, Campagnoli G, Rahmani AR, Kalogeropoulos AP. Mineralocorticoid Receptor Antagonists and Cognitive Outcomes in Cardiovascular Disease and Beyond: A Systematic Review. *J Pers Med* 15(2):57, 2025.

51. Sethi R, Vishwakarma P, Pradhan A. Evidence for Aldosterone Antagonism in Heart Failure. *Card Fail Rev* 10:e15, 2024.
52. Suzuki M, Sato Y, Tamura K, Tamano H, Takeda A. Rapid Intracellular Zn(2+) Dysregulation via Membrane Corticosteroid Receptor Activation Affects In Vivo CA1 LTP. *Mol Neurobiol* 56(2):1356-1365, 2019.
53. Yagi S, Akaike M, Aihara K, Iwase T, Yoshida S, Sumitomo-Ueda Y, Ikeda Y, Ishikawa K, Matsumoto T, Sata M. High plasma aldosterone concentration is a novel risk factor of cognitive impairment in patients with hypertension. *Hypertens Res* 34(1):74-8, 2011.
54. Pichardo-Rojas D, Pichardo-Rojas PS, Cornejo-Bravo JM, Serrano-Medina A. Memantine as a neuroprotective agent in ischemic stroke: Preclinical and clinical analysis. *Front Neurosci* 17:1096372, 2023.
55. Gannon OJ, Naik JS, Riccio D, Mansour FM, Abi-Ghanem C, Salinero AE, Kelly RD, Brooks HL, Zuloaga KL. Menopause causes metabolic and cognitive impairments in a chronic cerebral hypoperfusion model of vascular contributions to cognitive impairment and dementia. *Biol Sex Differ* 14(1):34, 2023.
56. Gasiorowska A, Wydrych M, Drapich P, Zadrozny M, Steczkowska M, Niewiadomski W, Niewiadomska G. The Biology and Pathobiology of Glutamatergic, Cholinergic, and Dopaminergic Signaling in the Aging Brain. *Front Aging Neurosci* 13:654931, 2021.
57. Jia L, Du Y, Chu L, et al. Prevalence, risk factors, and management of dementia and mild cognitive impairment in adults aged 60 years or older in China: a cross-sectional study. *Lancet Public Health* 5(12):e661-e671, 2020.
58. van der Flier WM, Skoog I, Schneider JA, Pantoni L, Mok V, Chen CLH, Scheltens P. Vascular cognitive impairment. *Nat Rev Dis Primers* 4:18003, 2018.
59. Nichols E, Steinmetz JD, Vollset SE, Fukutaki K, Chalek J, Abd-Allah F, et al. Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Public Health* 7(2):e105–25, 2019.
60. Kuang H, Zhou ZF, Zhu YG, Wan ZK, Yang MW, Hong FF, et al. Pharmacological Treatment of Vascular Dementia: A Molecular Mechanism Perspective. *Aging Dis* 12(1):308, 2021.
61. Kalara RN. The pathology and pathophysiology of vascular dementia. *Neuropharmacology* 134(Pt B):226-239, 2018.

62. Lee JM, Lee JH, Song MK, Kim YJ. NXP031 Improves Cognitive Impairment in a Chronic Cerebral Hypoperfusion-Induced Vascular Dementia Rat Model through Nrf2 Signaling. *Int J Mol Sci* 22(12):6285, 2021.
63. Duncombe J, Kitamura A, Hase Y, Ihara M, Kalaria RN, Horsburgh K. Chronic cerebral hypoperfusion: a key mechanism leading to vascular cognitive impairment and dementia. Closing the translational gap between rodent models and human vascular cognitive impairment and dementia. *Clin Sci* 131(19):2451–68, 2017.
64. Yan N, Xu Z, Qu C, Zhang J. Dimethyl fumarate improves cognitive deficits in chronic cerebral hypoperfusion rats by alleviating inflammation, oxidative stress, and ferroptosis via NRF2/ARE/NF- κ B signal pathway. *Int Immunopharmacol* 98:107844, 2021.
65. Kramarow EA. Diagnosed Dementia in Adults Age 65 and Older:United States, 2022. *Natl Health Stat Report* (203):1-9, 2024.
66. Tuo Q zhang, Zou J jun, Lei P. Rodent Models of Vascular Cognitive Impairment. *Journal of Molecular Neuroscience* 71(5):1–12, 2021.
67. Ciacciarelli A, Sette G, Giubilei F, Orzi F. Chronic cerebral hypoperfusion: An undefined, relevant entity. *Journal of Clinical Neuroscience* 73:8–12, 2020.
68. Yu W, Li Y, Hu J, Wu J, Huang Y. A Study on the Pathogenesis of Vascular Cognitive Impairment and Dementia: The Chronic Cerebral Hypoperfusion Hypothesis. *J Clin Med* 11(16):4742, 2022.
69. Tukacs V, Mittli D, Györffy BA, Hunyady-Gulyás É, Hlatky D, Tóth V, Ravasz L, Medzihradzsky FK, Nyitrai G, Czurkó A, Juhász G, Kardos J, Kékesi KA. Chronic stepwise cerebral hypoperfusion differentially induces synaptic proteome changes in the frontal cortex, occipital cortex, and hippocampus in rats. *Sci Rep* 10(1):15999, 2020.
70. Du Q, Zhu X, Si J. Angelica polysaccharide ameliorates memory impairment in Alzheimer's disease rat through activating BDNF/TrkB/CREB pathway. *Exp Biol Med (Maywood)* 245(1):1-10, 2020.
71. Du SQ, Wang XR, Xiao LY, Tu JF, Zhu W, He T, et al. Molecular Mechanisms of Vascular Dementia: What Can Be Learned from Animal Models of Chronic Cerebral Hypoperfusion? *Mol Neurobiol* 54(5):3670–82, 2017.
72. Latif F, Imran M. Antioxidants - a combat against oxidative stress in dementia. *Ann Med Surg (Lond)* 82:104632, 2022.

73. Dash UC, Bhol NK, Swain SK, Samal RR, Nayak PK, Raina V, Panda SK, Kerry RG, Duttaroy AK, Jena AB. Oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of neurological disorders: Mechanisms and implications. *Acta Pharm Sin B* 15(1):15-34, 2025.
74. Adav SS, Sze SK. Hypoxia-Induced Degenerative Protein Modifications Associated with Aging and Age-Associated Disorders. *Aging Dis* 11(2):341, 2020.
75. Zhang L, Zhou Y, Yang Z, Jiang L, Yan X, Zhu W, Shen Y, Wang B, Li J, Song J. Lipid droplets in central nervous system and functional profiles of brain cells containing lipid droplets in various diseases. *J Neuroinflammation* 22(1):7, 2025.
76. Olufunmilayo EO, Gerke-Duncan MB, Holsinger RMD. Oxidative Stress and Antioxidants in Neurodegenerative Disorders. *Antioxidants (Basel)* 12(2):517, 2023.
77. Pisoschi AM, Pop A, Iordache F, Stanca L, Predoi G, Serban AI. Oxidative stress mitigation by antioxidants - An overview on their chemistry and influences on health status. *Eur J Med Chem* 209:112891, 2021.
78. Harris JJ, Attwell D. The energetics of CNS white matter. *J Neurosci* 32(1):356-71, 2012.
79. Pirmoradi Z, Yadegari M, Moradi A, Khojasteh F, Zare Mehrjerdi F. Effect of berberine chloride on caspase-3 dependent apoptosis and antioxidant capacity in the hippocampus of the chronic cerebral hypoperfusion rat model. *Iran J Basic Med Sci* 22(2):154-159, 2019.
80. Chen H, Yoshioka H, Kim GS, Jung JE, Okami N, Sakata H, Maier CM, Narasimhan P, Goeders CE, Chan PH. Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. *Antioxid Redox Signal* 14(8):1505-17, 2011.
81. Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine* 54(4):287-293, 2018.
82. Song X, Long D. Nrf2 and Ferroptosis: A New Research Direction for Neurodegenerative Diseases. *Front Neurosci* 14:267, 2020.
83. Yuan L, Wang Y, Li N, Yang X, Sun X, Tian H, Zhang Y. Mechanism of Action and Therapeutic Implications of Nrf2/HO-1 in Inflammatory Bowel Disease. *Antioxidants (Basel)* 13(8):1012, 2024.

84. George M, Tharakan M, Culberson J, Reddy AP, Reddy PH. Role of Nrf2 in aging, Alzheimer's and other neurodegenerative diseases. *Ageing Res Rev.* 2022 Dec;82:101756.
85. Wolters FJ, Ikram MA. Epidemiology of Vascular Dementia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 39(8):1542-1549, 2019.
86. Branca C, Ferreira E, Nguyen TV, Doyle K, Caccamo A, Oddo S. Genetic reduction of Nrf2 exacerbates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 26(24):4823-4835, 2017.
87. Zhang W, Xiao D, Mao Q, Xia H. Role of neuroinflammation in neurodegeneration development. *Signal Transduct Target Ther* 8(1):267, 2023.
88. Lee E, Chang Y. Modulating Neuroinflammation as a Prospective Therapeutic Target in Alzheimer's Disease. *Cells* 14(3):168, 2025.
89. Al-Qahtani AA, Alhamlan FS, Al-Qahtani AA. Pro-Inflammatory and Anti-Inflammatory Interleukins in Infectious Diseases: A Comprehensive Review. *Trop Med Infect Dis* 9(1):13, 2024.
90. Zhang L, Liu J. Spironolactone protects against hypertension-induced renal fibrosis by promoting autophagy and inhibiting the NLRP3 inflammasome. *J Hypertens* 43(7):1169-1181, 2025.
91. Chang SR, Liu JG, Li H, Liu MX, Shi DD, Zhou LJ. Pharmaceutical and pharmacological studies of Shen Ma Yi Zhi granule for prevention of vascular dementia: A review. *Front Neurosci* 16:1044572, 2022.
92. Khoshnam SE, Sarkaki A, Rashno M, Farbood Y. Memory deficits and hippocampal inflammation in cerebral hypoperfusion and reperfusion in male rats: Neuroprotective role of vanillic acid. *Life Sci* 211:126-132, 2018.
93. Possemato E, La Barbera L, Nobili A, Krashia P, D'Amelio M. The role of dopamine in NLRP3 inflammasome inhibition: Implications for neurodegenerative diseases. *Ageing Res Rev* 87:101907, 2023.
94. Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int J Mol Sci* 20(13):3328, 2019.
95. He W, Hu Z, Zhong Y, Wu C, Li J. The Potential of NLRP3 Inflammasome as a Therapeutic Target in Neurological Diseases. *Mol Neurobiol* 60(5):2520-2538, 2023.

96. Chen Z, Zhou H, Huang X, Wang S, Ouyang X, Wang Y, Cao Q, Yang L, Tao Y, Lai H. Pirfenidone attenuates cardiac hypertrophy against isoproterenol by inhibiting activation of the janus tyrosine kinase-2/signal transducer and activator of transcription 3 (JAK-2/STAT3) signaling pathway. *Bioengineered* 13(5):12772-12782, 2022.
97. Panda SP, Kesharwani A, Datta S, Prasanth DSNBK, Panda SK, Guru A. JAK2/STAT3 as a new potential target to manage neurodegenerative diseases: An interactive review. *Eur J Pharmacol* 970:176490, 2024.
98. Li L, Sun L, Qiu Y, Zhu W, Hu K, Mao J. Protective Effect of Stachydrine Against Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury by Reducing Inflammation and Apoptosis Through P65 and JAK2/STAT3 Signaling Pathway. *Front Pharmacol* 11:64, 2020.
99. Yao ZH, Yao XL, Zhang SF, Hu JC, Zhang Y. Tripchlorolide May Improve Spatial Cognition Dysfunction and Synaptic Plasticity after Chronic Cerebral Hypoperfusion. *Neural Plast* 2019:2158285, 2019.
100. Cameron HA, Glover LR. Adult neurogenesis: beyond learning and memory. *Annu Rev Psychol* 66:53-81, 2015.
101. Liu HX, Zhang JJ, Zheng P, Zhang Y. Altered expression of MAP-2, GAP-43, and synaptophysin in the hippocampus of rats with chronic cerebral hypoperfusion correlates with cognitive impairment. *Brain Res Mol Brain Res* 139(1):169-77, 2005.
102. Lin Z, Sun M. Phytochemical regulation of CaMKII in Alzheimer's disease: A review of molecular mechanisms and therapeutic potential. *Pharmacol Res* 216:107790, 2025.
103. Zarneshan SN, Fakhri S, Khan H. Targeting Akt/CREB/BDNF signaling pathway by ginsenosides in neurodegenerative diseases: A mechanistic approach. *Pharmacol Res* 177:106099, 2022.
104. Ortega-Martínez S. A new perspective on the role of the CREB family of transcription factors in memory consolidation via adult hippocampal neurogenesis. *Front Mol Neurosci* 8:46, 2015.
105. Yamashima T. 'PUFA-GPR40-CREB signaling' hypothesis for the adult primate neurogenesis. *Prog Lipid Res* 51(3):221-31, 2012.
106. Naqvi S, Martin KJ, Arthur JS. CREB phosphorylation at Ser133 regulates transcription via distinct mechanisms downstream of cAMP and MAPK signalling. *Biochem J* 458(3):469-79, 2014.

107. Coultrap SJ, Vest RS, Ashpole NM, Hudmon A, Bayer KU. CaMKII in cerebral ischemia. *Acta Pharmacol Sin* 32(7):861-72, 2011.
108. 2-Hai J, Yu F, Lin Q, Su SH. The changes of signal transduction pathways in hippocampal regions and postsynaptic densities after chronic cerebral hypoperfusion in rats. *Brain Res* 1429:9-17, 2012.
109. Andersen J V., Markussen KH, Jakobsen E, Schousboe A, Waagepetersen HS, Rosenberg PA, Aldana BI. Glutamate metabolism and recycling at the excitatory synapse in health and neurodegeneration. *Neuropharmacology* 196:108719, 2021.
110. Wang R, Reddy PH. Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 57: 1041–1048, 2017.
111. Sears SM, Hewett SJ. Influence of glutamate and GABA transport on brain excitatory/inhibitory balance. *Experimental Biology and Medicine* 246: 1069–1083, 2021.
112. Soni N, Reddy BVK, Kumar P. GLT-1 transporter: An effective pharmacological target for various neurological disorders. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 127: 70–81, 2014.
113. Sheldon AL, Robinson MB. The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochemistry International* 51: 333–355, 2007.
114. Jia JP, Jia JM, Zhou WD, Xu M, Chu CB, Yan X, Sun YX. Differential acetylcholine and choline concentrations in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. *Chin Med J (Engl)* 117(8):1161-4, 2014.
115. Lamptey RNL, Chaulagain B, Trivedi R, Gothwal A, Layek B, Singh J. A Review of the Common Neurodegenerative Disorders: Current Therapeutic Approaches and the Potential Role of Nanotherapeutics. *Int J Mol Sci* 23(3):1851, 2022.
116. Woolf NJ, Butcher LL. Cholinergic systems mediate action from movement to higher consciousness. *Behavioural Brain Research* 221: 488–498, 2011.
117. Johnson DA, Zambon NJ, Gibbs RB. Selective lesion of cholinergic neurons in the medial septum by 192 IgG-saporin impairs learning in a delayed matching to position T-maze paradigm. *Brain Research* 943: 132–141, 2002.

118. H. Ferreira-Vieira T, M. Guimaraes I, R. Silva F, M. Ribeiro F. Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Current Neuropharmacology* 14: 101–115, 2016.
119. Zheng J, Zhu H, Zhao Z, Du M, Wang Z, Lan L, Zhang J (2023). Vesicular acetylcholine transporter in the basal forebrain improves cognitive impairment in chronic cerebral hypoperfusion rats by modulating theta oscillations in the hippocampus. *Neuroscience Letters* 807: 137281, 2023.
120. Nemy M, Dyrba M, Brosseron F, Buerger K, Dechent P, Dobisch L, Ewers M, Fliessbach K, Glanz W, Goerss D, et al.. Cholinergic white matter pathways along the Alzheimer's disease continuum. *Brain* 146: 2075–2088, 2023.
121. Chen C, Zheng Y, Wu T, Wu C, Cheng X. Oral administration of grape seed polyphenol extract restores memory deficits in chronic cerebral hypoperfusion rats. *Behavioural Pharmacology* 28: 207–213, 2017.
122. Rigsby CS, Ergul A, Portik Dobos V, Pollock DM, Dorrance AM. Effects of spironolactone on cerebral vessel structure in rats with sustained hypertension. *Am J Hypertens* 24(6):708-15, 2011.
123. Bartsch T, Wulff P. The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability. *Neuroscience* 309:1-16, 2015.
124. Kim TA, Syty MD, Wu K, Ge S. Adult hippocampal neurogenesis and its impairment in Alzheimer's disease. *Zool Res* 43(3):481-496, 2022.
125. Karat BG, Köhler S, Khan AR. Diffusion MRI of the Hippocampus. *J Neurosci* 44(23):e1705232024, 2024.
126. Oliva A, Fernandez-Ruiz A, Karaba LA. CA2 orchestrates hippocampal network dynamics. *Hippocampus* 33(3):241-251, 2023.
127. Knierim JJ. The hippocampus. *Curr Biol* 25(23):R1116-21, 2015.
128. Johnson AC. Hippocampal Vascular Supply and Its Role in Vascular Cognitive Impairment. *Stroke* 54(3):673-685, 2023.
129. Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, Landreth GE, Brosseron F, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 2015 Apr;14(4):388-405.
130. Choi SH, Tanzi RE. Adult neurogenesis in Alzheimer's disease. *Hippocampus* 33(4):307-321, 2023.

131. Ramli NZ, Yahaya MF, Mohd Fahami NA, Abdul Manan H, Singh M, Damanhuri HA. Brain volumetric changes in menopausal women and its association with cognitive function: a structured review. *Front Aging Neurosci* 15:1158001, 2023.
132. Tian Y, Xie Y, Guo Z, Feng P, You Y, Yu Q. 17beta-oestradiol inhibits ferroptosis in the hippocampus by upregulating DHODH and further improves memory decline after ovariectomy. *Redox Biol* 62:102708, 2023.
133. Brown A, Gervais NJ, Rieck J, Almey A, Gravelins L, Reuben R, Karkaby L, Rajah MN, Grady C, Einstein G. Women's Brain Health: Midlife Ovarian Removal Affects Associative Memory. *Mol Neurobiol* 60(11):6145-6159, 2023.
134. Burke SN, Barnes CA. Senescent synapses and hippocampal circuit Dynamics. *Trends Neurosci* 33(3):153-61, 2010.
135. Zhou J, Peng X, Mei S. Autophagy in Ovarian Follicular Development and Atresia. *Int J Biol Sci* 15(4):726-737, 2019.
136. Burger HG, Hale GE, Dennerstein L, Robertson DM. Cycle and hormone changes during perimenopause the key role of ovarian functions. *Menopause* 15: 603–612, 2008.
137. Santoro N, Crawford SL, El Khoudary SR, Allshouse AA, Burnett-Bowie SA, et al. Menstrual Cycle Hormone Changes in Women Traversing Menopause: Study of Women's Health Across the Nation. *J Clin Endocrinol Metab* 102(7):2218-2229, 2017.
138. Minkin MJ. Menopause: Hormones, Lifestyle, and Optimizing Aging. *Obstet Gynecol Clin North Am* 46(3):501-514, 2019.
139. Gold EB. The timing of the age at which natural menopause occurs. *Obstet Gynecol Clin North Am* 38(3):425-40, 2011.
140. Santoro N, Roeca C, Peters BA, Neal-Perry G. The Menopause Transition: Signs, Symptoms, and Management Options. *J Clin Endocrinol Metab* 106(1):1-15, 2021.
141. O'Neill S, Eden J. The pathophysiology of menopausal symptoms. *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine* 22: 63–69, 2012.
142. Talaulikar V. Menopause transition: Physiology and symptoms. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 81:3-7. 210, 2022.

143. Rance NE. Menopause and the human hypothalamus: evidence for the role of kisspeptin/neurokinin B neurons in the regulation of estrogen negative feedback. *Peptides* 30(1):111-22, 2009.
144. Gatenby C, Simpson P. Menopause: Physiology, definitions, and symptoms. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 38(1):101855, 2024.
145. Boyle CP, Raji CA, Erickson KI, Lopez OL, Becker JT, Gach HM, Kuller LH, Longstreth W Jr, Carmichael OT, Riedel BC, Thompson PM. Estrogen, brain structure, and cognition in postmenopausal women. *Hum Brain Mapp* 42(1):24-35, 2021.
146. Russell JK, Jones CK, Newhouse PA. The Role of Estrogen in Brain and Cognitive Aging. *Neurotherapeutics* 16(3):649-665, 2019.
147. Fuentes N, Silveyra P. Estrogen receptor signaling mechanisms. *Adv Protein Chem Struct Biol* 116:135-170, 2019.
148. Maioli S, Leander K, Nilsson P, Nalvarte I. Estrogen receptors and the aging brain. *Essays Biochem* 65(6):913-925, 2021.
149. Phillips GB, Jing T, Heymsfield SB. Does insulin resistance, visceral adiposity, or a sex hormone alteration underlie the metabolic syndrome? Studies in women. *Metab Clin Exp* 57(6):838–844, 2008.
150. Lohner V, Pehlivan G, Sanroma G, Miloschewski A, Schirmer MD, Stöcker T, et al. Relation between sex, menopause, and white matter hyperintensities: the Rhineland study. *Neurology* 99(9):e935–e943, 2022.
151. Otsuka H, Abe M, Kobayashi H. The Effect of Aldosterone on Cardioresenal and Metabolic Systems. *International Journal of Molecular Sciences* 24: 537, 2023.
152. Briet M., Schiffrin E.L. Vascular actions of aldosterone. *J. Vasc. Res.* 2013;50:89–99.
153. Ferreira N.S., Tostes R.C., Paradis P., Schiffrin E.L. Aldosterone, inflammation, immune system, and hypertension. *Am. J. Hypertens* 34:15–27, 2021.
154. Dinh QN, Young MJ, Evans MA, Drummond GR, Sobey CG, Chrissobolis S. Aldosterone-induced oxidative stress and inflammation in the brain are mediated by the endothelial cell mineralocorticoid receptor. *Brain Res* 1637:146-153, 2016.
155. Zhang ZH, Yu Y, Kang YM, Wei SG, Felder RB. Aldosterone acts centrally to increase brain renin-angiotensin system activity and oxidative stress in normal rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294(2):H1067-74, 2008.

156. Vassiliou AG, Athanasiou N, Vassiliadi DA, Jahaj E, Keskinidou C, Kotanidou A, Dimopoulou I. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor expression in critical illness: A narrative review. *World Journal of Critical Care Medicine* 10: 102–111, 2021.
157. Cole TJ, Young MJ. 30 Years Of The Mineralocorticoid Receptor: Mineralocorticoid receptor null mice: informing cell-type-specific roles. *Journal of Endocrinology* 234: T83–T92, 2017.
158. Lainscak M, Pelliccia F, Rosano G, Vitale C, Schiariti M, Greco C, Speziale G, Gaudio C. Safety profile of mineralocorticoid receptor antagonists: Spironolactone and eplerenone. *International Journal of Cardiology* 200:25–29, 2015.
159. Mehdipour M, Emamghoreishi M, Farrokhi MR, Amirinezhadfar E, Keshavarz M. The Effect of Spironolactone on beta-amyloid-Induced Memory Impairment in Male Rats: The Role of Microglial Inhibition. *Adv Pharm Bull* 12(3):623-631, 2022.
160. Stephan M, Schoeller J, Raabe FJ, Schmitt A, Hasan A, Falkai P, Jensen N, Rossner MJ. Spironolactone alleviates schizophrenia-related reversal learning in Tcf4 transgenic mice subjected to social defeat. *Schizophrenia (Heidelb)* 8(1):77, 2022.
161. Albernaz-Mariano KA, Demarchi Munhoz C. The infralimbic mineralocorticoid blockage prevents the stress-induced impairment of aversive memory extinction in rats. *Transl Psychiatry* 12(1):343, 2022.
162. Feng X, Chen L, Zhou R, Bao X, Mou H, Ye L, Yang P. Blocking the Mineralocorticoid Receptor Improves Cognitive Impairment after Anesthesia/Splenectomy in Rats. *Int J Med Sci* 18(2):387-397, 2021.
163. Zhou M, Kindt M, Joëls M, Krugers HJ. Blocking mineralocorticoid receptors prior to retrieval reduces contextual fear memory in mice. *PLoS One* 6(10):e26220.87, 2011.
164. Lin Z, Lu Y, Li S, Li Y, Li H, Li L, Wang L. Effect of eplerenone on cognitive impairment in spontaneously hypertensive rats. *Am J Transl Res* 14(6):3864-3878, 2022.
165. Rotenstein LS, Sheridan M, Garg R, Adler GK. Effect of mineralocorticoid receptor blockade on hippocampal-dependent memory in adults with obesity. *Obesity (Silver Spring)* 23(6):1136-42, 2015.

166. Oyamada N, Sone M, Miyashita K, Park K, Taura D, Inuzuka M, Sonoyama T, Tsujimoto H, Fukunaga Y, Tamura N, et al.. The Role of Mineralocorticoid Receptor Expression in Brain Remodeling after Cerebral Ischemia. *Endocrinology* 149: 3764–3777, 2008.
167. Brocca ME, Pietranera L, Meyer M, Lima A, Roig P, de Kloet ER, De Nicola AF. Mineralocorticoid receptor associates with pro-inflammatory bias in the hippocampus of spontaneously hypertensive rats. *J Neuroendocrinol* 29(7) 2017.
168. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54, 1976.
169. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall, R.J. Protein Measurement with the Folin-Phenol Reagent, *J Biol Chem*, 193:265-375, 1951.
170. Draper, H.H., Hadley, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation, *Methods Enzymol* 186:421-31, 1990.
171. Levine R.L., Williams J.A., Stadtman E.R., Shacter E. Carbonyl assay for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 233:346-57, 1994.
172. Goth, L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range, *Clin Chim Acta* 196: 143-152, 1991.
173. Aykac, G., et al. The effects of chronic ethanol injection on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats. *Toxicology* 36, 71–76, 1985.
174. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V. & Featherstone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7 (7), 88–95, 1961.
175. Patel SA, Frick KM, Newhouse PA, Astur RS. Estradiol effects on spatial memory in women. *Behav Brain Res* 417:113592, 2022.
176. Rigsby CS, Cannady WE, Dorrance AM. Aldosterone: good guy or bad guy in cerebrovascular disease? *Trends Endocrinol Metab* 16(9):401-6, 2005.
177. Kalaria RN. Neuropathological diagnosis of vascular cognitive impairment and vascular dementia with implications for Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 131(5):659-85, 2016.

178. Cannavo A, Bencivenga L, Liccardo D, Elia A, Marzano F, Gambino G, D'Amico ML, Perna C, Ferrara N, Rengo G, Paolocci N. Aldosterone and Mineralocorticoid Receptor System in Cardiovascular Physiology and Pathophysiology. *Oxid Med Cell Longev* 2018:1204598, 2018.
179. Brown JM. Adverse Effects of Aldosterone: Beyond Blood Pressure. *J Am Heart Assoc* 13(7):e030142, 2024.
180. Sun YE, Peng L, Sun X, Bo J, Yang D, Zheng Y, Liu C, Zhu B, Ma Z, Gu X. Intrathecal injection of spironolactone attenuates radicular pain by inhibition of spinal microglia activation in a rat model. *PLoS One* 7(6):e39897, 2012.
181. Pérez JC, Ramírez AC, González LT, Espinosa LE, Quintana MM, Galván GA, Chavira HZ, de la Garza FJ, Lemarroy CR, Garza NE, Rodríguez EP, Pérez PC. Spironolactone Effect in Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury in Wistar Rats. *Oxid Med Cell Longev* 2016:3196431, 2016.
182. Thangaraj SS, Thiesson HC, Svenningsen P, Stubbe J, Palarasah Y, Bistrup C, Jensen BL, Mortensen LA. Mineralocorticoid receptor blockade with spironolactone has no direct effect on plasma IL-17A and injury markers in urine from kidney transplant patients. *Am J Physiol Renal Physiol* 322(2):F138-F149, 2022.
183. Wada T, Ishikawa A, Watanabe E, Nakamura Y, Aruga Y, Hasegawa H, Onogi Y, Honda H, Nagai Y, Takatsu K, Ishii Y, Sasahara M, Koya D, Tsuneki H, Sasaoka T. Eplerenone prevented obesity-induced inflammasome activation and glucose intolerance. *J Endocrinol* 235(3):179-191, 2017.
184. Ferreira NS, Bruder-Nascimento T, Pereira CA, Zanotto CZ, Prado DS, Silva JF, Rassi DM, Foss-Freitas MC, Alves-Filho JC, Carlos D, Tostes RC. NLRP3 Inflammasome and Mineralocorticoid Receptors Are Associated with Vascular Dysfunction in Type 2 Diabetes Mellitus. *Cells* 8(12):1595, 2019.
185. Wang X, Li X, Zuo X, Liang Z, Ding T, Li K, Ma Y, Li P, Zhu Z, Ju C, Zhang Z, Song Z, Quan H, Zhang J, Hu X, Wang Z. Photobiomodulation inhibits the activation of neurotoxic microglia and astrocytes by inhibiting Lcn2/JAK2-STAT3 crosstalk after spinal cord injury in male rats. *J Neuroinflammation* 18(1):256, 2021.

186. Chantong B, Kratschmar DV, Nashev LG, Balazs Z, Odermatt A. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors differentially regulate NF-kappaB activity and pro-inflammatory cytokine production in murine BV-2 microglial cells. *J Neuroinflammation* 9:260, 2012.
187. Sønder SU, Mikkelsen M, Rieneck K, Hedegaard CJ, Bendtzen K. Effects of spironolactone on human blood mononuclear cells: mineralocorticoid receptor independent effects on gene expression and late apoptosis induction. *Br J Pharmacol* 148(1):46-53, 2006.
188. Yao J, Qian Z, Tian X, Fu G, Wang B, Li L. Involvement of BDNF Signalling Pathway in Spironolactone Mediated Protective Effects in Sepsis-Induced Cardiac Injury in Rats. *Int. J. Pharmacol* 17 (8): 577-583, 2021.
189. Zhang B, Bai M, Xu X, Yang M, Niu F, Gao F, Liu B. Corticosteroid receptor rebalancing alleviates critical illness-related corticosteroid insufficiency after traumatic brain injury by promoting paraventricular nuclear cell survival via Akt/CREB/BDNF signaling. *J Neuroinflammation* 17(1):318, 2020.
190. Kirvell SL, Elliott MS, Kalaria RN, Hortobágyi T, Ballard CG, Francis PT. Vesicular glutamate transporter and cognition in stroke: a case-control autopsy study. *Neurology* 75(20):1803-9, 2010.
191. Neiva R, Caulino-Rocha A, Ferreira F, Lobo MG, Correia-de-Sá P. Non-genomic Actions of Methylprednisolone Differentially Influence GABA and Glutamate Release From Isolated Nerve Terminals of the Rat Hippocampus. *Front Mol Neurosci* 13:146, 2020.
192. de Kloet ER, Joëls M. Brain mineralocorticoid receptor function in control of salt balance and stress-adaptation. *Physiol Behav* 178:13-20, 2017.
193. Hampel H, Mesulam MM, Cuello AC, Farlow MR, Giacobini E, Grossberg GT, Khachaturian AS, Vergallo A, Cavedo E, Snyder PJ, Khachaturian ZS. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain* 141(7):1917-1933, 2018.
194. Mineur YS, Picciotto MR. How can I measure brain acetylcholine levels in vivo? Advantages and caveats of commonly used approaches. *J Neurochem* 167(1):3-15, 2023.
195. Daumas S, Halley H, Francés B, Lassalle JM. Encoding, consolidation, and retrieval of contextual memory: differential involvement of dorsal CA3 and CA1 hippocampal subregions. *Learn Mem* 12(4):375-82, 2005.

196. Rolls ET. The mechanisms for pattern completion and pattern separation in the hippocampus. *Front Syst Neurosci* 7:74, 2013.
197. Rolls ET. Pattern separation, completion, and categorisation in the hippocampus and neocortex. *Neurobiol Learn Mem* 129:4-28, 2016.



8. EKLER

Ek 1: Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı



T.C.
ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu



TOPLANTI TARİHİ : 01/10/2020
TOPLANTI NO : 2020/08

- 2- Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 2020-28-01/10 Protokol no'lu "Kronik Serebral Hipoperfüzyon Oluşturulan Overektomize Dişi Sıçanlarda Mineralokortikoid Reseptör Antagonistinin Hipokampal Fonksiyonlar Üzerine Etkileri" konulu çalışmasının Etik Kurul İlkelerine uygun olduğuna,

Oy birliği ile karar verildi.

ASLI GİBİDİR

Prof. Dr. Emine YILMAZ CAN
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı

9. ÖZGEÇMİŞ

Meryem ERGENÇ, İlk ve ortaöğrenimini Ortakaraören Şerife Hasan Hüseyin Kocaman Okulunda, lise eğitimini Ortakaraören Lisesinde birincilikle Seydişehir/Konya’da tamamladı. 2010 yılında Marmara Üniversitesi Hemşirelik Yüksekokulundan mezun oldu. 2012 yılında Van Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesi’nde hemşire olarak başladığı görevine 2014-2019 yılları arasında Karadeniz Ereğli Devlet hastanesinde devam etti. 2018 yılında Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji AD’nda yüksek lisans eğitimini tamamladı ve yine aynı yıl doktora başladı. 2019 yılından itibaren ZBEÜ Ahmet Erdoğan Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Anestezi Programı’nda Öğretim Görevlisi olarak görev yapmaktadır.