

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YAŞLI SIÇANLARDA YÜKSEK POLİFENOLLÜ ZEYTİNYAĞIN
BEYİN DOKUSUNDA NÖROJENEZE ETKİSİNİN MOLEKÜLER
VE DAVRANIŞSAL OLARAK İNCELENMESİ

Özgün KİMİZOĞLU
ORCID: 0000-0002-7266-9366

SİNİRBİLİMLER ANABİLİM DALI
Temel Sinirbilimler Yüksek Lisans Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR
HAZİRAN 2022

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc -2018970168

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YAŞLI SIÇANLARDA YÜKSEK POLİFENOLLÜ ZEYTİNYAĞIN
BEYİN DOKUSUNDA NÖROJENEZE ETKİSİNİN MOLEKÜLER
VE DAVRANIŞSAL OLARAK İNCELENMESİ

Özgün KIMIZOĞLU
ORCID: 0000-0002-7266-9366

SİNİRBİLİMLER ANABİLİM DALI
Temel Sinirbilimler Yüksek Lisans Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Semra KOÇTÜRK
ORCID: 0000-0001-7528-1845

Bu Araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından
2020.KB.SAG.020 proje numarası ile desteklenmiştir.

İZMİR
HAZİRAN 2022

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

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum “*Yaşlı Sıçanlarda Yüksek Polifenollü Zeytinyağın Beyin Dokusunda Nörojenez Etkisinin Moleküler ve Davranışsal Olarak İncelenmesi*” başlıklı Yüksek Lisans tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

İMZA

Özgün Kırmızıoğlu

17 /05 /2022

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana rehberlik eden, bu çalışmanın pandemi şartlarında yürütülebilmesini sağlayan ve bilime olan yaklaşımı ile bana farklı bir bakış açısı kazandıran danışman hocam Prof. Dr. Semra KOÇTÜRK'e,

Bu projede yer alan, tecrübesi ve her zaman olumlu kişiliğiyle süreci benim için kolaylaştıran Doç. Dr. Serap Cilaker MIÇILI'ya,

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

Bilgisini ve tecrübesini her ihtiyacım olduğunda benimle severek paylaşan, çalışma prensibi, bilgiye olan yaklaşımı ve kişiliği ile bana ilham veren Tuğba ERKMEN'e,

Pandemi boyunca gerçekleşen deney sürecinde zorlu koşullarda yardımını esirgemeyen, bu çalışmaya tecrübesi, desteği ve çalışma etiği ile benim için önemli olan katkılar sunan Deniz KIRCA'ya,

Yardımsaverliğı ve her zaman cana yakın kişiliğıyle Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı sekreteri Eda Nesrin OLUM'a ve teknik konulardaki engin tecrübesi ile bize destek olan Emin ÇAVUŞLU'ya,

Varlıklarıyla bana devam etme gücü veren aileme teşekkürlerimi sunarım.

Özgün KIMIZOĞLU

İÇİNDEKİLER

ŞEKİLLER DİZİNİ	i
SİMGELER VE KISALTMALAR	iii
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Öğrenme ve Hafıza ile İlişkili Beyin Yapıları	3
2.1.1. Hipokampüsün Anatomik Özellikleri.....	5
2.2. Hipokampal Nörojenezin Öğrenme ve Bellekte Önemi	7
2.3. Nörojenezin Anksiyete ile ilişkisi	8
2.4. Nörojenez ve Yetişkin Nöral Kök Hücrelerin Rolü	9
2.5. Hipokampal Mikroçevrenin Nörojenezin Düzenlenmesindeki Rolü	12
2.6. Hipokampal Nörojenez ve Evreleri	14
2.7. Nörojenezde Önemli Olan Proteinlerin Özellikleri	16
2.7.1. Nestin.....	16
2.7.2. Kalbindin	17
2.6.3 Sinaptofizin	18
2.6.4. Nöronal Nükleer Antijen	19
2.8. Beyin Yaşlanmasında Etkin Olan Faktörler	20
2.9. Polifenoller ve Zeytinyağı	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. Araştırmanın Tipi	28
3.2. Araştırmanın Yeri, Zamanı ve Planı	28
3.3. Çalışma Materyali	29
3.4. Araştırmanın Değişkenleri	29
3.5. Veri Toplama Araçları	29
3.5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar	29
3.5.2. Deney Grupları ve Deney Planı	31
2.5.1. Yüksek Polifenollü Zeytinyağının Elde Edilmesi	33
3.5.3. Mekansal Öğrenme ve Hafızanın Değerlendirilmesi	35
3.5.4. Anksiyete Benzeri Davranışın Değerlendirilmesi	35

3.5.5. Sakrifikasyon ve Doku Örneklerinin Alınması	37
3.5.6. Beyin Dokularının Homojenizasyonu	37
3.5.7. Doku Protein Miktarının Belirlenmesi.....	37
3.5.8. Sinaptofizin Miktarının Ölçülmesi	39
3.5.9. Nestin Miktarının Ölçülmesi	40
3.5.10. Kalbindin Miktarının Ölçülmesi	41
3.5.11. Hipokampal Nörojenezin İmmünohistokimyasal Analizi	42
3.6. Verilerin Değerlendirilmesi	43
3.7. Araştırmanın Sınırlılıkları	43
3.8. Etik Kurul Onayı.....	43
4. BULGULAR	44
4.1. Morris Su Labirenti Testi.....	44
4.2. Açık Alan Testi	47
4.3. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi	49
4.4. Dendat Girus'ta Çoğalan Hücrelerin BrdU ile Belirlenmesi	52
4.5. Dendat Girus'ta Olgunlaşan Hücrelerin NeuN ile Belirlenmesi.....	53
4.6. Hipokampüs Nestin Düzeyi	54
4.7. Hipokampüs Kalbindin Düzeyi	55
4.8. Hipokampüs Sinaptofizin Düzeyi.....	55
4.9. Prefrontal Korteks Sinaptofizin Düzeyi.....	56
4.10. Korelasyon Analizi	57
5. TARTIŞMA.....	58
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	66
7. KAYNAKLAR	67
8. EKLER.....	78

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Hafıza türleri ve ilişkili beyin yapıları

Şekil 2: Hipokampal oluşum ve anatomik bağlantıları

Şekil 3: Hipokampüs ve yetişkin nörojenezi

Şekil 4: Hipokampal nörojenezin evreleri.

Şekil 5: Yaşlanmada görülen hücresel değişimler

Şekil 6: Hipokampüs BCA Standart Grafiği

Şekil 7: Prefrontal korteks BCA Standart Grafiği

Şekil 8: Hipokampüs Sinaptofizin Düzeyi Standart Grafiği

Şekil 9: Prefrontal Korteks Sinaptofizin Düzeyi Standart Grafiği

Şekil 10: Hipokampüs Nestin Düzeyi Standart Grafiği

Şekil 11: Hipokampüs Kalbindin Düzeyi Standart Grafiği

Şekil 12: Morris su labirenti testinin 1-4. günlerinde platformu bulma süreleri

Şekil 13: Morris su labirenti testinin 1-4. günlerinde katedilen toplam mesafe

Şekil 14: Morris su labirentinin 5. gününde hedef kadranda geçirilen süre

Şekil 15: Morris su labirentinin 5. gününde kat edilen toplam mesafe

Şekil 16: Morris su labirentinin 5. gününde tigmotaksis yüzme süreleri

Şekil 17: Morris su labirentinin 5. Gününde ortalama yüzme hızları

Şekil 18: Açık alan testi orta alanda geçirilen süre

Şekil 19: Açık alan testi kenar alanlarda geçirilen süre

Şekil 20: Açık alan testi kat edilen toplam yol

Şekil 21: Açık alan testinde ortalama hızlar

Şekil 22: Yükseltmiş artı labirent testinde açık kollarda geçirilen süre

Şekil 23: Yükseltmiş artı labirent testinde kapalı kollarda geçirilen süre

Şekil 24: Yükseltmiş artı labirent testinde orta alanda geçirilen süre

Şekil 25: Yükseltmiş artı labirent testinde kat edilen toplam yol

Şekil 26: Yükseltmiş artı labirent testinde ortalama hızlar.

Şekil 27: Dendat Girustaki BrdU pozitif hücreler

Şekil 28: Hipokampüste BrdU immün boyaması

Şekil 29: Dendat Girustaki NeuN BrdU pozitif hücreler

Şekil 30: Hipokampüste NeuN immün boyaması

Şekil 31: Hipokampal nestin düzeyi

Şekil 32: Hipokampal kalbindin düzeyi

Şekil 33: Hipokampal sinaptofizin düzeyi

Şekil 34: Prefrontal korteksteki sinaptofizin düzeyi

SİMGELER VE KISALTMALAR

BrdU	Bromodeoksiüridin
CA	Cornu Ammonis
cm	Santimetre
DCX	Doublecortin
DG	Dentat Girus
EGCG	Epigallokatekin galat
EK	Entorhinal Korteks
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay; Enzim bağılı immün analiz
GFAP	Glial fibril asidik protein
gr	Gram
HPA	Hipotalamus-hipofiz-adrenal
HRP	Horseradish peroxidase; Bayır turpu peroksidazı
HT	Hidroksitirozol
kg	Kilogram
Mg ⁺²	Magnezyum
mL	Mililitre
Nestin	Nöroepitelyal kök hücre proteini
NeuN	Nöron spesifik nükleer protein
ng	Nanogram
nm	Nanometre
NMDA	N-methyl-D-aspartate

OH	Hidroksil
p	Anlamlılık değeri
PSA-NCAM	Nöral hücre adezyon molekülü
SEM	Standart hata
SGZ	Subgranüler tabaka
sn	Saniye
SVZ	Subventriküler zon
μ L	Mikrolitre

YÜKSEK POLİFENOLLÜ ZEYTİNYAĞIN YAŞLI SIÇANLARDA BEYİN DOKUSUNDA NÖROJENEZE ETKİSİNİN MOLEKÜLER VE DAVRANIŞSAL OLARAK İNCELENMESİ

Yüksek Lisans Tezi

Özgün KIMIZOĞLU

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Sinirbilimler Anabilim Dalı

ÖZET

Nörojenezin nöral plastisitede, beyin homeostazında ve merkezi sinir sistemin korunmasında kritik bir rol oynadığı düşünülmektedir. Nörojenezin kronik hastalıklar için birincil risk faktörü olan yaşlanma sürecinde, beyin rahatsızlıklarından etkilenen hasarlı beyin hücrelerinin onarımında, ve hipokampal fonksiyonların sağlıklı işleyişinde rolü olduğu savunulmaktadır. Son yıllarda beslenme yaklaşımlarının yaşlanma sürecinde meydana gelen moleküler süreçleri etkileyerek beynin işlevselliğine katkıda bulunduğunu savunan çalışmalar artmıştır. Akdeniz diyeti terimi bu tür çalışmalar ile literatüre girmiş, polifenolden zengin yiyeceklerin moleküler ve fonksiyonel etkileri araştırılmaya başlanmıştır. Ülkemizde de önemli bir besin kaynağı olan zeytinyağının içeriğindeki polifenol miktarının yaşlanma sürecinden etkilenen nörojenez üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla gerçekleştirdiğimiz çalışmada yaşlı ve genç dişi sıçanlar kullanılmıştır. Altı hafta boyunca yüksek ve düşük polifenol içerikli zeytinyağı ile beslenen sıçanlar deney sonunda mekansal bellek ve anksiyete benzeri davranış açısından değerlendirilmiştir. Hipokampal nörojenezini değerlendirmek amacıyla Dendat Gyrus (DG)'deki çoğalan hücreler bromodeoksiüridin (BrdU), olgunlaşmış hücreler ise nöron spesifik nükleer bir protein olan (NeuN) ile immunohistokimya yöntemi ile etiketlenmiştir. Yüksek polifenolün beyin yaşlanmasında bozulan kalsiyum tamponlama kapasitesine etkisi kalbindin proteini ile, azalan sinaptik bütünlüğe etkisi ise sinaptofizin düzeyi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler, yüksek polifenollü zeytinyağının nörojenezde artışa sebep olduğunu, düşük polifenollü beslenmenin ise nörojenik etkisi olmadığını göstermiştir. Yüksek polifenollü zeytinyağ ile beslenen grupta kalbindin protein ekspresyonunun artış gösterdiği ve benzer şekilde sinaptik yoğunlukta artışa sebep olduğu saptandı. Düşük polifenol ile beslenen grupta ise kalbindin ve sinaptofizin üzerinde bir etki görülmedi. Çalışmamızda 6 hafta boyunca yüksek polifenollü zeytinyağı ile beslenmenin mekansal bellekte ve anksiyete benzeri davranışta iyileşme yönünde değişiklik göstermediği saptandı. Sonuçlarımız, yüksek polifenollü zeytinyağının nörojenik etkisini hücrelerin çoğalma, olgunlaşma evrelerindeki molekülleri (BrdU, Nestin, NeuN) ve beyin yaşlanmasında koruyucu etkisini sinaptofizin, kalbindin düzeylerini arttırarak sağladığını ilk kez ortaya koymaktadır.

Anahtar sözcükler: nörojenez, nöral kök hücre, polifenol, yaşlanma, zeytinyağı

Tezin sayfa adedi: 98

Danışman: Prof. Dr. A. Semra Koçtürk

MOLECULAR AND BEHAVIORAL EFFECTS OF OLIVE OIL WITH HIGH POLIFENOL CONTENT ON NEUROGENESIS IN AGED RATS

Master's Thesis

Özgün KIMIZOĞLU

DOKUZ EYLUL UNIVERSITY INSTITUTE OF HEALTH SCIENCE

Department of Neuroscience

ABSTRACT

Neurogenesis is thought to play a critical role in neural plasticity, brain homeostasis, and maintenance of the central nervous system. It is argued that neurogenesis have an important role in the aging process, which is the primary risk factor for chronic diseases, in the repair of damaged brain cells affected by brain disorders, and in the healthy functioning of hippocampal functions. In recent years, nutritional studies contribute to the functionality of the brain by influencing the molecular processes occurring in the aging process have increased. The term Mediterranean diet has entered the literature with such studies, and the molecular and functional effects of foods rich in polyphenols have begun to be investigated. Old and young female rats were used in our study to investigate the effect of the olive polyphenol which is an important food source in our country, on neurogenesis, which is affected by the aging process. Rats fed olive oil with high and low polyphenol content for six weeks were evaluated for spatial memory and anxiety-like behavior at the end of the experiment. To evaluate hippocampal neurogenesis, proliferating cells in Dendat Gyrus (DG) were labeled with bromodeoxyuridine (BrdU), and mature cells were labeled with a neuron-specific nuclear protein (NeuN) by immunohistochemistry method. The effect of high polyphenol on calcium buffering capacity, which is impaired in brain aging, was evaluated by calbindin protein, and its effect on decreased synaptic integrity was evaluated by synaptophysin level. The data showed that olive oil with high polyphenols induce an increase in neurogenesis, while diet with low polyphenols had no neurogenic effect. It was determined that calbindin expression increased in the group fed with high polyphenol olive oil, and similarly, it caused an increase in synaptic density. There was no effect on calbindin and synaptophysin in the low polyphenol fed group. In our study, it was determined that feeding with olive oil with high polyphenols for 6 weeks did not show any improvement in spatial memory and anxiety-like behavior. Our results reveal for the first time that the neurogenic effect of olive oil with high polyphenols increases the molecules (BrdU, Nestin, NeuN) in the proliferation and maturation and ite protective effect in brain aging by increasing synaptophysin and calbindin levels.

Key words: neurogenesis, neural stem cell, olive oil, polyphenol, aging

Page number: 98

Advisor: Prof. Dr. A. Semra Koçtürk

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nörojenez genel anlamıyla nöral kök hücrelerin nöronlara farklılaştığı, olgunlaşarak bulunduğu nörojenik bölgedeki fonksiyonel nöral ağlara katıldığı biyolojik bir süreçtir. Doğum öncesinde ve sonrasında beyin oluşumu ve gelişimi için hayati bir mekanizma olan nörojenezin, 1960'lı yıllarda Altman ve Das tarafından yetişkin beyni için tanımlanmasına kadar varlığının sadece bu dönemler ile sınırlı olduğu kabul edilmekteydi (1). Günümüzde ise beynin nöroplastik özelliğinin bir parçası olarak, yetişkin beyninde hipokampüste yaşam boyu aktif olduğu gösterilmiştir (2). Yaşlanma genetik, çevre ve yaşam tarzı faktörleri arasındaki etkileşimlerin sonucu olarak fizyolojik fonksiyonların zamana bağlı azalmasıdır. Beyin, yaşlanma ile her on yılda toplam hacminin yaklaşık %5'ini kaybetmekte, varolan morfolojik değişikliklere genomik istikrarsızlık, oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon, DNA mutasyonlarının zamanla hücre içinde birikmesi, sinaps sayısındaki azalma ve kronik inflamasyon eşlik etmektedir (3). Yaşlanma ile meydana gelen hücresel değişiklikler nedeniyle nöral kök hücrelerin de yaşlanması, bu hücrelerin kendini yenileme ve farklılaşma kapasitesini azaltmaktadır (4). Son zamanlarda birçok araştırma yaş ile meydana gelen değişikliklerin hem hücre dışı hem de hücre içi süreçlerinin nörojenez üzerinde nasıl rol oynadığını araştırmaktadır. Hipokampüste üretilen ve olgunlaşabilen hücre sayısının yaşlanma sürecinden nasıl etkilendiğikonusundabirbiri ile karşıt görüşler mevcuttur. Kemirgenlerle yapılan çalışmalar yaş ile nörojenez miktarının azaldığını göstermekteyken, insanlarla yapılan çalışma sayısının sınırlı olmasının yanı sıra, bu azalmanın insanlar için kemirgenlerdeki gibi olmadığını savunan çalışmalar da mevcuttur (5,6). Meydana gelen moleküler değişiklikler öğrenme ve hafıza fonksiyonları için hayli önemli olan hipokampüsün ve Dentat Girus'un (DG) fonksiyonelliğine etki etmektedir. Hatta hafıza yaşlanmada en çok etkilenen bilişsel fonksiyonlardan biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Yaşlı fareler üzerinde, nörojenezin yaşa bağlı azalmasının kognitif fonksiyonlarla ilişkisini araştıran çalışmalarda egzersiz, beslenme gibi nörojenez artıran müdahalelerin kognisyonu geliştirdiğine işaret etmektedir (7). Son yıllarda yaş ile artan anksiyetenin ve depresyonun, nörojenez ile ilişkisi serotonin geri alım inhibitörleri çalışmalarında kullanılmaktadır

(8,9). Kemirgenlerde ve insan olmayan primatlarda yapılan çalışmalar, depresyon ilaçlarının nörojenezi arttığına işaret etmektedir (10).

Dünyanın yaşlanan bir nüfusa sahip olması ve yaşlanmanın etkileri göz önüne alındığında, yaşa bağlı sağlık sorunlarından korunmak hatta yaşlanma ile meydana gelen bozuklukları geriye çevirmek için olası nöroprotaktif maddeler geliştirmek ve kullanmak iyi bir yöntemdir. Bunun için polifenol gibi besin maddeleri kullanmak bu seçeneklerden biridir (11). Polifenoller çoğunlukla meyve, sebze, çay ve yenilebilir bitkilerde bulunan; bir ya da daha fazla hidroksil (OH) grubu içeren aromatik halkadan oluşan bileşiklerdir. Lipofilik yapısı nedeni ile kan-beyin bariyerinden geçebilmekte ve bu özellikleri dolayısıyla beyin yaşlanmasına karşı pek çok yararlı etkisi olduğu düşünülmektedir (11,12). Akdeniz diyetinin ve ülkemizde de günlük beslenmenin önemli bir parçası olan zeytinyağı polifenollerinin bu mekanizmalar üzerindeki moleküler etkisi henüz tam olarak aydınlatılabilmiş değildir.

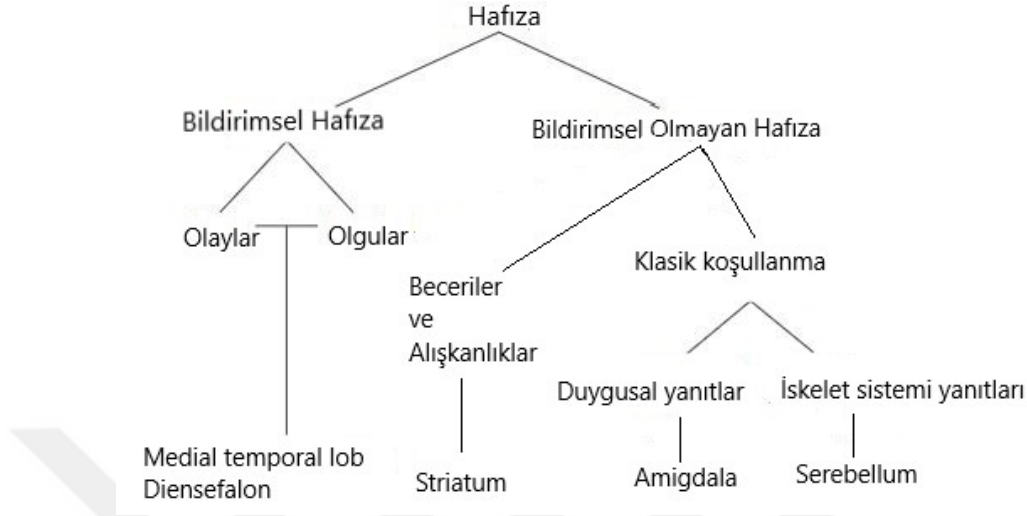
Nörojenezin moleküler ve davranışsal düzeydeki etkileri göz önüne alındığında, nörojenezi arttırmanın bilişsel işlevleri de arttırıp arttırmadığı daha da önem kazanmaktadır. Yaşlılık sürecinden etkilendiği düşünülen hipokampal nörojenezin ve prefrontal kortekste sinaptik yoğunluğun zeytinyağı polifenollerinin günlük tüketimi ile ne şekilde etkilendiğine dair bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Ayrıca, yüksek polifenollü zeytinyağının günlük tüketimin nörojeneze bağlı olarak davranışa etkisini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle bu çalışmada yüksek polifenol içerikli zeytinyağının DG'deki kök hücre çoğalmasına ve olgunlaşmasına belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca ikinci amacımız yüksek polifenollü zeytinyağının mekânsal öğrenme ve belleğe etkisi ile anksiyete benzeri davranışa etkisini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Öğrenme ve Hafıza ile İlişkili Beyin Yapıları

Sinir sistemi bir bütün olmasına karşın anatomik veya fonksiyonel olarak çeşitli bölgelere ayrılarak incelenmektedir. Anatomik olarak merkezi ve çevresel olarak ikiye ayrılan sinir sisteminin merkezi (santral) denilen, kafatasının altındaki yapıları oluşturan kısımları kabaca şu şekilde ayırabiliriz: beyin yarım kürelerini ve diensefalonu oluşturan ön beyin, beyin sapının bir bölümünü oluşturan orta beyin ve beyin sapı, serebellum gibi yapıları içeren arka beyin. Bu beyin bölgelerinin dış kısmında bu bölgeleri saran, serebral korteks denilen ve beyin hacminin %80'ini oluşturan bir tabaka bulunur. Korteks biliş, hafıza, görsel bilginin işlenmesi, dil oluşturma ve anlama yeteneği gibi fonksiyonları meydana getiren yapıların bir bütünüdür ve fonksiyonel olarak özelleşmiş bölgelerden oluşur. Korteksin altında ise hareket, bilinç, cinsellik, beş duyumuzun işlevi gibi fonksiyonları üreten beyin yapıları bulunmaktadır. Tüm bu beyin yapıları kendi özgün devreleri ve birbirleri ile olan bağlantıları sayesinde var olan beyin fonksiyonlarını üretmektedirler (13,14).

Öğrenme yeni bilginin sinir sistemi tarafından kazanıldığı ve davranış değişiklikleri yoluyla gözlemlenebildiği süreç olarak tanımlanmaktadır. Hafıza ise öğrenilmiş bilginin kodlanması, saklanması ve geri çağırılmasını ifade etmektedir. Ayrıca hafıza, çeşitli beyin yapıları ve farklı hafıza türleri ile oluşan bir sistemdir. Hafıza türleri bildirimsel ve bildirimsel olmayan olarak ikiye ayrılmaktadır, ancak bu hafıza çeşitleri de kendi içlerinde bölümlere ayrılmaktadır (15) (Şekil 1).



Şekil 1: Hafıza türleri ve ilişkili beyin yapıları.

Bildirimsel hafıza: Bilinçli olarak öğrenip hatırlanan olay ve olgulara dair bilgileri içeren hafıza türüne denmektedir. Hipokampüsün içinde olduğu medial temporal lob yapıları; talamusun ve hipotalamusun içinde olduğu ön beyin yapısı olan diensefalik yapılar bildirimsel hafıza fonksiyonunu oluşturmaktadır (15). Prefrontal korteks hafızada saklanan bilgilerin kişinin hayat deneyimi doğrultusunda kullanılıp kullanılmayacağını belirlemesi fonksiyonunu oluşturmaktadır.

Hipokampüs serebral korteksin medial temporal kısmında bulunan ve Cornu Ammonis (CA), Dendat Girus (DG), subikulum ve entorhinal korteks (EK) adı verilen bölümlerden oluşan korteks bölgesidir. Hipokampüste öğrenilen bilgiler günler, hatta yıllar boyunca burada saklanabilir. Hipokampüsün lezyonlarında ise yeni bilgilerin uzun süre saklanmadığı yani yeni hafızaların oluşmadığı görülmüştür (16). Hipokampüsün öğrenme ve hafıza ile ilgili bu rolünü diğer beyin bölgeleri ile kurduğu bağlantılar sayesinde oluşturduğu öne sürülmektedir. Hipokampüs, prefrontal korteks ile bildirimsel hafıza türü olan çalışma hafızası fonksiyonunda beraber çalışmaktadır. Örneğin çalışma hafızası ile telefon numarası kısa süreliğine hafızada tutulabilir ve hızlıca unutulabilir (15,17).

Bildirimsel olmayan hafıza: Hafızanın bilinç düzeyinde gerçekleşmeyen türüne denmektedir. Bilinçli olmayan düzeyde kazanılan bilgi ve beceriler bu hafıza türüne aittir. Örneğin şarkı söylemek veya bisiklete binmek striatum, neokorteks, amigdala ve serebellum yapılarının ürettiği hafıza türüdür (18). Son çalışmalar striatum bağımlı alışkanlık belleği ile hipokampus bağımlı bildirimsel belleğin birbiri ile bağlantılı çalıştığını ifade etmektedir. Hipokampusün temel fonksiyonu mekânsal öğrenmedir. Striatum ise alışkanlık-benzeri, motivasyonel öğrenmede önem kazanmaktadır. T-labirent ile yapılan bir çalışmada sıçanlara besin konularak bir kola gitmeyi öğrenmeleri sağlanmıştır. Daha sonra ödül kaldırıldığı durumda da sıçanların aynı kola gitme eğiliminde oldukları görülmüştür. Aynı deneyde hipokampus lidocaine uygulaması ile inhibe edildiğinde bu alışkanlık davranışının da kaybolduğu gözlemlenmiştir (19). Bu çalışma hipokampusün ve striatumun birlikte çalışarak alışkanlık-benzeri hafıza fonksiyonunu nasıl oluşturduğuna dair güzel bir örnek oluşturmaktadır.

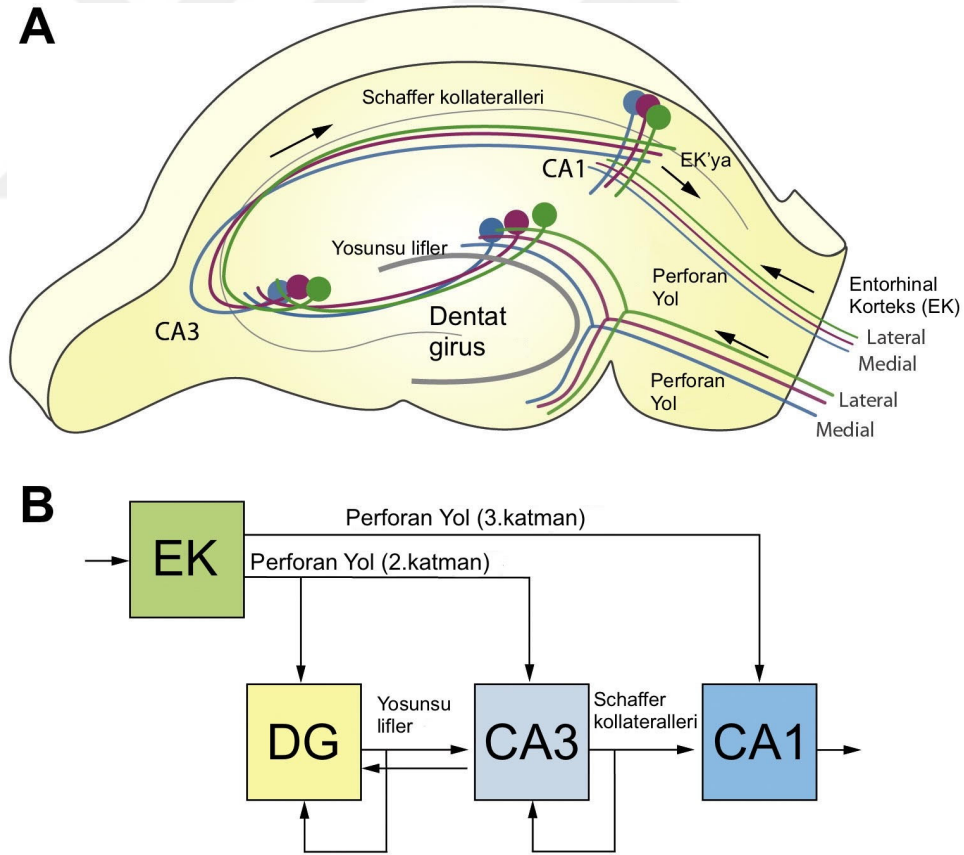
2.1.1. Hipokampusün Anatomik Özellikleri

Hipokampus, kortikal hemisferin medial kenarını oluşturan ve lateral ventrikülün medial duvarında yer alan kıvrımlı bir yapıdır. Uzun zamandır üzerine çalışmalar yapılması nedeniyle de iyi tanımlanmıştır. Hipokampal oluşum, CA1, CA2, CA3 bölgelerini, DG ve subikulumu içerir. Bu yapılar kendi içinde birbirlerine bağlı olmakla beraber aynı zamanda neokortikal, subkortikal ve limbik yapılarla bağlantı kurmaktadır. Hipokampusün bağlantı kurmada birincil hücresi piramidal nöronlardır. Piramidal hücreler dendat granül hücreler ve hipokampal internöronlar ile birbirlerine bağlıdır (20).

Hipokampusün girdi sinyallerini aldığı bölgelerden biri DG'dir. DG girdi sinyallerinin büyük bir kısmını EK'den almaktadır. Hipokampüse ana uyarıcı, glutamaterjik girdiyi sağlayan EK'in perforant yol aksonları, DG ile bağlantı kurar ve moleküler tabakadaki granül nöronlarla iletişimi sağlar. Diğer glutamaterjik girdi, hilustaki liflerden (*mossy fiber*) buradaki granül hücrelere gelir. Bu granül hücreler daha sonra liflerinin aksonlarını CA3 piramidal hücrelere yollar. CA3 piramidal hücreler ise

Schaffer kollateralleri ile CA1 bölgesinde bulunan hücreler ile bağlantı kurar. Buna karşılık CA1 piramidial nöronları EK'e subiculum ile bağlantı kurar. Granül nöronların yosunsu lifleri hilusta kollateral oluşturur ve yosunsu hücrelerin proksimal dendritleri, basket hücrelerinin bazal dendritleri ve diğer hücreler ile sinaps yapar (20) (Şekil 2).

Hipokampüse girdiler kortikal ve subkortikal yapılardan gelmektedir. Subikulum prefrontal korteksten, EK de orbifrontal temporal, parahipokampal korteks, olfaktor bulbus, amigdala gibi yapılardan girdi sinyalleri almaktadır. Bu bölgelerin çoğu da birbirleri ile bağlantılıdır. CA1 bölgesinden de prefrontal korteks ve anterior singulat korteks gibi kortikal alanlara giden afferentler ya da EK üzerinden bu kortikal alanlara giden nöral sinyaller uzun süreli belleğin oluşumunda görev almaktadır (20).



Şekil 2: Hipokampal oluşum ve anatomik bağlantıları (21).

Hipokampus yapısı içinde gerçekleşen bu moleküler olaylar hafıza oluşumunu sağlamaktadır. Bu nedenle nörojenezin gerçekleştiği bölge olan hipokampusun DG bölgesi öğrenme ve hafıza fonksiyonuna etki eden önemli bir bölge olarak kabul edilmektedir. DG'deki nörojenezin öğrenme ve hafıza fonksiyonuna nasıl etki ettiği pek çok araştırmanın konusudur.

2.2. Hipokampal Nörojenezin Öğrenme ve Bellekte Önemi

Hipokampus yeni bilginin kodlanmasında ve kodlanan bilginin geri çağırılmasında hayati bir rol oynamaktadır. Son çalışmalar hipokampusun yapısının ve fonksiyonunun homojen olmadığını ortaya koymaktadır. Bu bölgelerin lezyona uğratılmasıyla yapılan çalışmalar dorsal hipokampusun öğrenme ve uzamsal hafıza ile ilişkili olduğunu; ventral hipokampusun ise duygusal ve motive edilmiş davranışları nukleus akumbens, prefrontal korteks, amigdala ve entorhinal korteks ile bağlantıları yoluyla ve hipotalamus-hipofiz-adrenal (HPA) yolu üzerinden de stres yanıtını düzenlediğini öne sürmektedir. Nörojenezin gerçekleştiği hipokampusun DG bölgesi her iki bölgede sürekli olarak yeni nöronlar ürettiği belirtilmektedir (22).

Nörojenezin hipokampal fonksiyonlarla ilişkisini anlamak amacıyla kemirgenler ile pek çok çalışma gerçekleştirilmiştir. Nörojenezin çeşitli yöntemler ile durdurmak nörojenezin hipokampal fonksiyonlara olan katkısını anlayabilmek için kullanılmıştır. Örneğin sıçan ya da farelere metilazoksümetanol uygulanarak bölünen hücrelerin hücre döngüsünü tamamlamaları engellenmiş ve akabinde davranış testleri uygulanmıştır. Bu yöntemle yapılan bir çalışmada hipokampal fonksiyon olan göz kırpma koşullanmasında gerçekleşen öğrenmenin bozulduğu, bunun da nörojenezdeki azalma ile görüldüğü bildirilmiştir (23). Nörojenezin durdurmak için DG hücrelerini tahrip etme veya verilen çeşitli ilaçlarla durdurma çalışmalarının hipokampusun fizyolojisini etkilemesi sebebiyle daha özelleşmiş yöntemler kullanmak daha güvenilir sonuçlar elde edilmesi sağlanmaktadır. Bunlardan biri gen manipülasyon teknikleri kullanarak spesifik olarak sadece belirli hücre tipindeki belirli molekülleri inhibe etmeye yönelik yöntemlerdir. Örneğin, sadece nestin eksprese eden hücrelerin seçici olarak apoptoza gönderilmesinin

indüklendiği bir fare çalışmasında, nörojenezin azaldığı görülmüş ve Morris su labirenti testinde öğrenme ve mekânsal belleğin bozulduğu gözlemlenmiştir (24).

Hafızanın en büyük görevlerinden biri, birbirine çok benzeyen bilgileri daha önceden belleğe kaydedilmiş bilgiler ile karıştırmadan saklayabilmesidir. Bu işleve patern ayrımı adı verilir (25). Nörojenezin fonksiyonuna dair kemirgenlerle yapılan çalışmalar nörojenezin patern ayrımı fonksiyonu için çok önemli olduğuna işaret etmektedir. Farelerde DG’de yeni üretilmiş progenitör hücrelerin ve olgun dendat granül hücrelerin elektrofizyolojik özelliklerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, DG’nin patern ayrımına katkıda bulunarak epizodik ve uzamsal hafıza fonksiyonlarında yer aldığı bildirilmiştir (26).

Yetişkin nörojenezi ile üretilen DG hücrelerinin özellikleri ile ilgili bir başka görüş, DG hücrelerinin olgunlaşma sırasında çevresel girdi sinyalleri ve kognitif ihtiyaca göre farklı işlevler gösterecek şekilde gelişim aşamalarından geçip olgunlaşmasıdır (27). Bu görüşü destekleyen çalışmalara örnek olarak; gönüllü yapılan egzersizin SGZ’de hücre çoğalmasını arttırdığını gösteren çalışma ve zenginleştirilmiş çevrenin 1-3 haftalık olgunlaşmamış nöronların sağ kalımını teşvik ettiğini gösteren çalışma gösterilebilir. Ek olarak bu çalışmalar hem gönüllü egzersizin hem de zenginleştirilmiş çevrenin, yaşlı ve genç kemirgenlerin Morris su labirenti testindeki performanslarını iyileştirdiğini savunmaktadır (28,29).

2.3. Nörojenezin Anksiyete ile ilişkisi

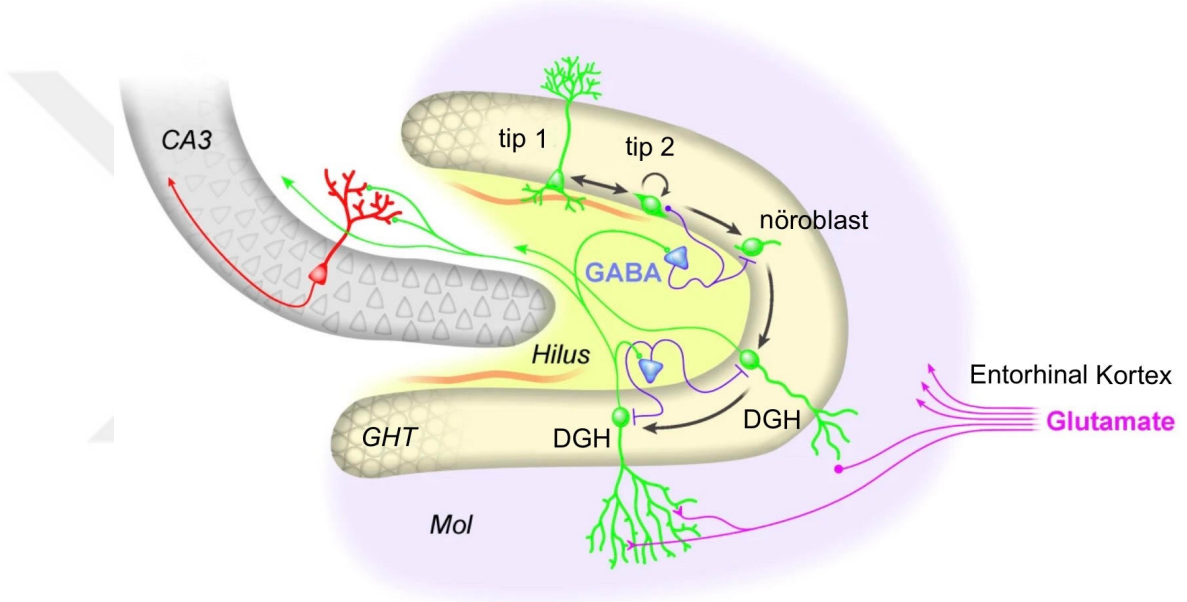
Hipokampüsün stres ile ilgili olan beyin yapıları ile bağlantıları ve hipokampüsün duygusal yanıtları düzenlemedeki rolü göz önüne alındığında nörojenezin bu mekanizmalar üzerindeki etkisi de önem kazanmaktadır. Nörojenezin kemirgenlerde anksiyete benzeri davranışa etkisi tartışmalıdır. SGZ’deki nörojenezin duygu durumuna olan potansiyel etkisini ilk ortaya atan Gould ve arkadaşları (30), yaptıkları çalışmada SGZ hücre bölünmesinin kortikosteroidler tarafından baskılandığını göstermişlerdir. Daha sonra yapılan çalışmalar 2-8 haftalık kronik stres prosedürlerinin kemirgenlerde nörojenezi azalttığı, benzer şekilde sosyal izolasyona maruz kalan insan olmayan

primatlarda da nörojenezin azaldığı ve anhedoni meydana geldiği gösterilmiştir (30). Stresin nörojenez üzerindeki azaltıcı etkisini gösteren çalışmalar dışında, nörojenezin anksiyete benzeri davranışı yalnızca stres varlığında etkilediği, stresin olmadığı durumlarda ise etkisinin olmadığı savunulmaktadır. Normal nörojenez sürecinde nöral kök hücrelerin %60-80'i olgunlaşmadan Bax bağımlı apoptoza uğramaktadırlar. Hill ve arkadaşlarının (31) farelerde yaptığı çalışmada apoptotik Bax protein ekspresyonu inhibe edildiğinde DG'deki nörojenezin arttığı ve olgunlaşarak yetişkin granül hücrelere dönüştüğü gösterilmiştir. Nörojenezin arttığı grupta yapılan davranış testlerinde anksiyete benzeri davranışta herhangi bir değişiklik görülmemiştir. Buna karşılık deneyde kortizol seviyesinin dört hafta boyunca kortikosteron verilerek arttırıldığı aynı transjenik modelde kortizol ile yükselen anksiyete benzeri davranışın iyileştiği görülmüştür. Bu da nörojenezin antidepresan ilaçların ve çevre zenginleştirmesinin davranışsal etkilerini arttırdığı, fakat tek başına anksiyete benzeri davranışta etkili olmadığı şeklinde yorumlanmıştır.

2.4. Nörojenez ve Yetişkin Nöral Kök Hücrelerin Rolü

Nörojenez omurgalı ve omurgasız hayvan türlerinde görülen, nöral kök hücrelerin çoğalmasından olgunlaşarak fonksiyonel nöral ağlara katılmasına kadar olan süreçleri kapsayan biyolojik bir olgudur. Nörojenez sinir sisteminin embriyonik oluşumuyla başlayıp postnatal gelişimiyle devam etmekte, yetişkinlik ve yaşlılık dönemi boyunca sinir sistemi içerisinde rol oynamaktadır (32). Sinir sisteminin gelişmesinde yaşamsal bir öneme sahip nörojenezin, yetişkin dönemde insan beynindedevam edip etmediği pek çok çalışma ile sorgulanmıştır. Memeli beyni ile yapılan çalışmalarda üç beyin bölgesinde nörojenezin gerçekleştiği gösterilmiştir (5,33,34). Bu beyin bölgeleri lateral ventriküllerin subventriküler zonu (SVZ), hipokampüsün subgranüler zonu (SGZ) ve striatumdur. SVZ'deki nöral kök hücre havuzunda üretilen yeni hücreler rostral göç akımıyla olfaktor bulbusa ulaşmakta ve burada çeşitli tiplerde internöronlara ve glial hücrelere farklılaşarak mevcut devrelere katılmaktadırlar (35). Hipokampüste DG'daki nöral kök hücreler ise SGZ'de üretilmekte, üretilen hücreler olgunlaşmamış nöronlara ve astrositlere farklılaşmakta ve görece daha kısa bir göç ile granül hücre tabakasına ulaşmaktadır.

Buradaki hücreler olgun nöronlara dönüşüp buradaki nöral ağlara katılmaktadırlar (35) (Şekil 3). Lateral ventrikülün yanında konumlanan striatum ise nörojenez açısından son yıllarda önem kazanmıştır. Daha önceleri sadece hareket ile ilişkilendirilen striatum ödül, motivasyon gibi davranışın duygusal yanıtları ile ilgili bir beyin yapısıdır. Belleğin alışkanlık ile ilgili yönlerinde rol oynayan striatumda gerçekleşen nörojenezin, hipokampal nörojenezle kıyaslanabilir miktarda olduğu bildirilmektedir (34)(36).



Şekil 3: Hipokampus ve yetişkin nörojenezi (37).

Çoğunlukla kemirgenler ile yapılan birçok çalışma nörojenezin varlığını doğrulasa da insan beyni ile kemirgen beyninin filogenetik olarak farklı olması insanlarda gerçekleşen nörojenezin araştırılmasını gerektirmiştir. Bergmann ve ark. (33) yaptığı çalışma SVZ’de gerçekleşen yetişkin nörojenezin insanlarda kemirgenlerdeki gibi gerçekleşmediğini öne sürmektedir. ¹⁴C yöntemi ile yapılan bu çalışmada insan olfaktör bulbusundaki ¹⁴C miktarı ölçülmüş ve SVZ’deki nörojenezin insanlarda 100 yılda bir, %1 yeni nöron üretimine karşılık gelecek miktarda olduğu savunulmuştur. Kemirgenlerde ise olfaktör bulbusta bulunan nöronların yılda %50 kadarının yeni üretilen nöronlar olduğu bildirilmiştir (33,38). Sonuç olarak ortak kanı, insanlarda SVZ’de gerçekleşen

nörojenezin gözlemlenebilir ve ölçülebilir olmasına rağmen bu kapasitenin diğer memelilere göre bir hayli sınırlı olduğu yönündedir (39).

Hipokampal nörojenez ise insan olmayan primatlarda ve özellikle kemirgenlerde çokça çalışılmıştır. İnsanlarda ise hipokampal nörojenezin varlığını doğrulayan ilk çalışma skuamöz hücreli karsinom tanısı almış ve tümör aktivitesini ölçmek amacıyla bromodeoksiüridin (BrdU) uygulanmış hastaların postmortem hipokampus dokuları ile gerçekleşmiştir (40). Sonuçta ortalama yaşları 64.4 olan insanların hipokampuslerinde hücre döngüsünde DNA sentezi sırasında BrdU'nun hücre DNA'sına bağlandığı ve dolayısıyla hücrelerin çoğaldığı belirlenmiştir. Daha sonra insan dokuları üzerinde yapılan araştırmalarda birbirine karşıt görüşler olsa da yetişkin DG'deki hücrelerin yaklaşık %0.004'ünün yeni üretilen hücreler olduğu görüşü hakimdir. Bu sayının iki aylık kemirgenlerde daha yüksek olduğu (günde %0.03 ile 0.06 arası), 16 yaşındaki makak maymunlarında ise insanlara göre daha fazla olduğu bildirilmektedir (günde %0.004 ile 0.02 arası) (41–43).

Radial-glia benzeri hücreler denen ve kök hücre özellikleri gösteren astrositler hipokampüstenöral kök hücre havuzunu oluşturmaktadırlar. Yetişkin beyninde bu hücrelerin kök hücre özelliklerini devam ettirebilmelerini veya farklı tipte nöral hücrelere dönüşebilmelerini düzenleyen birçok faktör bulunmaktadır. Nöral kök hücre mikroçevresi adı verilen bu bölgededüzenleyici moleküller ve diğer hücre tipleri bulunmaktadır. Kök hücre özellikli astrositler simetrik bölünerek iki kardeş kök hücre oluşturmakta ve havuzdaki kök hücre sayısını arttırmaktadır. Buradaki kök hücrelerin asimetrik bölünmesiyle biri kök hücre özellikli diğeri nöral hücre üretme kapasitesine sahip progenitör hücre denen iki hücre oluşmaktadır. Progenitör hücreler beş gelişimsel basamaktan geçip olgun nöronlara veya astrositlere dönüşmektedir (44).

Nörojenezin memeli beynindeki varlığı, bilişsel fonksiyonlarla ilişkisinin merak edilmesine neden olmuştur. Kemirgenlerde yapılan nörojenezin inhibe edildiği çalışmalar hipokampal nörojenezin hafıza oluşumunun patern ayrımı fonksiyonu için gerekliliğini işaret etmektedir. X ışınları ile nörojenezin inhibe edildiği çalışma buna örnektir. Bu

çalışmada 8 aylık fareler kullanılmış ve hipokampal nörojenez inhibe edildikten sonra radyal kol testi ve dokunmatik ekran kullanılarak patern ayrımı fonksiyonu değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, nörojenezin gerçekleşmediği fareler patern ayrımında başarısız olmuşlardır (45). Bu tür çalışmaların yanı sıra kemirgenlerde çevre zenginleştirilmesi çalışmaları hipokampal nörojenezin artmasına neden olmuş ve bu çalışmalarda mekânsal öğrenme ve patern ayrımı fonksiyonlardaki gelişme, artmış nörojenez ile ilişkilendirilmiştir (46).

İnsanlarda ise nörojenezin fonksiyonel etkisini ölçmek pek mümkün olmamaktadır. Bunun için memelilerle yapılan çalışmaların insan nörojenezi ile ilişkilendirilmesine ek olarak çeşitli çalışmalarla çıkarım yapılmaya çalışılmaktadır. Sıçanlarda kranyal radyasyon uygulamasının nörojenezi inhibe etmesi sebebiyle ve tedavi uygulanmış insan kanser hastalarında hafıza, dikkat ve yürütücü işlevlerin azalması bazı araştırmacılar tarafından hafızadaki bozulmada nörojenezdeki bozulmanın rolü olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (47). Bunun dışında merkezi sinir sistemi hastalıklarında nörojenezin bozulduğunu bildiren çalışmalar nörojenezin insanlardaki fonksiyonu hakkında bilgiler vermektedir. Nörojenezin Alzheimer hastalığından ne şekilde etkilendiği tam olarak anlaşılmamış olsa da sıçan modellerinde hastalığın erken aşamalarından başlayarak nörojenez mekanizmasının değiştiği ve daha sonra azaldığı gösterilmiştir(37). Buna karşın birbirine karşıt sonuçlar da mevcuttur. Alzheimer hastalarında farklı nöral belirteçler kullanılarak yapılan çalışmalarda nörojenezin azaldığını belirten çalışmaların yanı sıra nörol progenitör hücre sayısının arttığını bildiren çalışmalar da vardır (48,49). Bu artışın bozulan nörojenez karşı gelişen kompensatuar bir mekanizma olabileceği ve nörojenezin hastalığın farklı evrelerinde farklı oranlarda gerçekleşebileceği düşünülmektedir. Alzheimer hastalığında belirgin bir bulgu olan hafıza kaybının nörojenezin mekanizması ile ilişkisini aydınlatacak daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

2.5. Hipokampal Mikroçevrenin Nörojenezin Düzenlenmesindeki Rolü

Nöral kök hücre mikroçevresi, embriyonik gelişimden sonra kök hücrelerin sinir sistemi içerisinde yeni hücreler ürettiği bölgeyi ifade etmektedir. Bu mikroçevrede çeşitli

hücreler ve bu hücrelerden salgılanan moleküller bulunmakta, böylece nöral kök hücrelerin davranışında belirleyici faktörler olarak rol oynamaktadır (50). Kök hücrelerin içinde bulunduğu mikroçevrenin devamlılığını sağlayan önemli faktörler ise mikroçevredeki sinyaller ve hücre-hücre etkileşimleridir. Bu etkileşimlerle nöral kök hücrelerin davranışı, kök hücrelerin sessiz evrede kalması veya çoğalması yönünde düzenlenerek nöronal hücreye mi (nörojenez) glial hücreye mi (gliojenez) dönüşeceği ve bu üretimin dengede tutulduğu savunulmaktadır. Yetişkin sinir sisteminin çeşitli bölgelerinden nöral kök hücreler izole edilebilmelerine rağmen, nörojenik bölgelerde devamlı olarak yetişkin nörojenez gerçekleşmektedir. Bunun yanı sıra, sıçanlardan izole edilip hipokampusun diğer bölgelerine sonradan transplante edilen bir çalışmada, nörojenezin gerçekleşmediği görülmüştür (51). Dolayısıyla nörojenik çevrenin nörojenezde önemli bir belirleyici olduğu düşünülmektedir.

Hipokampal nöral kök hücrelerin bulunduğu SGZ; granül hücre tabakası ve hilus arasında kalan ve yetişkin nöral kök hücreler için özgün bir mikro çevre sağlayan ince bir tabakadır (Şekil 4). Bu ince tabakada nöral kök hücreler, nöral progenitörler ve nörojenez gelişim basamaklarından geçerek olgunlaşmış nöronların yanı sıra astrositler, mikroglialar ve internöronlar bir arada bulunmaktadır. Bu hücrelerden kaynaklanan çeşitli moleküller nörojenezin herhangi bir aşamasında bulunan progenitör hücrelere etki etmektedirler. Hatta bu mikroçevrenin dışında bulunan, mikroçevredeki nöronlarla bağlantı kuran nöronlar da nöral aktiviteleriyle ve salgıladıkları moleküllerle nörojenezin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Ekstraselüler matris proteinleri, nörotrofik faktörler ve büyüme faktörleri, hücre döngüsü proteinleri, nörotransmitterler, nöropeptidler, hormonlar, transkripsiyon faktörleri gibi moleküller bu özel mikroçevrede bulunan hücrelerde çeşitli yanıtlar oluşturarak hücre içi sinyal iletim yollarını etkilemektedirler. Lokal hücrelerden kaynaklanan moleküllerin yanı sıra, sistemik faktörler de nörojenezde etkin rol oynamaktadır. Yetişkin SGZ nörojenik olmayan bölgelere kıyasla yoğun bir vasküler yapılanma göstermektedir. Yetişkin kök hücrelerin nöral dallanmaları kan damarları ile bağlantı kurarak sistemik dolaşım ile taşınan molekülleri nörojenez mekanizmasına dahil etmektedir. Buna ek olarak kan-beyin bariyeri nöral kök hücre

havuzunun bulunduğu bölgelerde “sızdırarak” bu hücrelerin dolaşımdaki faktörlere ulaşımını kolaylaştırmaktadır [51].

2.6. Hipokampal Nörojenez ve Evreleri

İmmünohistokimya yöntemlerinin gelişmesiyle nöral kök hücrelerin kimliğinin, nörojenez sürecinin ve düzenleyici mikroçevresinyallerinin tanımlanması önemli gelişme göstermiştir. Tüm kapasite ve sınırlılıkları ile araştırma konusu olan yetişkin nörojenezi; nöral plastisite, beyin homeostazı, santral sinir sistemindeki dokuların korunması ve tamirikonularının dahil olduğu geniş bir yelpazede incelenmektedir (53). Daha alt hayvan türlerinde yetişkin nörojenezi, tüm sinir sistemi içerisindeki eski nöronların yenileri ile değişimini ifade ederken, memeli beyninde ise nörojenezin belirli alanlarda sınırlı kalması nörojenezin memeli beyninin fonksiyonları ile ilişkisi hakkında pek çok soru sorulmasına neden olmaktadır (54).

Nöral kök hücreler granüler nöronlara farklılaşırken beş gelişimsel aşamadan geçmektedirler ve bu sırada belirteç olarak kullanılacak bazı proteinleri eksprese etmektedirler (46) (Şekil 4).

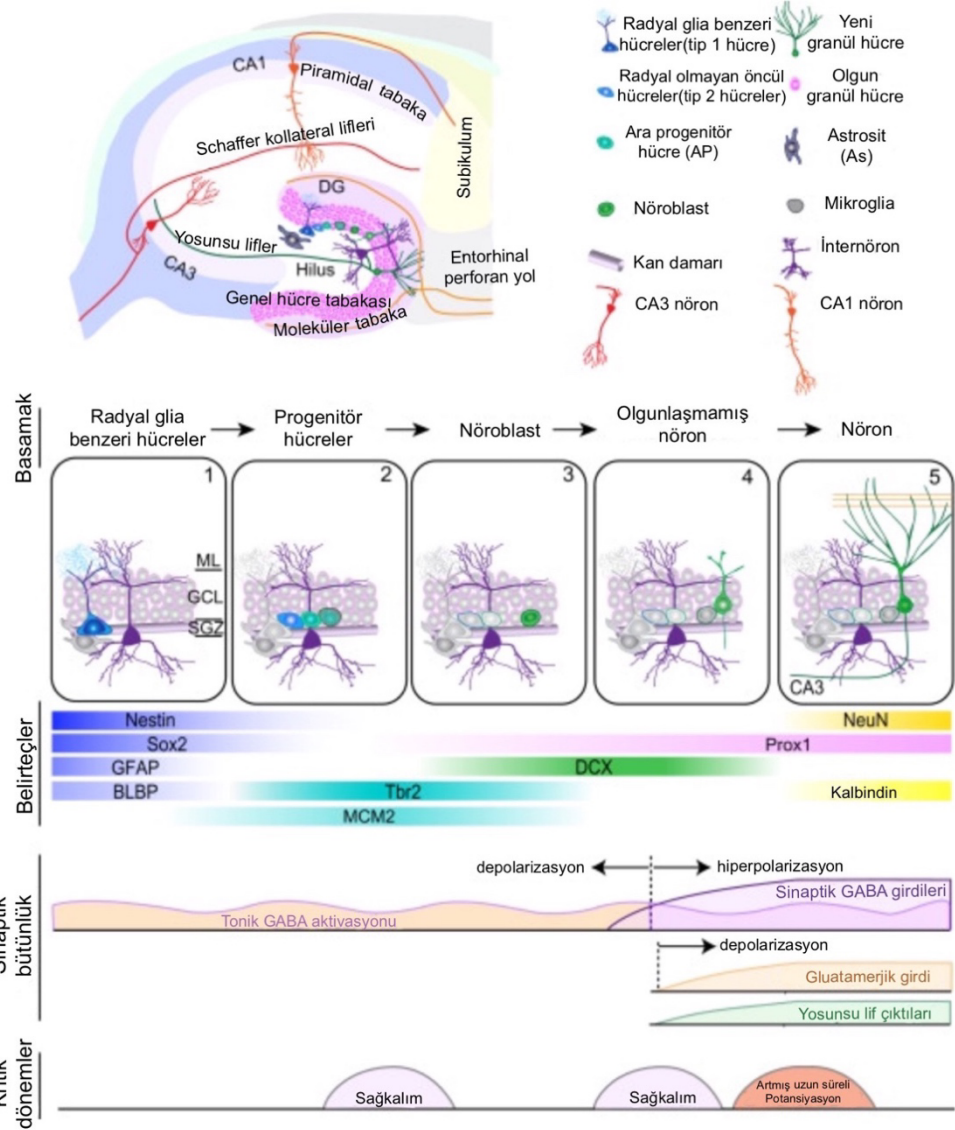
Birinci basamak (çoğalma fazı): Hücre gövdeleri SGZ’de bulunan sessiz evredeki nöral kök hücreler çoğalarak “geçici çoğalan hücreleri” oluşturmaktadır. Bu basamak sırasında yeni üretilen hücreler glial fibril asidik protein (GFAP) ve nestin proteinlerini eksprese etmektedirler.

İkinci basamak (farklılaşma fazı): Progenitör hücreler olgunlaşmamış nöronlara dönüşmektedirler. İkinci basamağın erken evrelerindeki hücreler nestin pozitif fakat GFAP negatif olup yüksek bir çoğalma yeteneğine sahiptirler. Bu faz boyunca hücrelerin nöral hücre tipinin belirlendiği düşünülmektedir. Bu basamakta hücreler geçici olarak nestin proteinini eksprese etmeyi durdurmakta ve doublecortin (DCX) proteini ve nöral hücre adezyon molekülü olan (PSA-NCAM)’ı eksprese etmeye başlamaktadırlar.

Üçüncü basamak (göç fazı): Olgunlaşmamış nöronlar DG'nin granül hücre tabakasına kısa mesafeli göç etmekte ve PSA-NCAM ve DCX'i birlikte eksprese etmeye başlamaktadırlar.

Dördüncü basamak (aksonal ve dendritik dallanma fazı): Bu fazda olgun olmayan nöronlar aksonal bağlantılarını lifler boyunca CA3 piramidal hücre tabakasına doğru uzatmakta dendritlerini ise zıttı yöne DG'ye doğru göndermektedirler. Bu faz boyunca yeni üretilmiş nöronlar postmitotiktir ancak hala doublecortin ve PSA-NCAM proteinlerini eksprese etmektedirler. Erken postmitotik nöronlar geçici olarak kalsiyum bağlayıcı protein kalretinin ve nöron spesifik nükleer protein (NeuN) eksprese etmektedirler.

Beşinci basamak (sinaptik bütünleşme fazı): Yeni granüler nöronlar EK'den girdi almakta, CA3 ve hilus bölgelerine dendritlerini göndermektedirler. Postmitotik hücreler yaklaşık 2-3 hafta sonra kalretinin proteini yerine olgun granül hücrelerinden kalbindin proteini eksprese etmektedirler. Kalbindin tüm olgun granül hücrelerinde eksprese edilmekte ve kalbindin eksprese eden hücreler hipokampusla fonksiyonel olarak bütünleşmektedirler. Bu nöronlar ayrıca postmitotik nöronal protein NeuN eksprese etmektedirler (46).



Şekil 4: Hipokampal nörojenezin evreleri ve nörojenezde önemli proteinler.

2.7. Nörojenezde Önemli Olan Proteinlerin Özellikleri

2.7.1. Nestin

Nöroepitelyal kök hücre proteini (*neuroepitelial stem cell protein*, nestin), tip VI ara filament proteinidir ve hücre iskeletinin ana bileşeni oluşturmaktadır. Ara filament proteinleri yaygın olarak hücre tipi belirteci olarak kullanılmaktadır. Bir hücre çoğunlukla birden fazla ara filament çeşidi eksprese etmektedir ve bu protein salınımı hücrenin

fizyolojik durumuna göre değişiklik göstermektedir (55). Ara filament proteinleri amino asit dizilimine, protein yapısına ve doku spesifik ekspresyon paternlerine göre gruplara ayrılmaktadır. C- terminali 1306 amino asit içeren Nestinin amino terminali diğer ara filament proteinlerinden çok daha kısadır. Terminal uçlardaki bu farklılık bir dizi yapısal proteine bağlanmaya izin vermektedir. Nestinin uzun karboksil ucunun ara filamentler, mikrofilamentler ve mikrotübüller arası bağlantı kurabildiği bu nedenle de bu üç hücre iskeleti bileşenin bağlanmasında ve hücre dinamiklerinin koordine edilmesinde rol oynadığı savunulmaktadır (56).

İlk olarak gelişmekte olan ve yetişkin beyindeki kök hücrelerde keşfedilen Nestin, vücuttaki pek çok dokuda mevcuttur (57–59). Kök hücreler bulunduğu mikroçevredeki homeostazı asimetrik bölünme ile sağlamaktadırlar. Bölünme süreci, hücre polaritesini uyaran bir dizi morfolojik değişiklik gerektirmektedir. Bölünen ya da göç eden hücrelerdeki morfolojik değişikliklerin gerçekleşmesi için proteinlerin son derece düzenli biçimlerde bir araya gelmesi ya da ayrılması gerekmektedir. Nestinin tüm bu özellikleriyle hücre iskeleti ve diğer hücre sel faktörlerin yavru hücrelere asimetrik dağılımında rol oynadığı görüşü hakimdir (60). Bu nedenle farklılaşmakta olan ya da farklılaşmış hücrelerde Nestin salgılanmamaktadır. Nestin'indiğer progenitor hücre belirteçleri olan BrdU ve Ki-67 ile beraber beyin nörojenik bölgelerinde eksprese edilmesi nedeniyle nöral kök hücre belirteci olduğu kabul edilmektedir (61).

2.7.2 Kalbindin

Kalbindin, yüksek geçirgenlikli dört adet Ca^{2+} bağlama bölgesine sahip sitozolik kalsiyum bağlayıcı proteindir. Ca^{2+} , hücre uyarımı sonrasında değişen ikinci haberci rolü oynayan bir sinyal molekülüdür. Hücre içi Ca^{2+} sinyalleri, Ca^{2+} kanalları yoluyla Ca^{2+} girişinden, hücre içi depolardan Ca^{2+} salınımindan kaynaklanmaktadır. Kalsiyum bağlayıcı proteinler hücre içindeki Ca^{2+} konsantrasyon değişimini algılayarak enzimlerin, kanalların ve yapısal proteinlerin aktivitelerini değiştirmektedirler (62). Kalbindin, ilk olarak bağırsaklarda keşfedilmiş olmasına rağmen ağırlıklı olarak merkezi sinir sisteminde eksprese edilmektedir (63). Hızlı kinetik özelliği ile Ca^{2+} bağlayan kalbindin,

Ca²⁺ için tampon ve sensor olarak görev yapmakta ve hücre içi serbest Ca²⁺'un taşınmasını sağlamaktadır (64). Hücre içi Ca²⁺ konsantrasyonundaki değişimler hücre bölünmesi, farklılaşması ve apoptoz gibi birçok hücre fonksiyonunun kontrol edilmesinde rol oynamaktadır. Ancak hücre içi serbest Ca²⁺ konsantrasyonunun sürekli olarak artması, sinaptik iletim, hücre iskeletinin korunması ve kalsiyum aracılı enzimatik reaksiyonlar gibi nöronal fonksiyonun temel özelliklerini etkileyebilmekte ve sonuçta hücre ölümüne yol açabilmektedir (65). Örneğin kalbindinin tamponlama özelliğinin, mitokondriye Ca²⁺ girişinin sınırlanmasına neden olduğu ve bu şekilde hücrelerin apoptoza gitmesini engellediği savunulmaktadır (66).

Hipokampüste hücre alt tipine göre ekspresyon paterni gösteren kalbindin, DG'ta olgun granül hücreler dahil glutamaterjik nöronlarda, yüzeyel CA1 piramidial nöronlarda, CA3 granül hücrelerde ve GABAerjik internöronların bir alt tipinde bulunmaktadır (67,68). Kalbindin hem aksonal butonlarda hem de dendritik dikenlerde mevcuttur. Kalbindin miktarı hipokampüsün diğer bölgelerine kıyasla DG hücrelerin neredeyse hepsinde yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır (69). DG'taki granül nöronların kalsiyum tamponlama kapasitesi yüksektir. Nöronlardaki aşırı aktivitenin hücre içi Ca²⁺ seviyesini arttırdığı, hücre içi kalsiyum artışının hücre ölümü gibi geri dönüşü olmayan hasarlara sebep olabileceği, bu nedenle de kalsiyum dinamiğini düzenleyebilen nöronların hasarlara karşı daha dayanıklı olabileceği düşünülmektedir (70). Kalbindin eksikliğinin davranışsal etkilerini araştıran bir çalışmada kalbindin ekspresyonu sıçanların hipokampüslerinin CA1 ve DG bölgelerinde viral olarak inhibe edilerek mekânsal öğrenmeleri değerlendirilmiştir. Deneyin sonucunda CA1 ve DG bölgelerindeki eksitatuvar nöronlardaki kalbindin eksikliğinin mekânsal belleği bozduğu ortaya konmuştur (71).

2.6.3 Sinaptofizin

Sinaptofizin toplam vezikül proteinlerinin %10'unu oluşturan ve tüm nöronal dokularda bulunan sinaptik vezikül membran proteinidir (72). Dört adet transmembran bölgesine sahip sinaptofizinin sitoplazmik C-terminalinden hem serin/treonin hem de tirozin tarafından fosforillenir. Sinaptofizin olgun sinir uçlarında fosfotirozin taşıyan ana

proteindir (73). Çalışmalar, tirozin fosforilasyonunun hipokampüsün CA1 bölgesinde uzun süreli potansiyasyon ile ilgili olduğunu öne sürmektedir çünkü bu bölgede uzun süreli potansiyasyon NMDA reseptörüne bağlı Ca^{2+} akışını ve serin/treoninin aktivasyonunu gerektirmektedir (74). Fonksiyonları tam olarak anlaşılmış olmamasına rağmen en çok çalışılmış presinaptik belirteç olarak ve nöronal sinaptik yoğunluk için yaygın olarak kullanılan bir proteindir (75).

Nörotransmitter salınımından sorumlu olduğu bilinen sinaptofizinin, yapılan çalışmalarda transmitter ekzositozunu kontrol ettiği savunulmaktadır (76). Kalsiyum bağlama, dinlenme durumunda beyin glikoz kullanımı, sinaptik vezikül membranında kanal formasyonu ve endositoz yoluyla sinaptik veziküllerin geri dönüşümü ile ilgili olduğu gösterilmiştir (76–78). Hipokampal sinaptofizinin eksikliğinde öğrenme ve bellek fonksiyonu etkilenmektedir. Schmitt ve ark.'nın (79) yaptıkları çalışmada sinaptofizinin ekspresyonu genetik olarak inhibe edilmiş ve Morris su labirenti testi analizi sonucunda öğrenme ve belleğin bozulduğu bildirilmiştir.

2.6.4. Nöronal Nükleer Antijen

Nöronal nükleer antijen (NeuN), ilk olarak nöron spesifik antikoru üretmek için yapılan immünojenik görüntüleme ile tanımlanmıştır (80). Olgun nöronlardan eksprese edilen NeuN, türler arasında büyük oranda korunmuştur ve sinir sisteminin belirli gelişim basamaklarında salgılanmaktadır. İmmünohistokimyasal olarak, nöronların hücre döngüsünden çıkışı ve/veya terminal farklılaşmanın başladığı gelişimsel aşamalarda görülmektedir (81). Nöron çekirdeklerinde yer alan NeuN, daha az oranda perinükleer sitoplazmada üretilmektedir. 46 ve 48 kDa olan iki izotopu her iki yerde de yer almakta, izoformlarının kısa bir aminoasit dizisinde farklılık gösterdiği ve bu farklılığın hücre içi yerleşimlerinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Anti-NeuN ya da NeuN antikoru sinirbilim, gelişimsel biyoloji, histoloji, kök hücre biyolojisi ve hastalık tanısı gibi alanlarda sıkça kullanılmaktadır (82).

2.8. Beyin Yaşlanmasında Etkin Olan Faktörler

Yaşlanma, fizyolojik bütünlükte meydana gelen değişikliklerle beraber vücut fonksiyonlarının kademeli olarak azalması olarak tanımlanmaktadır. Bu değişikliklerin getirdiği bozulmalar nörodejeneratif hastalıklar, kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve diyabet için birincil risk faktörüdür. Organizmayı zamanla ölüme karşı daha dayanıksız duruma getiren yaşlanma sürecinin ayırt edici özellikleri; genomik instabilite, telomer yıpranması, epigenetik değişiklikler, protein homeostazının bozulması, enerji substrat algılama mekanizmalarındaki yetersizlik, mitokondrial disfonksiyon, hücresel yaşlanma, kök hücre yıpranması ve hücre içi iletişimin değişmesi gibi sıralanabilir (3) (Şekil 4).



Şekil 5: Yaşlanmada görülen hücresel değişimler (3).

Beyin, kognitif bozulma ile ilişkili ve nörodejeneratif hastalıklar için büyük bir risk faktörü olan yaşlanma sürecinden moleküler, hücresel, morfolojik ve bilişsel olarak etkilenen bir organdır. Kırk yaşından sonra insan beyninin yılda %0,2- 0,5 arası atrofiye uğradığı belirtilmektedir (83). Toplamda 2,211 kişiyle yapılan boylamsal bir çalışmada 4-88 yaş arası bireyler değerlendirilmiştir. Sonuçta 9 yaşından 13 yaşına kadar beyin hacminin yılda %1 oranında arttığı, 18-35 yaş arasında ise hacmin korunma eğiliminde olduğu belirtilmiştir. 35 yaşından sonra ise beyin hacminin kademeli olarak azaldığı, bu azalmanın 60 yaşına kadar yılda %0,5 oranında olduğu, 60 yaşından sonra ise bu oranın arttığı bildirilmiştir (84). Yaşlanma süreci içinde gerçekleşen atrofinintüm bölgelerde aynı oranda gerçekleşmediği belirtilmektedir. Atrofiye ek olarak dendrit ve sinaps sayısındaki yaşa bağlı değişiklikler yaşlanan beyin neokorteks ve hipokampusünün farklı bölgeleri için değişiklik göstermektedir. Yaşlı insanların ve maymunların frontal korteksinde sinaps yoğunluğunun azaldığı, dolayısıyla yürütücü işlev görevleri gerçekleştirilirken prefrontal korteksin aktivasyonunun azalmasının bununla ilişkili olduğu öne sürülmektedir (85). Yaşlanma ile meydana gelen hacimsel azalmanın nedeninin nöron kaybından ziyade, beyaz maddedeki ve gri maddedeki bozulma, dendrit ve sinaps yoğunluğundaki azalma olduğu savunulmaktadır (85,86).

Yaşlanmaya bağlı oluşan atrofi nörojenezde önemli olan proteinleri de negatif yönde etkileyebilmektedir. Örneğin, sinaptofizinin izorformları olan SYP1 ve SYP2'nin de içinde olduğu proteinlerin ekspresyonunun, yetişkinlikten yaşlılığa olan süreçlerde azaldığı görülmüştür. Bu azalmanın, öğrenme ve hafıza oluşumunda yaşa bağlı bozulma nedeni olduğu savunulmaktadır (86). Ayrıca, dendrit ve sinaps yoğunluğundaki azalma ile paralel olarak nörotransmitter seviyelerinin erişkinlikle beraber yılda %1 oranında azaldığı ve bunun da kognisyon ve motor performanstaki bozulmayla ilişkili olduğu ifade edilmektedir (87) Nörotransmitter seviyesindeki azalmanın aynı zamanda monoamin oksidaz seviye artışına neden olduğu ve bunun da serbest radikal seviyelerini arttırdığı belirtilmektedir (88–90). Yaşlanmayla artan oksidatif stres hipokampüste de gerçekleşmektedir ve nöral fonksiyonun kaybında çok önemli bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Proinflamatuvar genlerin yaşlanmayla artması kronik inflamasyonu

beraberinde getirebilmektedir. Hipokampüsün oksidatif strese karşı görece daha dayanıksız olmasıyla sinaptik iletim ve bilişsel fonksiyonlar bu süreçlerden olumsuz olarak etkilenmektedir (91). Yaşa bağlı sinaps kaybının yaşlı sıçanlarda belirgin olarak hipokampüste DG’de meydana geldiği uzun zamandır savunulmaktadır (92). Bunun yanı sıra, sağlıklı yaşlı yetişkinlerde hipokampüsün aktivasyonu hafıza ile ilişkili görevlerde azaldığı belirtilmektedir. Fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme (fMRI) kullanılarak hipokampal kan akımının görüntülendiği bir çalışmada, resus maymunlarında yaşlılıktan en çok etkilenen hipokampüs bölgesinin DG olduğunu bildirilmiştir (93).

Yaşlanma ile meydana gelen en önemli değişikliklerden diğeri de hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunun artması ve mitokondriyal disfonksiyon gelişmesidir. Beyin dokusu yüksek enerji ihtiyacından ötürü diğer organlara göre büyük miktarda reaktif oksijen türleri üretmektedir. Yaşlanma ile hücre içine biriken reaktif türler L tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının açılmasına ve hipokampal nöronlara anormal miktarda Ca^{2+} girişine neden olmaktadır (95)(96). Yaşlanan beyinde ise zamanla azalan kalbindin miktarı hem sıçan hem de post-mortem insan beyin dokuları ile yapılan çalışmalarda ortaya konmaktadır (97). Post-mortem insan beyin dokularında yapılan bir çalışmada kalbindin seviyesi bazal ön beyin dokusunda değerlendirilmiş ve zamanla azalma eğilimi gösteren kalbindinin 65 yaşından sonra daha da hızlanarak azaldığı bildirilmiştir (98). Kalbindin gibi kalsiyum bağlayıcı proteinlerin az salgılanması mitokondriyi daha fazla Ca^{2+} almaya zorlayarak daha fazla serbest radikal üretimini, mitokondriyal fonksiyonun bozulmasını, protein oksidasyonunu ve apoptoz ile sonuçlanan süreçleri tetiklemektedir.

Nöronal hücrelerdeki Ca^{2+} düzeyi de bilişsel fonksiyonlarla ilgili önemli bir faktördür. Hipokampal nöronlarda bulunan N-methyl-D-aspartate (NMDA) reseptörleri Ca^{2+} geçişine izin veren hem ligand hem de voltaj kapılı iyon kanallarıdır. Normal koşullarda Mg^{+} ile bloke olan NMDA reseptörleri glutamatın bağlanmasıyla ya da membranın depolarize olmasıyla Ca^{2+} iyonlarının geçişine izin vermektedir. NMDA reseptörleri yoluyla Ca^{2+} akışının sinapsları güçlendirdiği ve Ca^{2+} ‘un uzun süreli potansiyanyon için önemli olduğu düşünülmektedir (99). Bu bağlamda yapılan çalışmalarda uzun süreli potansiyasyonun Ca^{2+} bağlayıcı bir protein olan kalbindin

düzeyinden etkilendiği ve ayrıca bu durumun devamlılığının mekansal öğrenmeye zarar verebildiği gösterilmiştir (100). Bu veriler DG'taki düşük kalbindin seviyesinin hipokampal bağımlı belleğin bozulmasını ilişkilendiren Li ve ark. (101) çalışması ile tutarlılık göstermektedir. Çalışmada erken yaşam stresinin kalbindin seviyesini azalttığı, bu azalmanın da mekansal bellek ile ilişkili olduğu bildirilmiştir.

Nöral kök hücrelerin yaş ile değişen özellikleri ve bu hücrelerin çoğalma yeteneklerinin azalması yaşlanmada etkin olan diğer bir faktördür. Genomik istikrarsızlık, telomer kısalması, hücre metabolizmasının bozulması, inflamasyon, reaktif oksijen türlerinin üretimindeki artış da nöral kök hücrelere zarar vermektedir [4]. Hücresel düzeydeki tüm bu bozulma sistemik çevredeki yaşlanmayla birlikte gerçekleşmektedir. Yaşlanan organizmaya ait dolaşımdaki kan, beyin-omurilik sıvısı ve lenf dolaşımı nöral kök hücrenin içinde bulunduğu çevreyi etkilemekte, proinflamatuvar mediatörler daha fazla salgılanmakta ve mikroçevrenin bozulmasına yol açmaktadır [51]. Hipokampüsteki yaşlanan nöral kök hücreler zamanla bulunduğu çevre içerisinde birikerek hücrelerin rejenerasyon kapasitesini ve homeostatik dengesini etkilemektedir. Yaşlı hücreler niş içerisinde proinflamatuvar proteinler, kemokinler ve interlökinler salgılamakta ve etraflarındaki hücreleri etkileyerek yaşlanma-ilişkili salgı fenotipi (*senescence-associated secretory phenotype, SASP*) oluşmasına katkıda bulunmaktadır. SASP aktivitesinin, lokal çevredeki diğer hücrelerin fonksiyonunu etkileyerek iç mekanizmaların değişmesine ve mevcut hücresel disfonksiyonun yayılmasına neden olduğu savunulmaktadır (102).

Beyinde morfolojik ve moleküler düzeyde meydana gelen bu değişiklikler beyin fonksiyonlarını etkilemektedir. Yaşlanan beyinde meydana gelen yapısal değişikliklere eşlik eden kognitif bozulma 60-75 yaşları arasında belirgin hale gelmekte, bu yaş aralığı ise nörodejeneratif hastalıkların başlangıç gösterdiği zaman olarak bilinmektedir [82]. Kognitif bozulma daha çok mental hız, yürütücü işlevler, epizodik hafıza fonksiyonlarında görülmektedir (103,104). Epizodik hafıza, bilginin 'nerede', 'ne zaman' ve 'nasıl' olduğu bilgisi ile saklanmasıdır ve 50-60 yaşlarından itibaren azalmaya başlamaktadır (105). Yaşlanma sürecinde sözel yetenekler ve kelime bilgisi genellikle korunan kognitif fonksiyonlar olarak bilinmekle beraber, hafıza, dikkat, planlama, çalışma hafızası,

bilginin işleme hızı gibi işlevler yaşlanma ile birlikte kademeli olarak azaldığı bildirilmektedir (106).

Yaşlılık mekanizmalarının ve yaşlanmanın fonksiyonel etkilerinin aydınlatılmaya başlamasıyla yaşlanma sürecini yavaşlatacak veya tersine çevirecek uygulamalar da gelişim göstermektedir. Bu bağlamda yapılan bilimsel çalışmalar diyet, farmakolojik yaklaşımlar ve yaşam tarzı gibi davranışsal değişiklikler ile daha uzun ve sağlıklı bir yaşamı hedeflemektedir (107). Polifenoller yaşa bağlı kronik hastalıklardan ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklardan korunmak ve hatta bu hastalıkların etkilerini yavaşlatmak için kullanmak son yıllarda önem kazanmıştır. Polifenoller ile yaşlanmaya bağlı beyinde gerçekleşen süreçlere müdahale etmek pek çok yönüyle umut verici bir yaklaşımdır.

2.9. Polifenoller ve Zeytinyağı

Polifenoller çoğunlukla meyvelerde, sebzelerde, çaylarda, baharatlarda ve yenilebilir bitkilerde bulunan bir ya da daha fazla hidroksil grubu ve aromatik halkadan oluşan, günümüzde 8000'den fazla çeşidi bilinen bileşiklerdir (108). Lipofilik özellik gösteren polifenoller kan beyin bariyerini daha kolaylıkla geçebilmektedirler (109). Polifenollerin biyolojik olarak fonksiyon göstermesi hücre yüzeyine temasları ve plazma membranından sitoplazmaya geçmeleriyle başlamaktadır. Polifenollerin difüzyon, osmotik kararlılık, suda çözünebilen maddelere olan geçirgenlik gibi pek çok membran özelliğini etkilediği belirtilmektedir (110,111). Hücre içinde antioksidan özelliklerinin yanı sıra hücre metabolizmasının düzenleyicisi gibi özellik gösterebilmektedirler (112). Polifenoller proteinlerle, lipitlerle ve polinükleotidlerle elektrostatik, hidrofobik ve hatta kovalent bağlanma yoluyla etkileşime girmekte, bu da hücrenin dolayısıyla organizmanın fonksiyonlarını etkilemektedir (113).

Akdeniz diyeti terimi Ancel Keys'in İtalyan ve Yunan popülasyonlarının diğer popülasyonlara kıyasla daha düşük ölüm oranlarına, kardiyovasküler ve kanser insidansına sahip olmalarıyla ilgili yaptığı epidemiyolojik araştırmasının sonucunda literatüre girmiştir (114). Akdeniz diyeti yüksek miktar tahıl, sebze, kuru baklagil, meyve

ve doymamış yağ asitleri (çoğunluğu zeytinyağından gelen); düşük miktar kırmızı et, kümes hayvanları eti, doymuş yağ asitleri ve az miktarda balık, süt ve süt ürünleriyle yine düzenli fakat az miktarda ethanol (genellikle şarap) tüketimini içermektedir. Akdeniz diyetinde temel yağ kaynağı zeytinyağıdır. Akdeniz popülasyonlarında tahminen günde 25 ve 50 mL arası zeytinyağı tüketilmektedir. Zeytinyağının içinde yaklaşık 230 farklı kimyasal içerik bulunmaktadır. Bunlar; alifatik ve triterpenik alkoller, steroller, hidrokarbonlar, uçucu ve fenolik bileşenlerdir. Zeytinyağının sağlık açısından sağladığı yararlar sadece yüksek tekli doymamış yağ asidi içeriğine değil, yüksek bioaktif özelliklere sahip mikro-bileşenlerine de dayanmaktadır. Bu mikro-bileşenler arasında hidroksitirozol (HT), tirozol, kafeik asit, oleuropein aglikon ve oleokantal gibi fenolik bileşikler bulunmaktadır (115). Akdeniz ülkelerinde günlük zeytinyağı tüketimi 25 g ile 50 g arasındadır. Zeytinyağındaki polifenollerin miktarı, bitki çeşidine ve tarımsal uygulamalara bağlı olmakla birlikte düşük polifenol içeriği olan zeytinyağı 200 mg/kg'dan daha az polifenol içermektedir. Bu miktar, orta miktarda polifenol içeren zeytinyağında 200-600 mg/kg, yüksek polifenollü zeytinyağında ise 600 mg/kg'dan fazladır (116).

Zeytinyağı polifenollerinin yaşlanma ile ilgili süreçlere olan yararlı etkileri insan çalışmaları dahil olmak üzere hayvan çalışmalarıyla ve in vitro çalışmalarla desteklenmektedir. Bu yararlı etkiler arasında inflamatuvar yolların inhibisyonu, hücre sağ kalımı ve korunması ile ilişkili yolların aktivasyonu ve enerji metabolizması ile ilgili yolları düzenlemek bulunmaktadır (117). Zamanla hasar biriktirme eğiliminde olan genetik materyal yaşlanma süreci için biyolojik bir belirteçtir (3). Quiles ve arkadaşlarının (118) Wistar sıçanlarda zeytinyağı ve ayçiçek yağı kullanarak yaptıkları araştırmada zeytinyağı ile beslenen hayvanların periferik kan lenfositlerinde DNA çift zincir kırılmalarının daha düşük seviyede olduğunu bildirmişlerdir. Yaşlanmanın başka bir belirteci olan epigenetik süreçlerdeki değişiklikler de zeytinyağında bulunan polifenoller tarafından düzenlenmektedir. Örneğin yüksek polifenollü zeytinyağı histon asitilasyonu ile epigenetik değişikliklere neden olabilir. Yapılan bir in vitro çalışmada yüksek polifenol

içerikli zeytinyağında bulunan bazı fenolik içeriklerin JIMT-1 göğüs kanseri hücre hattında histon H3'ün hiperasetilasyonunu uyardığı gösterilmiştir (119).

Polifenollerin oksidatif stres ve inflamasyon gibi yaşlanmayı tetikleyen etkilerin azalmasında yararlı etkileri olduğu bildirilmiştir. Bu etkilerin bir sonucu olarak polifenollerin, yaşlı sıçanlarda hipokampal fonksiyonları düzelttiği, çalışma hafızasını ve epizodik hafızayı, öğrenmeyi ve motor koordinasyonunu geliştirdiği savunulmaktadır (120,121). 6 hafta boyunca yüksek polifenol içeren zeytinyağının SAMP8 farelere uygulandığı bir çalışmada öğrenme ve hafıza üzerine faydalı etkiler gözlemlenmiştir. Beyin dokusunda GSH ve 3-nitrotirosin seviyeleri artmış, süperoksit dismutaz ve GSH redüktaz aktiviteleri yükselmiştir. Bu yönüyle yüksek polifenollü zeytinyağının beyindeki oksidatif hasarın geri çevrilmesinde rolü olduğu belirtilmektedir (120). Bunun yanı sıra, Zeng ve ark. (122) yaptığı çalışmada maternal dönemde HT uygulanan sıçanlarda (10 ve 50 mg/kg, gavaj), prenatal stresin neden olduğu bozulmuş nörojenezin ve kognitif fonksiyonların iyileştiği görülmüştür. Bu iyileşmenin HT'nin nöral proteinler (BDNF, GAP43 ve sinaptofizin gibi) glukokortikoid reseptörleri ve antioksidan savunma sistemi (Nrf2, süperoksit dismutaz ve HO-1) üzerindeki olumlu etkileri ile gerçekleştiği savunulmaktadır. Zeytinyağı polifenolleri ile yapılan en son çalışmada zeytinyağı polifenollerinden HT sıçanların içme suyuna karıştırılarak 30 gün boyunca verilmiş ve nörojenez etkisi immunohistokimya yöntemi ile incelenmiştir. Yapılan analiz sonucunda HT'nin yaşlı ve genç farelerin hipokampusundeki yeni doğan nöronların hayatta kalımına katkıda bulunduğu, yaşlı farelerde kök hücre ve progenitör hücrelerin çoğalmasını arttırdığı gösterilmiştir (123).

Polifenollerin hipokampal fonksiyonlara etkisini kemirgenler üzerinde gösteren pek çok çalışma olsa da zeytinyağının, özellikle yüksek polifenol içerikli zeytinyağının, hipokampus bağımlı fonksiyonlara nörojenez ile ilişkili olarak etkisini inceleyen çalışma literatürde henüz bulunmamaktadır. Günlük zeytinyağı tüketiminin hipokampal nörojenez ve prefrontal kortekse moleküler etkisini gösteren bir çalışma da mevcut değildir. Zeytinyağı ülkemizde önemli bir besin kaynağıdır. Zeytinyağındaki polifenol içeriği tarımsal uygulamalarla değişiklik gösterse de tüketilen zeytinyağları polifenol

bakımından oldukça fakirdir. Bu nedenle polifenolden zengin zeytinyağının, hipokampüsün ve prefrontal korteksin moleküler ve davranışsal etkisini incelemek önemlidir. Bu nedenle yapılan bu çalışmada yüksek polifenol içerikli zeytinyağı tüketiminin yaşlı beyinde hipokampal nörojenez, sinaptik bütünlüğe, hipokampüs bağımlı mekansal öğrenmeye ve anksiyete benzeri davranışa etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda yapılan çalışmada, zeytinyağı polifenollerinin yaşlı sıçanlarda DG'de bulunan nöral progenitör hücrelerin çoğalmasına ve sağkalımına etkisinin incelenmesi hedeflendi. Bunun yanı sıra, nöral hücrelerin olgunlaşma fazlarının ilk evresini ifade eden bir biyobelirteç olan Nestinin; fonksiyonel hücreleri ve sinaptik bütünlüğü ifade eden Kalbindinin hipokampüsteki miktarlarının incelenmesiyle çoğalan nöral hücrelerin evrelerinin belirlenmesi amaçlandı. Fonksiyonel hücreleri ve sinaptik bütünlüğü ifade eden Sinaptofizin proteinin hipokampüs ve prefrontal kortekste miktarları saptandı. Zeytinyağı polifenollerinin günlük tüketiminin öğrenme ve belleğe etkisi Morris su labirenti testi ile; anksiyete ile olan fonksiyonel ilişkisi ise açık alan testi ve yükseltilmiş artı labirent testi ile araştırıldı.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırma deneysel ve in vivo bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri, Zamanı ve Planı

Araştırma Eylül 2020-Haziran 2021 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarları, Dokuz Eylül Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları ve Dokuz Eylül Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Araştırmanın planı Tablo-1'de gösterilmiştir.

Tablo3: Araştırma planı

Şubat-Eylül 2019	Projenin hazırlanması
	Etik kurul onayı
Eylül-Ekim 2019	Tez önerisi sunumu ve kabulü
Mart-Eylül 2020	Projenin kabulü
	Malzeme alımları
Ekim-Aralık 2020	Deney gruplarının oluşturulması ve hayvanların beslenmesi
	Davranış testlerinin uygulanması
	Sakrifikasyon ve dokuların saklanması
Şubat-Haziran 2021	Dokuların homojenizasyonu
	Örneklerdeki proteinlerin miktarının ELISA yöntemi ile belirlenmesi
	İmmün boyama ile dokuların histolojik analizi
Temmuz-Aralık 2021	Verilerin istatistiksel analizi
	Tez yazımı

3.3. Çalışma Materyali

Bu çalışmada 51 adet 250-350 g ağırlığında dişi Sprague Dawley sıçan kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan sıçanlar Dokuz Eylül Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı'ndan 36 adedi 20-22 aylık, 10 adedi 7 aylık olarak temin edilmiştir.

3.4. Araştırmanın Değişkenleri

Bağımlı değişken: Açık alan testi, yükseltilmiş artı labirenti testi, Morris su labirenti testi sonuçları ve nestin, kalbindin, sinaptofizin, BrdU, NeuN protein düzeyleridir.

Bağımsız değişken: Yüksek ve düşük polifenol miktarına sahip zeytinyağı ile beslenmedir.

3.5. Veri Toplama Araçları

3.5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

Tablo 4: Kullanılan sarf malzemeler

Malzeme Adı	Markası/Kod	Kullanım Amacı
Zeytinyağı	TUAY (Turgut Anadolu Yatırım Ltd. Şti)	Oral yolla deney hayvanlarına zeytinyağı verilmesi
Rıpa Buffer	Thermo	Doku homojenizasyonu
Fosfat Tamponlu Tuz	Cegrogen	Doku homojenizasyonu ve protein tayini
BrdU	Abcam, ab142567	Hücre çoğalmasını belirlemek için sıçanlara enjekte edilen ajan
BrdU Antikoru	Bioss, Bs-1613R	Proteinleri etiketlemede kullanılan antikor
Fox3/Neun Primer Antikor	SantaCruz, Sc - 51514	Proteinleri etiketlemede kullanılan antikor
Triton 100-X	Aplichem	Dokuları fikse etmek için kullanılan ajan
Optimum Doku Kesme Solüsyonu	Aplichem	Dokuları kesmek için kullanılan solüsyon
Alexa Fluor 594 Goat Anti-Mouse Igg Secondary Antibody	Thermo, A11005	Proteinleri etiketlemede kullanılan antikor

Alexa Fluor 488 Goat Anti-Mouse Igg Secondary Antibody	Thermo, A11001	Proteinleri etiketlemede kullanılan antikor
Renk Atma Önleyici, Antifade	Aplichem	Proteinleri etiketlemede kullanılan kimyasal
Normal Goat Serum	Cegrogen	Proteinleri etiketlemede kullanılan serum
Normal Donkey Serum	Cegrogen	Proteinleri etiketlemede kullanılan serum
Rat Kalbindin Elisa Kit	MYBioSource, MBS454101	Kalbindin miktarı analizinde kullanılan kit
Rat Nestin Elisa Kit	BT-Lab, E1174Ra	Nestin miktarı analizinde kullanılan kit
Rat Synaptophysin Elisa Kit	Cusabio, CSB-E13827r	Sinaptofizin miktarı analizinde kullanılan kit
Mikrosantrifüj Tüpü 2 ml	Greiner	Örneklerin saklanması için malzeme
Mikrosantrifüj Tüpü 1.5 ml	Greiner	Örneklerin saklanması için malzeme
Steril Enjektör 5 cc	Baby	Sıçanlara enjeksiyon yapmak için enjektör
Steril Enjektör 1 cc	Baby	Sıçanlara enjeksiyon yapmak için enjektör
Mikrotom Bıçağı 50'Lik	Feather	Dokuları kesmek için kullanılan kesici
Mikropipet Ucu 1000 ul	Greiner	Pipetlemede kullanılan pipet ucu
Mikropipet Ucu 2-200 ul	Greiner	Pipetlemede kullanılan pipet ucu
Mikropipet Ucu 1-10 ul	Greiner	Pipetlemede kullanılan pipet ucu

Tablo 5: Kullanılan cihazlar

Malzeme Adı	Markası/Kod	Kullanım Amacı
Morris su tankı	Noldus Ethovision XT video tracking sistemi	Hipokampal- bağımlı mekansal öğrenme ve hafızayı değerlendirmek için kullanılacaktır.
Yükseltilmiş T-maze testi	Noldus Ethovision XT video tracking sistemi	Deney hayvanlarında anksiyete değerlendirmesi için kullanılacaktır.
Işık mikroskop	Olympus DP70	Etiketlenmiş hücrelerin sayımı için kullanılacaktır
Mikrotom	Leica, RM 2255	Alınan doku örneklerinin kesilmesi amacıyla kullanılacaktır
Dijital kamera	Olympus DP71	BrdU ve NeuN görüntülenmesinde kullanılacaktır.
Dijital pH metre	Thermo, Orion 3 Star	Çalışmada hazırlanan tampon solüsyonlarının pH'sını kontrol etmek amacıyla kullanılacaktır.
Santrifüj	Sigma, 1-14	Dokularda süpernatanı ayırmak için kullanılacaktır

Etüv	Dedeoğlu	Belirli sıcaklıkta ısıtma ve kurutma amaçlı olarak kullanılacaktır.
-86 °C Derin dondurucu	Sanyo, MDF-U5386S	Çalışmada dokuların dondurulması ve saklanması için kullanılacaktır
Hassas terazi (0,1 mg hassasiyetli)	Shimadzu, AW120	Dokular ve çalışmalarında hazırlanacak solüsyonlar için tartım işlemlerinde kullanılacaktır
Otomatik pipet seti	Eppendorf	Reaktiflerin hazırlanması ve deney kitlerinin uygulanması için kullanılacaktır
Buzdolabı (No-frost 435 lt)	Beko, BK-9551 NF Multi Hijyen	Reaktifler, poliklonal ve monoklonal antikor kitlerini saklamak amacıyla kullanılacaktır
Buz yapma makinesi	Scotsman, AF 80	Dokuları belirli soğuklukta muhafaza etmek için kullanılacaktır
Bidistile su cihazı	Milipore, 2004	Bidistile su gereksinimini karşılamak için kullanılacaktır.
Vortex 4S	Finepcr Finevortex 4S	Kullanılacak solüsyonları karıştırmak için kullanılacaktır.
Monokromatik sistemli mikropilaka okuyucu		ELISA tesleri ile protein tayini için kullanılacaktır
Plak yıkayıcı	BioTEK	ELISA teslerinde plak yıkamalarında kullanılacaktır

3.5.2. Deney Grupları ve Deney Planı

Çalışma toplamda 51 adet 250-350 g ağırlığında dişi Sprague Dawley sıçan kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan sıçanlar Dokuz Eylül Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı'ndan 36 adedi 20-22 aylık (yaşlı grup), 10 adedi 7 aylık (genç grup) olarak çalışmaya dahil edilmiştir. 12 saat aydınlık 12 saat karanlık periyotta, 21-22°C oda sıcaklığında ve %40-60 nem içeren ortamda tutulan hayvanlar poliüretan kafeslerde, her kafeste üç ya da dört hayvan olacak şekilde barındırılmıştır. Hayvanlar deney süresince yem ve suya serbest erişim sağlamışlardır.

Hayvanların ağırlıkları ve kafes başına tüketilen yem miktarı haftada bir defa olacak şekilde takip edilmiştir. Toplamda dört tane deney grubu oluşturulmuş, hayvan seçimi rastgele yapılmıştır. Tüm hayvanlar oral gavaj yoluyla altı hafta boyunca gruplarına göre su, düşük polifenollü zeytinyağı ve yüksek polifenollü zeytinyağı ile beslenmiştir. Her gruptan üç adet sıçan (n=3) immün boyama yöntemi için kullanılmış ve bu gruba davranış testleri uygulanmamıştır. Diğer hayvanlara ise davranış testleri uygulanmış ve dokularda biyokimyasal analizler yapılmıştır.

Yaşlı kontrol grubu (YK, n=10): 20-22 aylık sıçanlara altı hafta boyunca 1 mL su, oral gavaj yöntemi ile sabah 10.30-11.30 arasında verilmiştir. Su uygulamasının amacı diğer gruplarda gavaj uygulaması nedeniyle oluşacak stresi kontrol grubunda da standardize etmektir.

Bu gruptaki üç hayvan nörojenezin immünohistokimyasal yöntem ile tespiti amacıyla deneyin başlamasından sonraki 14. günden itibaren bir hafta boyunca günde bir kere, steril %0,9 NaCl içerisinde 10 mg/ml olarak hazırlanmış, 85 mg/kg (vücut ağırlığı başına) dozajında sabah 11.30-12.30 saatleri arasında BrdU enjekte edilmiştir (n=3). Üç hayvan ayrı kafeste barındırılmış ve hayvanlara davranış testi uygulanmamıştır. Kalan hayvanlara herhangi bir enjeksiyon uygulanmamış, altı hafta sonunda davranış testi uygulanmış ve analizler için kullanılmıştır (n=7).

Yaşlı düşük polifenol grubu (YDP, n=12): 20-22 aylık sıçanlara altı hafta boyunca 1 mL düşük polifenol içeriğine sahip zeytinyağı oral gavajla sabah 10.30-11.30 arasında verilmiştir.

Bu gruptaki üç hayvana nörojenezin immünohistokimyasal yöntem ile tespiti amacıyla deneyin başlamasından sonraki 14. günden itibaren bir hafta boyunca günde bir kere, steril %0,9 NaCl içerisinde 10 mg/ml olarak hazırlanmış, 85 mg/kg (vücut ağırlığı başına) dozajında sabah 11.30-12.30 saatleri arasında BrdU enjekte edilmiştir (n=3). Üç hayvan ayrı kafeste barındırılmış ve hayvanlara davranış testi uygulanmamıştır. Kalan hayvanlara herhangi bir enjeksiyon uygulanmamış, altı hafta sonunda davranış testi uygulanmış ve beyin dokuları analizler için kullanılmıştır (n=9).

Yaşlı yüksek polifenol grubu (YYP, n=12): 20-22 aylık sıçanlar altı hafta boyunca 1 mL yüksek polifenollü zeytinyağı oral gavajla sabah 10.30-11.30 arasında beslenmiştir.

Bu gruptaki üç hayvana nörojenezin immünohistokimyasal yöntem ile tespiti amacıyla deneyin başlamasından sonraki 14. günden itibaren bir hafta boyunca günde bir kere, steril %0,9 NaCl içerisinde 10 mg/ml olarak hazırlanmış, 85 mg/kg (vücut ağırlığı

başına) dozajında sabah 11.30-12.30 saatleri arasında BrdU enjekte edilmiştir (n=3). Üç hayvan ayrı kafeste barındırılmış ve hayvanlara davranış testi uygulanmamıştır. Kalan hayvanlara herhangi bir enjeksiyon uygulanmamış, altı hafta sonunda davranış testi yapılmış ve beyin dokuları analizler için kullanılmıştır (n=9).

Genç yüksek polifenol grubu (GYP, n=10): 7 aylık sıçanlar altı hafta boyunca 1 mL yüksek polifenollü zeytinyağı oral gavajla sabah 10.30-11.30 arasında beslenmiştir.

Bu gruptaki üç hayvana nörojenezin İHK yöntem ile tespiti amacıyla deneyin başlamasından sonraki 14. günden itibaren bir hafta boyunca günde bir kere, steril %0,9 NaCl içerisinde 10 mg/ml olarak hazırlanmış, 85 mg/kg (vücut ağırlığı başına) dozajında sabah 11.30-12.30 saatleri arasında BrdU enjekte edilmiştir (n=3). Üç hayvan ayrı kafeste barındırılmış ve hayvanlara davranış testi uygulanmamıştır. Kalan hayvanlara herhangi bir enjeksiyon uygulanmamış, altı hafta sonunda davranış testi yapılmış ve beyin dokuları analizler için kullanılmıştır (n=7).

2.5.1. Yüksek Polifenollü Zeytinyağının Elde Edilmesi

Çalışmamızda kullanılan zeytinyağı TUAY (Turgut Anadolu Yatırım Ltd. Şti) markasına ait olup üretici tarafından şu aşamalardan geçerek elde edilmiştir: olea europaea “memecik çeşidi” meyveleri Gutiérrez, Jimenez, Ruiz, and Albi'nin (124) yayınladıkları indexe göre 1 ve 2 no'lu olgunlaşma evrelerinde iken, erken hasat döneminde Muğla ve Aydın'ın farklı bölgelerinden zirai ilaç ve gübre kullanılmamış organik bahçelerinden el ile toplanmıştır. Hasat edilen meyveler, birkaç saat içerisinde soğuk sıkım yöntemi ile sıkım prosesine tabi tutulmuştur. Zeytin hamuru hazırlanırken, öncelikle zeytin; bıçaklı kırıcılar yardımı ile kırılarak hamur haline getirilmiştir. Sonrasında 18-24 derece ısı aralığındaki dikey malaksörlerde 15 dakika yoğurulmuştur. Yoğurulma işleminden sonra 2-fazlı dekantörde fiziksel ayrıştırma işleminden sonra, elde edilen ürün (EVOO zeytinyağı + zeytin yaprağı karışımı) paslanmaz krom alaşımlı tanklarda inert argon gazı altında 18-22 derece ortam ısısında saklanmıştır. Zeytinyağı polifenol oranını yükseltecek tarzda tasarlanmış özel bir sıkım hattı kullanılmıştır. Zeytinyağları 200 ml kahverengi ecza

şişelerinde ambalajlanıp bu şişeler 18-22 derece ortam ısısındaki özel iklimlendirilmiş odalarda muhafaza edilmiştir.

Elde edilen zeytinyağı analiz için Tarım ve Orman Bakanlığı Aydın Gıda Kontrol Laboratuvarında Türk Standartları Enstitüsü (TSE) kriterleri ve standartlarına göre analiz edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda çalışmamızda kullanılan yüksek ve düşük polifenollü zeytinyağının içeriği Tablo 1 ve Tablo 2’de gösterilmiştir (Ek-3).

Tablo 1: Yüksek polifenollü zeytinyağı analiz sonuçları

Analiz	Sonuç	TSE standartı
Serbest Yağ Asidi (%)	0,30	TS EN ISO 660
Toplam Biofenol Miktarı (mg/kg)	668	COI/T.20/Doc.No.29
Peroksit Değeri (meq aktiofoksijen/kg yağ)	5,64	TS EN ISO 3960

Tablo 2: Düşük polifenollü zeytinyağı (riviera) analiz sonuçları

Analiz	Sonuç	TSE standartı
Serbest Yağ Asidi (%)	0,34	TS EN ISO 660
Toplam Biofenol Miktarı (mg/kg)	77	COI/T.20/Doc.No.29
Peroksit Değeri (meq aktiofoksijen/kg yağ)	7,90	TS EN ISO 3960

3.5.3. Mekansal Öğrenme ve Hafızanın Değerlendirilmesi

Morris Su Labirenti Testi

Hipokampal-bağımlı mekansal öğrenme ve hafıza testidir. Bu test laboratuvar hayvanlarında mekansal öğrenme ve hafızanın araştırılmasında kullanılmak üzere, 1980’li yıllarda Richard Morris tarafından tanımlanmıştır (125).

Altı haftalık beslemenin sonunda Morris su tankı kullanılarak mekansal öğrenme ve hafıza deneyleri gerçekleştirildi. Havuzun bulunduğu odanın duvarlarına farklı renk ve şekilde görsel ipuçları yerleştirilerek, sıçanların bu işaretleri kullanarak yönlerini belirlemesi sağlandı. Testte belirli bir seviyeye kadar su doldurulmuş yuvarlak bir havuz ve havuzun bir çeyreğinde (kadran) suyun birkaç santimetre altında sudan kaçmaya yarayacak bir platform yerleştirildi. Tankın merkezinden yaklaşık 2 m yükseklikte sıçanların davranışlarını izlemek ve kaydetmek üzere bir video kamera sistemi kuruldu. Her test gününde sıçanlar tankı ayıran dört kadranın bir yönünden başlamak üzere yüzleri havuz kenarına dönük olarak suya bırakıldı ve maksimum 60 sn yüzmelerine izin verildi. Eğer 60 sn içinde platformu bulamazsa 15 sn üstünde kalması sağlandı. Her sıçan dört kadranın dört yönünden de suya bırakılacak şekilde günde dört deneye tabi tutuldu. Her deneyin tamamlanmasından sonra sıçanlar platform üzerinden alınarak kurulandı ve kafeslerine yerleştirildi. Bu işlemler ard arda dört gün tekrarlandı. Böylece her sıçana dört gün toplam 20 deney uygulandı. Beşinci gün her sıçana bir araştırma deneyi (*probe trial*) uygulandı. Platform havuzdan kaldırılarak sıçanın 60 saniye yüzmesine izin verildi. Davranışsal veriler, yüzme mesafesi, platformun olduğu kadranda geçirdiği süre ve her kadranda harcadığı süre olarak Noldus Ethovision XT video izleme sistemi kullanılarak değerlendirildi.

3.5.4. Anksiyete Benzeri Davranışın Değerlendirilmesi

Açık Alan Testi

İlk olarak, 1930’larda geliştirilmesiyle hayvanlardaki arama davranışının araştırılmasında kullanılan açık alan testi günümüzde anksiyetenin ve lokomotor aktivitenin

değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Anksiyete değerlendirmesinde kemirgenler için stresli bir ortam olarak kabul edilen açık alan testinde denekler orta alanda olmaktan kaçınmakta ve duvarlara yakın yürüme davranışı (tigmotaksis) göstermektedirler. Bunların dışında hayvanın ayağa kalkma hareketi ve kaçınma süresi gibi parametrelere de bakılmaktadır.

Çalışmada altı haftalık beslemenin sonunda açık alan testi için 1 m uzunluğunda × 1 m genişliğinde × 1 m yüksekliğinde üstü açık kutu şeklinde deney düzeneği kullanıldı. Deney hayvanı bu alanın ortasına bırakıldı ve 5 dakika boyunca kamera kaydedildi. Her denekten sonra test alanı %70'lik alkol ile deneğe ait kokuyu kaldırmak için temizlendi. Hayvanın test alanının kenarlarında ve ortasında geçirdiği süreler, toplam gezinme mesafesi, kenar ve orta alana giriş sayısı Noldus Ethovision XT yazılımı takip edilerek analiz edildi.

Yükseltilmiş Artı Labirent Testi

Deney hayvanlarında anksiyete değerlendirmesi için kullanılan yaygın bir testtir (126). Yükseltilmiş artı labirent testinde sıçan ya da fare açık alan testinde olduğu gibi merkez bölgeye konulur. Kafesinden alınan denekte yeni çevre ve yükseklik anksiyeteye yol açar. Artan anksiyeteyle kapalı kolda geçen süre, kapalı kola girme sayısı, kapalı kolda geçen sürenin yüzdesi artar. Anksiyetenin azalmasına bağlı olarak da açık kolda geçen süre ve açık kola girme sayısı artar. Bunların dışında açık alan testinde olduğu gibi iki ayağı üzerine kalkma sayısı, kaçınma süresi, dışkılama sayısı gibi parametrelere de bakılır.

Bu çalışmada da yüksek polifenol içerikli zeytin yağının anksiyete üzerindeki etkisini incelemek amacıyla yükseltilmiş artı labirent testi uygulandı. Yükseltilmiş artı labirent testi için zeminden 75 cm yükseklikte, merkezde 5×5 cm'lik bir merkez platform ile yanlarda 50 cm uzunluğunda, 10 cm genişliğinde, 0,5 cm yüksekliğinde duvarları bulunan iki açık ve 50 cm uzunluğunda, 10 cm genişliğinde, 40 cm yüksekliğinde duvarları bulunan iki kapalı koldan oluşan bir düzenek kullanıldı. Deney hayvanı açık kollardan birine bakacak şekilde merkez platforma bırakılarak 5 dakika boyunca kamera

ile izlendi, açık ve kapalı kollara giriş sayısı ile merkez platformda ve kollarda geçirilen süre ölçüldü. Her denekten sonra test platformu %70'lik alkol ile deneğin kokusunu önlemek için temizlendi. Deney hayvanlarının kayıt ve analizinde Noldus Ethovision XT video tracking sistemi kullanıldı.

3.5.5. Sakrifikasyon ve Doku Örneklerinin Alınması

Davranış testlerinin bitiminden sonraki gün karbondioksit anestezisi altında sıçanların sol kardiyak ventrikülünden tüm kanları alınarak yaşamları sonlandırıldı. Histolojik inceleme yapılacak beyin dokuları fiksasyon için oda sıcaklığında %10 formalin çözeltisi içerisine konmuştur. Biyokimyasal analiz yapılacak hipokampus ve prefrontal korteks dokuları ise ayrıldı ve PBS'te yıkanarak analizlerin yapılacağı güne kadar -80°C'de saklandı.

3.5.6. Beyin Dokularının Homojenizasyonu

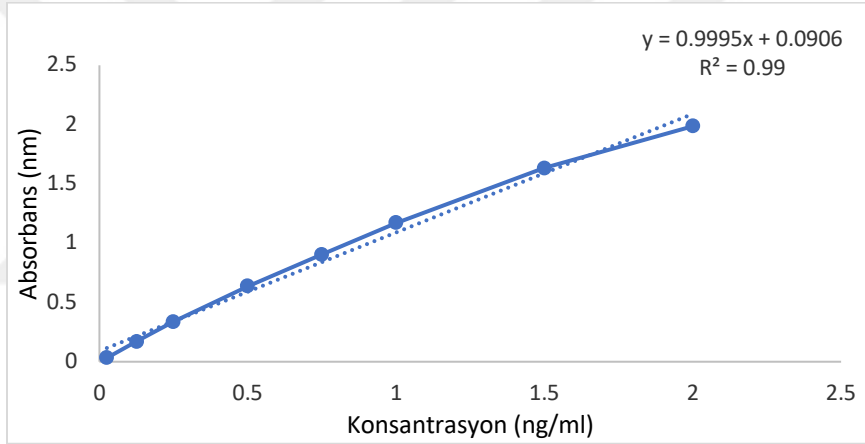
Her sıçanın hipokampus ve prefrontal korteks dokuları tartıldı ve her bir dokuya kendi ağırlığının beş katı kadar soğuk PBS (pH 7.4) mL cinsinden eklendi. Dokular boncuk homojenizatörde 2 dakikalık periyodlarda toplamda 4 dakika, 1/30 frekansta homojenize edildi. Daha sonra örnekler +4°C'de, 5000 g'de ve 10 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatantlar -80°C'ye kaldırıldı.

3.5.7. Doku Protein Miktarının Belirlenmesi

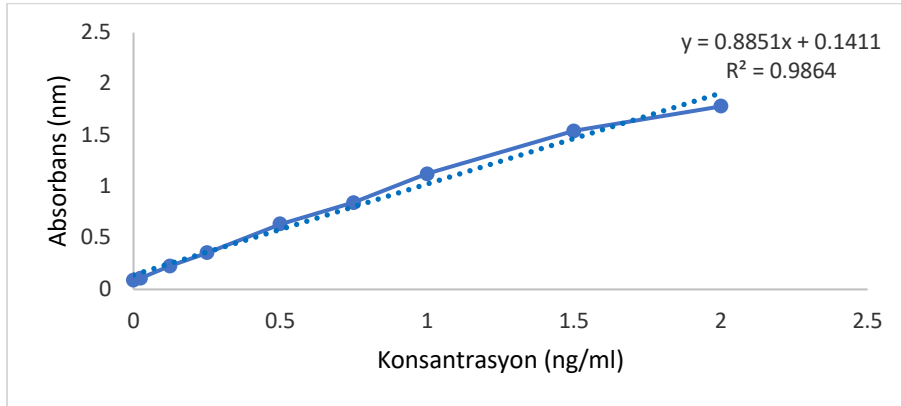
Hipokampus ve prefrontal korteks dokularında bulunan toplam protein miktarı BCA (bikinkoninik asit) yöntemi ile analiz edildi. Bulunan değer, dokularda analiz edilen spesifik proteinlerin miktarına oranlanarak toplam protein başına düşen spesifik proteinin miktarının belirlenmesi için kullanıldı. Analiz aşağıdaki sırayla yapılmıştır.

- 1- Kit içindeki 2 mg/mL yoğunluktaki stok standart kullanılarak 1.5 mg/mL, 1 mg/mL, 0.75 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.125 mg/mL, 0.025 mg/mL yoğunluklarda standartlar hazırlandı.

- 2- Hazırlanan standartlar ve 1/10 oranında seyreltilmiş örneklerin her biri 25 µl olarak mikropalak kuyucuklara eklendi.
- 3- Her kuyuya 200 µl çalışma çözeltisi eklendi. Çalışma çözeltisi reaktif A ve reaktif B'nin 50:1 oranında karıştırılmasıyla elde edildi.
- 4- Üstü kapatılan mikropalak 30 dakika 37°C'de inkübe edildi.
- 5- İnkubasyondan sonra optik yoğunluk 562 nm dalga boyunda mikropalak okuyucu (BioTek ELX 800) ile ölçüldü.
- 6- Elde edilen absorbans değerleri ile standart grafiği çizilerek örneklerdeki toplam protein miktarı hesaplandı.



Şekil 6: Hipokampus BCA Standart Grafiği

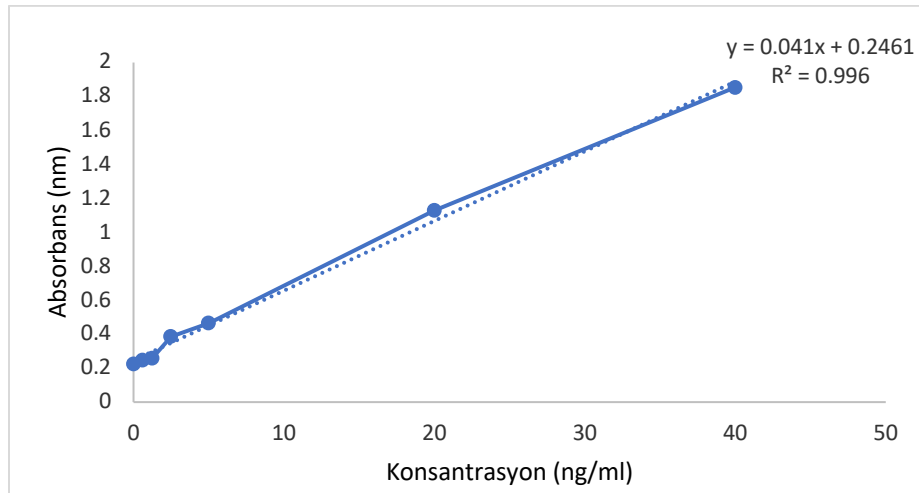


Şekil 7: Prefrontal Korteks BCA Standart Grafiği

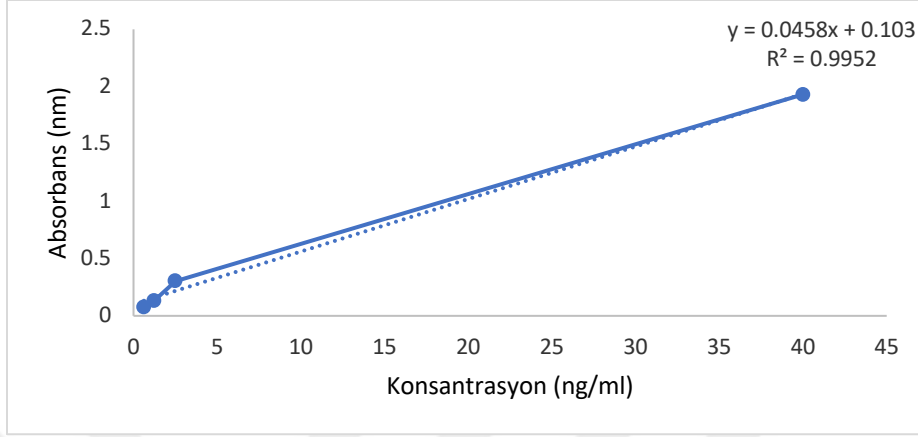
3.5.8. Sinaptofizin Miktarının Ölçülmesi

Hipokampus ve prefrontal korteks sinaptofizin düzeyleri sıçan SYP kiti kullanılarak ELISA yöntemi ile analiz edildi. Her iki dokudaki örneklerde farklı dilüsyon kullanılarak aşağıdaki protokol izlenmiştir.

- 1- Hipokampus homojenatları 1/80, prefrontal korteks örnekleri 1/40 oranında PBS ile seyreltildi.
- 2- Standartlar seri dilüsyon ile 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 ng/mL konsantrasyonlarda hazırlandı.
- 3- Her kuyucuğa standartlar, örnekler ve sıfır standart (0 ng/mL) her birinden çift kuyu olacak şekilde 100 µl olarak eklendi. Plağın üstü kapatılıp 37°C'de 2 saat inkübe edildi.
- 4- İnkübasyondan sonra kuyucuklara 100 µl Biotin-antibody eklenerek 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
- 5- Sonrasında her kuyucuk 200 µl yıkama tamponu ile üç defa yıkandı.
- 6- Kuyucuklara 100 µl HRP-avidin eklenerek 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
- 7- Her kuyu altı defa yıkama aşamasından geçirildikten sonra 90 µl TMB Substrat eklenerek 30 dakika 37°C'de inkübe edildi.
- 8- Her kuyuya 50 µl durdurma solüsyonu eklendikten sonra 450 nm dalga boyunda optik yoğunlukları okutularak (BioTek ELX 800) her örnekte bulunan sinaptofizin miktarı çizilen standart eğrisi kullanılarak hesaplandı.



Şekil 8: Hipokampus Sinaptofizin Düzeyi Standart Grafiği

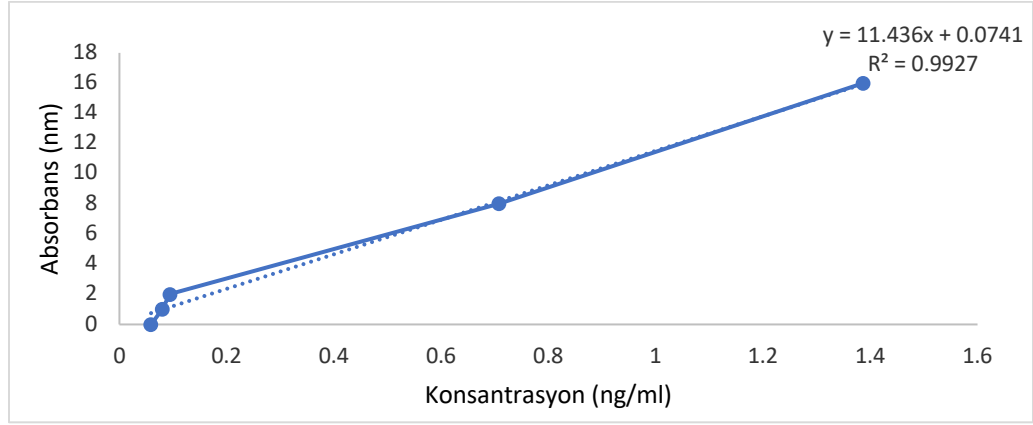


Şekil 9: Prefrontal Korteks Sinaptofizin Düzeyi Standart Grafiği

3.5.9. Nestin Miktarının Ölçülmesi

Hipokampüste bulunan nestin protein miktar düzeyleri sıçan Nestin kiti kullanılarak ELISA yöntemi ile analiz edildi. Dokudaki örnekler analiz edilirken aşağıdaki protokol izlenmiştir.

- 1- Hipokampus homojenatları 1/100 oranında PBS ile seyreltildi.
- 2- Standartlar seri dilüsyon ile 16, 8, 4, 2 ve 1 ng/mL konsantrasyonlarda hazırlandı.
- 3- Örnekler 40 ul, standartlar 50 ul olarak her birinden çift kuyu olacak şekilde eklendi.
- 4- Sadece örneklere 10 ul anti-NES antikoru ve sıfır standart hariç tüm kuyucuklara 50 ul streptavidin-HRP eklenerek 1 saat 37°C'de inkübe edildi.
- 5- Tüm kuyucuklar beş defa 0.35 mL yıkama tamponu ile yıkandı.
- 6- Önce 50 ul A çözeltisi, sonrasında 50 ul B çözeltisi eklenerek 10 dakika 37°C'de inkübe edildi.
- 7- Her kuyucuğa 50 ul durdurma çözeltisi eklendi ve hemen ardından 450 nm dalga boyunda optik yoğunlukları okutuldu (BioTEK ELX 800). Standart eğrisi çizilerek her örnekte bulunan nestin miktarı hesaplandı.

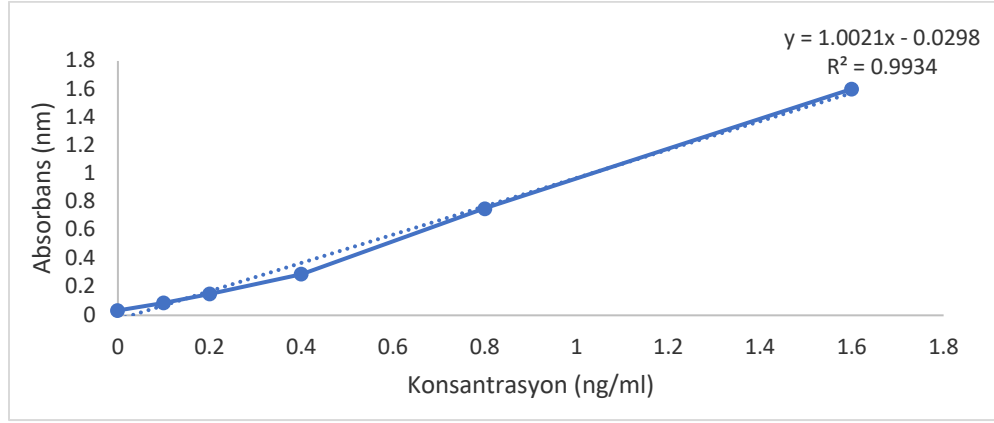


Şekil 10: Hipokampus Nestin Düzeyi Standart Grafiği

3.5.10. Kalbindin Miktarının Ölçülmesi

Hipokampüste bulunan kalbindin protein miktar düzeyleri sıçan Kalbindin kiti kullanılarak ELISA yöntemi ile analiz edildi. Dokudaki örnekler analiz edilirken aşağıdaki protokol izlenmiştir.

- 1- Hipokampus homojenatları 1/200 oranında PBS ile seyreltildi.
- 2- Standartlar seri dilüsyon ile 1.6, 0.8, 0.4, 0.2 ve 0.1 ng/mL konsantrasyonlarda hazırlandı.
- 3- Örnekler 40 ul, standartlar 50 ul olarak her birinden çift kuyu olacak şekilde eklendi.
- 4- Sadece örneklere 10 ul anti-CALB antikoru ve sıfır standart hariç tüm kuyucuklara 50 ul streptavidin-HRP eklenerek 1 saat 37°C'de inkübe edildi.
- 5- Tüm kuyucuklar beş defa 0.35 mL yıkama tamponu ile yıkandı.
- 6- Önce 50 ul A çözeltisi, sonrasında 50 ul B çözeltisi eklenerek 10 dakika 37°C'de inkübe edildi.
- 7- Her kuyucuğa 50 ul durdurma çözeltisi eklendi ve hemen ardından 450 nm dalga boyunda optik yoğunlukları okutuldu (BioTEK ELX 800). Standart eğrisi çizilerek her örnekte bulunan kalbindin miktarı hesaplandı.



Şekil 11: Hipokampus Kalbindin Düzeyi Standart Grafiği

3.5.11. Hipokampal Nörojenezin İmmünohistokimyasal Analizi

Deney sonunda elde edilen beyinler %4'lük paraformaldehit ile üç gün fikse edildi ve fiksasyon bitiminde %30'luk PBS ile hazırlanmış olan sükröz solüsyonu ile +4°C'de beyinler batana kadar inkübe edildi. Ardından Tissue-Tek OCT compound içine gömüldü. Hipokampus bölgesinden (plate 22-23) 8 mm boyutlarında cryostat kesitler alındı. Kesitler boyama yapılana kadar -80°C' de saklandı.

İmmunfloresan inceleme için, oda sıcaklığına getirilen kesitler soğuk aseton ile 15 dk fikse edildi. Kesitler, 4 kere 5 dakika boyunca PBS ile yıkandı. Daha sonra kesitler yeni PBS ile hazırlanmış olan %1'lik NaBH₄ ile 20 dakika boyunca inkübe edildi ve aynı şekilde 4 defa 5 dakika boyunca kesitler PBS ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra kesitler PBS ile hazırlanmış %0,3 Triton X-100 içeren %5'lük goat serum ile 1 saat boyunca inkübe ederek bloklandı. Kesitler daha sonra PBS içinde %0,3 Triton X-100 içeren %2 goat serum ile hazırlanmış inflamazom aktivitesi göstergesi olan primer antikorlar anti-BrdU ve anti-NeuN ile +4°C'de 1 gece bekletildi. Ertesi gün PBS ile yapılan yıkamadan sonra Alexa fluor 488 ve Alexa flour 594 ile 1 saat bekletildi. Yine PBS ile yıkanan kesitler DAPI ile 5 dakika boyunca boyandı. Kesitler Prolong Gold antifade mounting medium ile kapatılarak konfokal mikroskopta (Zeiss LSM880) görüntüler alındı. Bilgisayarlı analiz sistemi Image J programında intensite ölçümü yapıldı ve gruplar arası farklılık istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.6. Verilerin Değerlendirilmesi

Çalışmanın sonuçlarına ait istatistiksel veriler SPSS programı 24.0 versiyon kullanılarak yapıldı. Verilerin normal dağılımına Shapiro-Wilk testi ile bakıldı. Normal dağılan verilerin gruplar arası karşılaştırmasında one-way ANOVA kullanıldı ve sonuçlar ortalama \pm standart sapma (SD) şeklinde gösterildi. Normal dağılmayan veriler ise Kruskal Wallis testi ile analiz edilerek sonuçlar ortalama \pm standart hata (SEM) ile gösterildi. Grup içi tekrarlayan ölçümlerin analizinde repeated measures ANOVA kullanıldı ve sonuçlar ortalama \pm standart sapma şeklinde gösterildi. $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Verilerin birbirleri ile korelasyonunda Pearson's korelasyon analizi kullanıldı ve $p<0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

3.7. Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırmamızda yaşlı ve genç sıçanlar kullanılmış, genç sıçanlar yüksek polifenollü zeytinyağı ile beslenerek yaşlı grup ile karşılaştırılmıştır. Genç grupta kontrol grubu oluşturulmamıştır. Bu nedenle genç grup kendi içinde karşılaştırılamamıştır. Ayrıca kullanılan mekânsal bellek testi nörojenez fonksiyonlarını tam olarak ortaya koymamış olabilir.

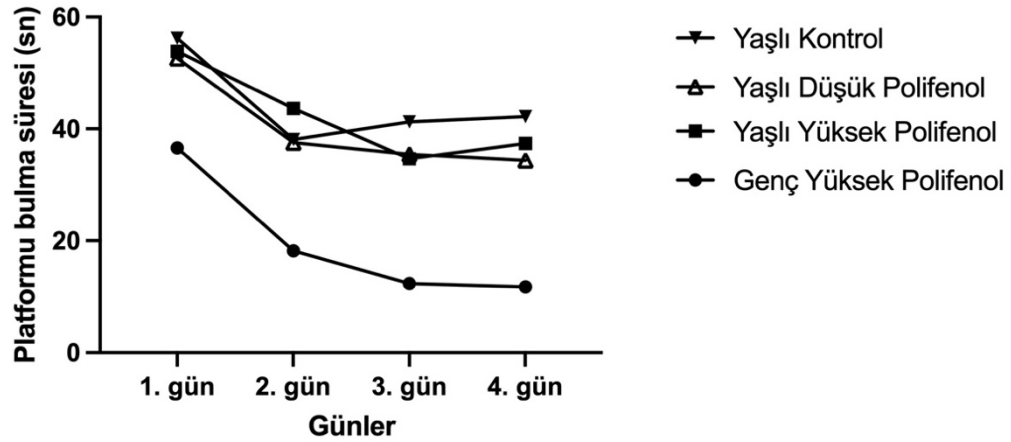
3.8. Etik Kurul Onayı

Çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (TF-HADYEK) tarafından 04/09/2019 tarihli 69/2019 karar numarasıyla onay almıştır. Belge Ek-2'de verilmiştir.

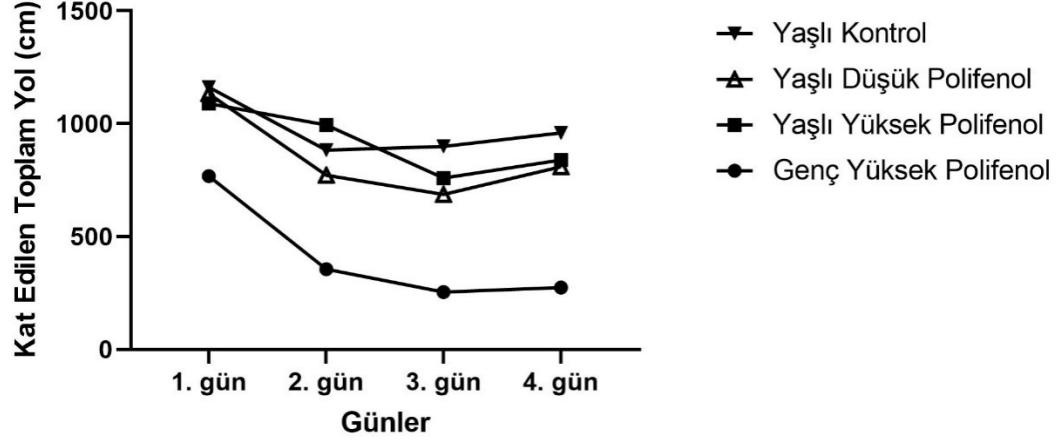
4. BULGULAR

4.1. Morris Su Labirenti Testi

Morris su labirenti testinin ilk 4 gününde sıçanlar su tankının farklı kadrantlarından suya bırakılarak platformun yerini bulmaları için eğitildi. Hipokampal öğrenme yetileri 4 gün boyunca alıştırmaya tabi tutulan deney hayvanlarının platformu bulma süresi ve katedilen toplam mesafe ölçümleri ile değerlendirildi. Platformu bulma süresi tüm gruplarda 1. gün ve diğer günler arasında istatistiksel olarak farklı bulundu ($p<0.05$) (Şekil 12). Kat edilen toplam mesafe parametresinde ise 1. günde alınan toplam yol diğer günlerden istatistiksel olarak yüksek bulundu ($p<0.05$) (Şekil 13). Elde edilen veriler değerlendirildiğinde 1. Günden sonra azalan platformu bulma süreleri ve kat edilen toplam mesafeleri deney hayvanlarının tüm gruplarda öğrenmelerinin gerçekleştiğini gösterdi.

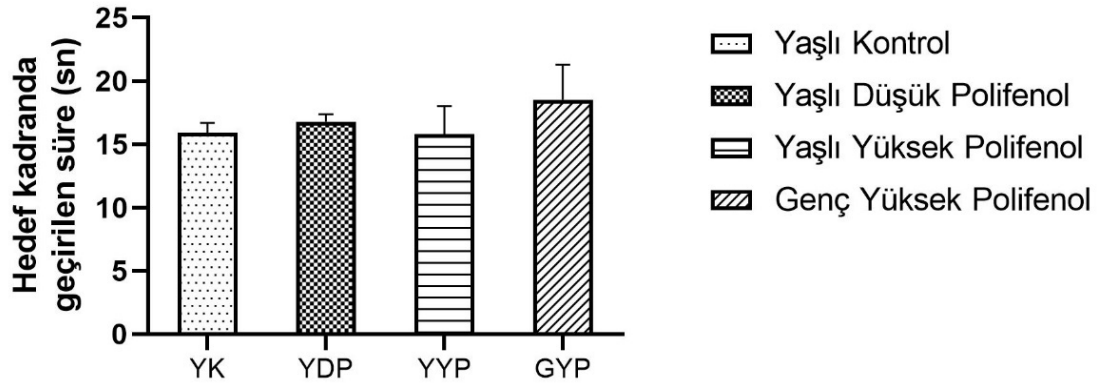


Şekil 12: Morris su labirenti testinin 1-4. günlerinde platformu bulma süreleri. Tüm gruplarda 1. gündeki platformu bulma süreleri diğer dört günden yüksektir ($p<0.05$). Her gün, grupların dört tekrardan oluşan denemelerinden oluşmaktadır. Denemelerin sonuçları ortalama \pm standart sapma (SD) şeklinde verilmiştir.

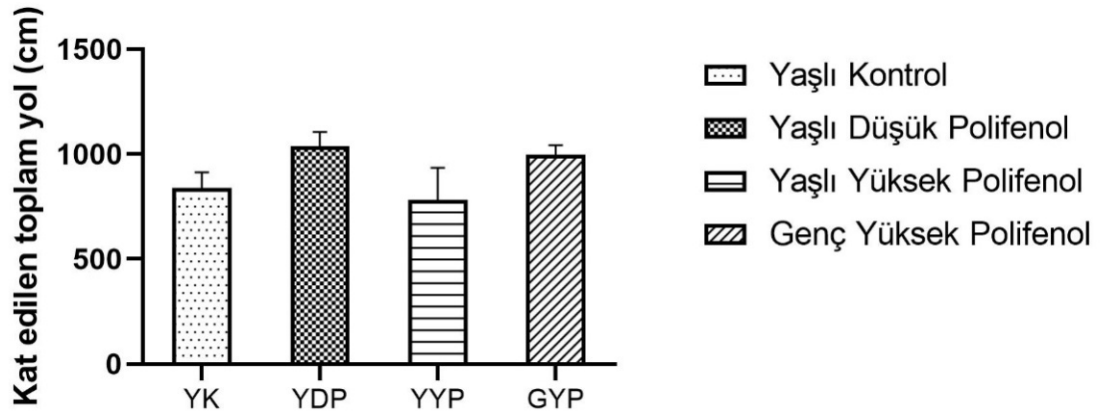


Şekil 13: Morris su labirenti testinin 1-4. günlerinde kat edilen toplam mesafe. Tüm gruplarda 1. günde katedilen toplam yol diğer günlere göre istatistiksel olarak yüksektir ($p < 0.05$). Her gün, grupların dört tekrardan oluşan denemelerinden oluşmaktadır. Denemelerin sonuçları ortalama \pm standart sapma (SD) şeklinde verilmiştir.

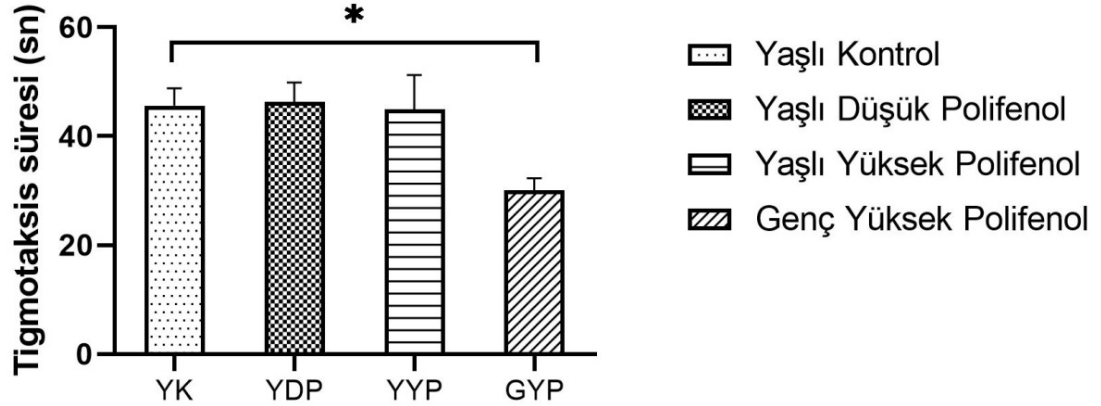
Deneyin 5. gününde, hedef kadranda geçirilen süre, kat edilen toplam yol, tigmotaksik yüzme süresi ve yüzme hızı parametreleri değerlendirilmiştir. Gruplar arasında platformun olduğu kadranda geçirilen süreler karşılaştırıldığında, GYP grubunun hedef kadranda geçirdiği sürelerin ortalaması diğer grupların ortalamasından yüksek olsa da gruplar arasında hedef kadranda geçirilen süreler açısından bir fark bulunamamıştır ($p > 0.05$) (Şekil 14). Grupların deney günü kat ettikleri toplam mesafeler arasında bir fark görülmemiştir ($p > 0.05$) (Şekil 15). Yüzme sırasında anksiyete hakkında bilgi veren havuzun dış kenarlarında yüzme süresi değerlendirildiğinde ise GYP grubunun tigmotaksik yüzme süresi diğer gruplara göre anlamlı derecede düşük bulundu ($p < 0.05$) (Şekil 15). Son olarak, grupların yüzme hızları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$) (Şekil 6). Elde edilen veriler değerlendirildiğinde hipokampus bağımlı mekânsal öğrenme açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$).



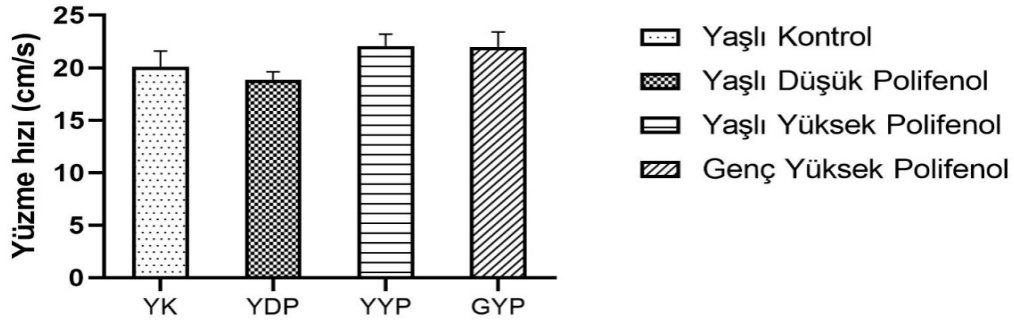
Şekil 14: Morris su labirentinin 5. gününde hedef kadranda geçirilen süre. Grupların hedef kadranda geçirdikleri sürede anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$). Sonuçlar ortalama \pm standart hata (SEM) şeklinde verilmiştir.



Şekil 15: Morris su labirentinin 5. gününde kat edilen toplam mesafe. Testin 5. gününde kat edilen toplam mesafede gruplar arasında anlamlı fark yoktur ($p<0.05$). Sonuçlar ortalama \pm standart hata (SEM) şeklinde verilmiştir.



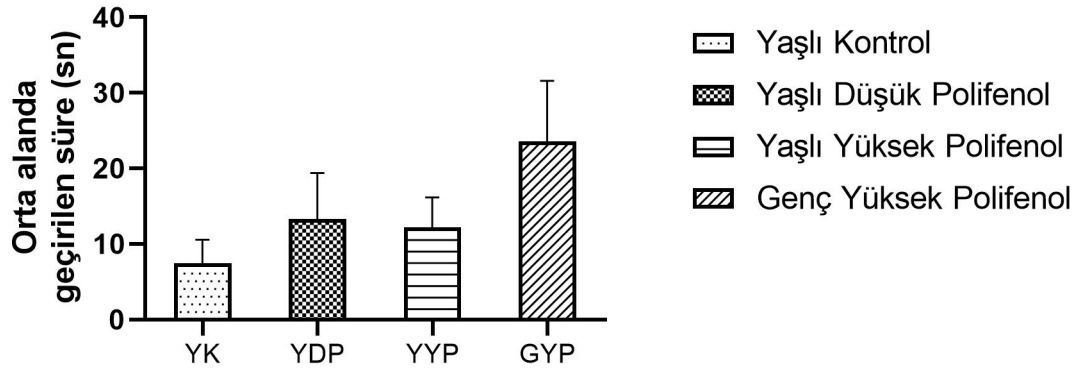
Şekil 16: Morris su labirentinin 5. gününde tigmotaxis yüzme süreleri. *GYP grubu YK grubuna göre havuzun kenarında daha düşük süre yüzmüştür ($p < 0.05$). Sonuçlar ortalama \pm standart hata (SEM) şeklinde verilmiştir.



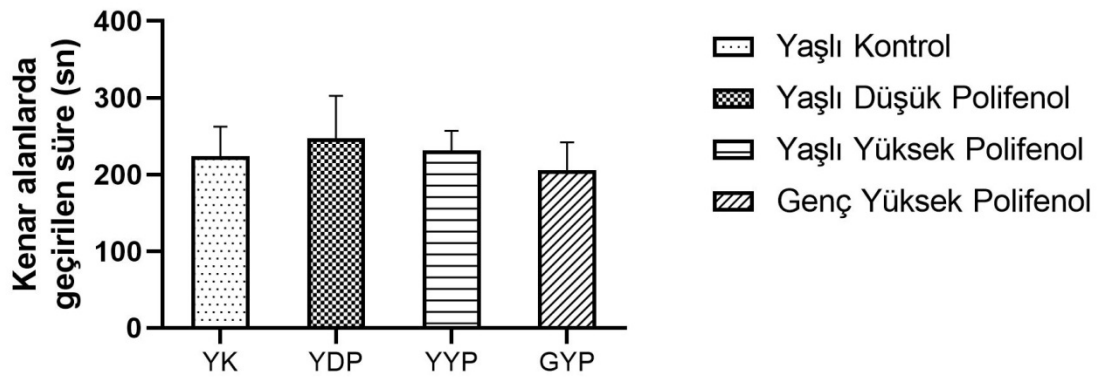
Şekil 17: Morris su labirentinin 5. gününde ortalama yüzme hızları. Grupların yüzme hızları testin 5. gününde anlamlı bir fark göstermemiştir ($p > 0.05$). Sonuçlar ortalama \pm standart hata (SEM) şeklinde verilmiştir.

4.2. Açık Alan Testi

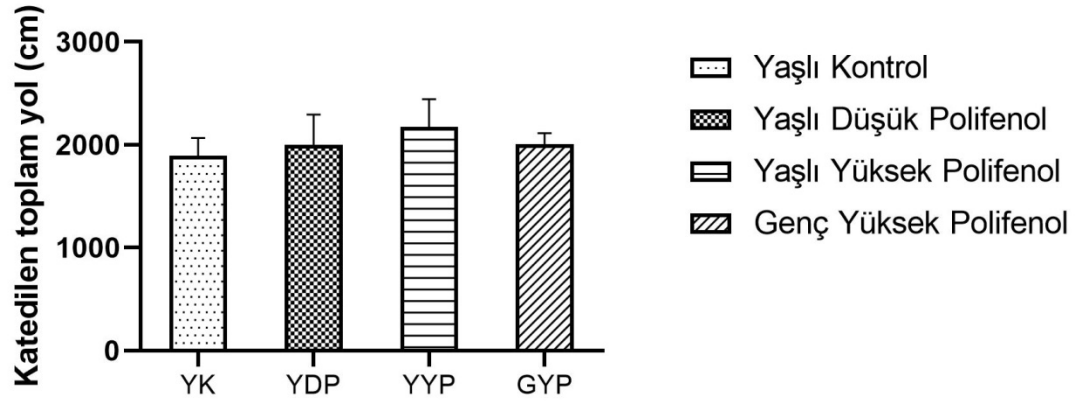
Yüksek polifenollü zeytin yağının anksiyete üzerine etkisini ölçmek amacıyla yapılan açık alan testinde orta alanda geçirilen süre, kenar alanda geçirilen süre, kat edilen toplam mesafe ve hız parametreleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0.05$). Veriler değerlendirildiğinde, gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunmaması anksiyete benzeri davranışın tüm gruplarda benzer olduğunu gösterdi.



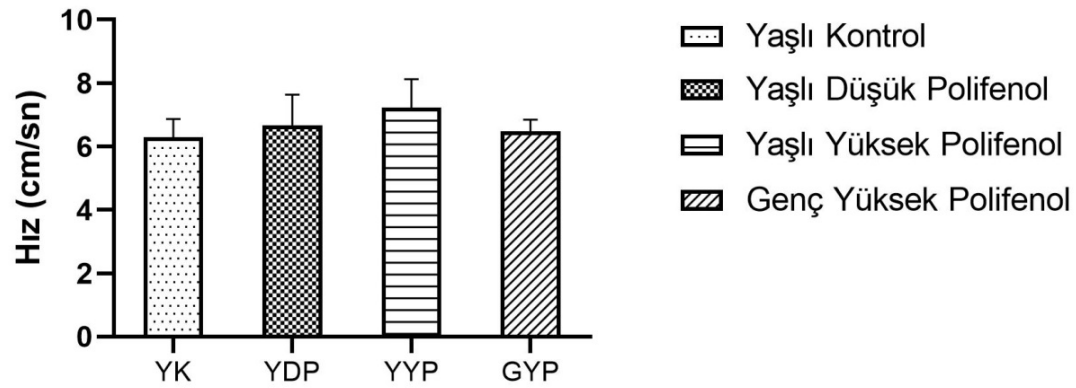
Şekil 18: Açık alan testi orta alanda geçirilen süre. Orta alanda geçirilen süre gruplar arasında istatistiksel açıdan farklı değildir ($p>0.05$). Sonuçlar ortalama \pm standart hata (SEM) şeklinde verilmiştir.



Şekil 19: Açık alan testi kenar alanlarda geçirilen süre. Grupların kenar alanlarda geçirdikleri süre istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$). Sonuçlar ortalama \pm standart hata (SEM) şeklinde verilmiştir.



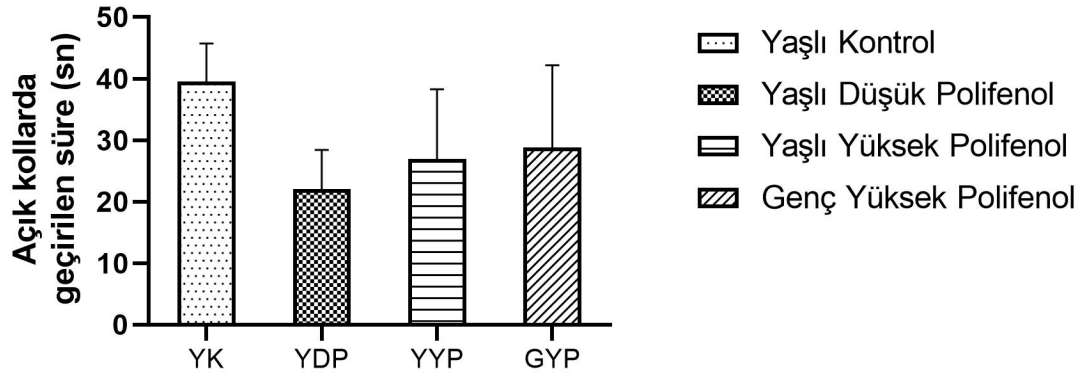
Şekil 20: Açık alan testi kat edilen toplam yol. Grupların kat ettikleri toplam mesafede bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$). Sonuçlar ortalama \pm standart hata (SEM) şeklinde verilmiştir.



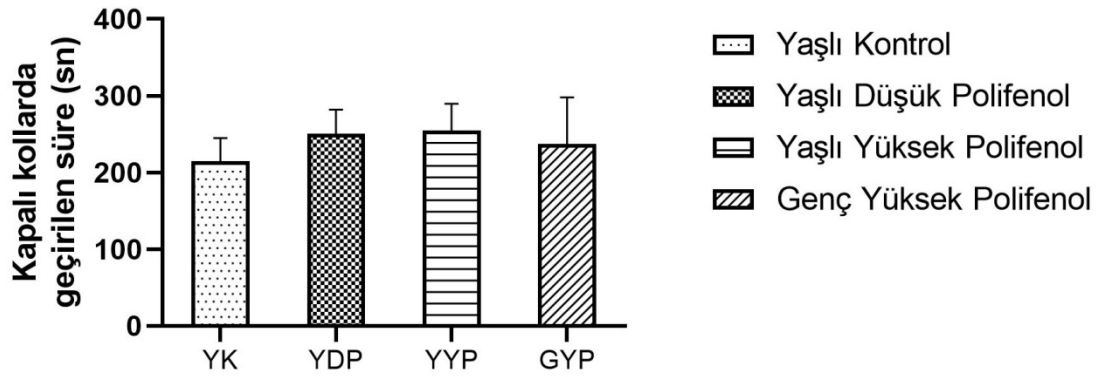
Şekil 21: Açık alan testinde ortalama hızlar. Grupların ortalama hızları açısından herhangi bir fark yoktur ($p>0.05$). Sonuçlar ortalama \pm standart hata (SEM) şeklinde verilmiştir.

4.3. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi

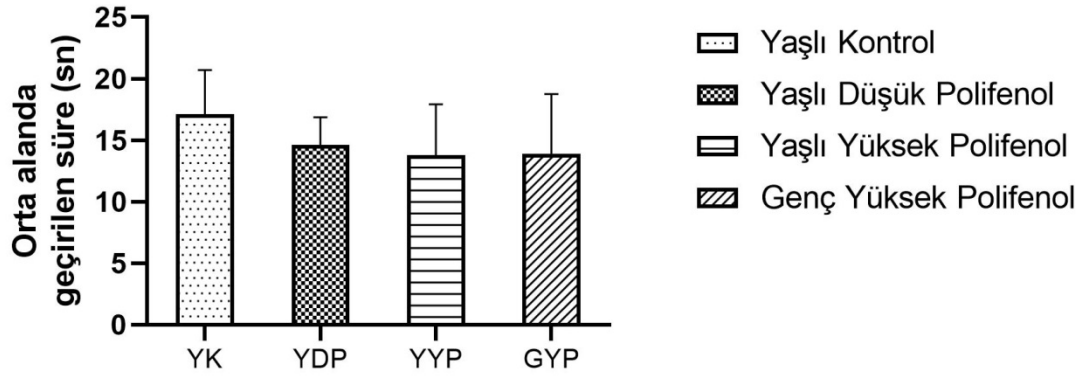
Anksiyetenin değerlendirilmesi amacıyla yapılan yükseltilmiş artı labirent testinde ise parametreler açısından anlamlı bir fark yoktur ($p>0.05$).



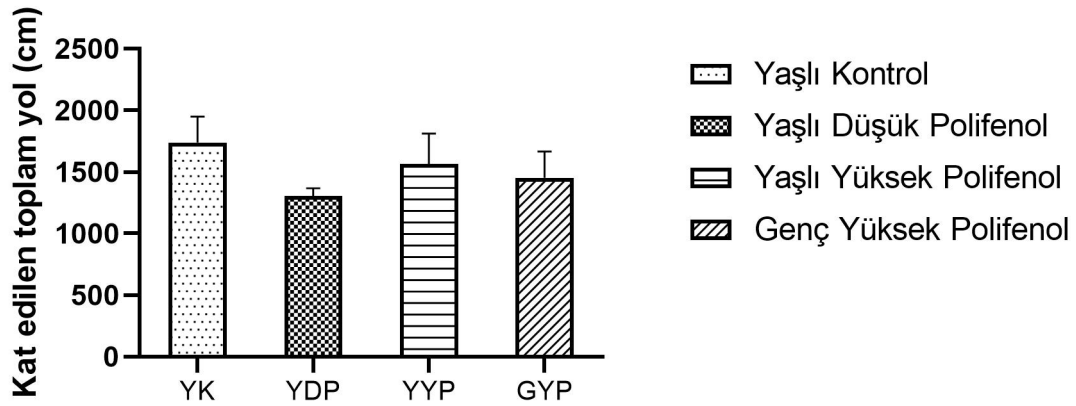
Şekil 22: Yükseltmiş artı labirent testinde açık kollarda geçirilen süre. Gruplar arasında açık kollarda geçirilen süre arasında herhangi bir fark yoktur ($p>0.05$). Sonuçlar ortalama \pm standart hata (SEM) şeklinde verilmiştir.



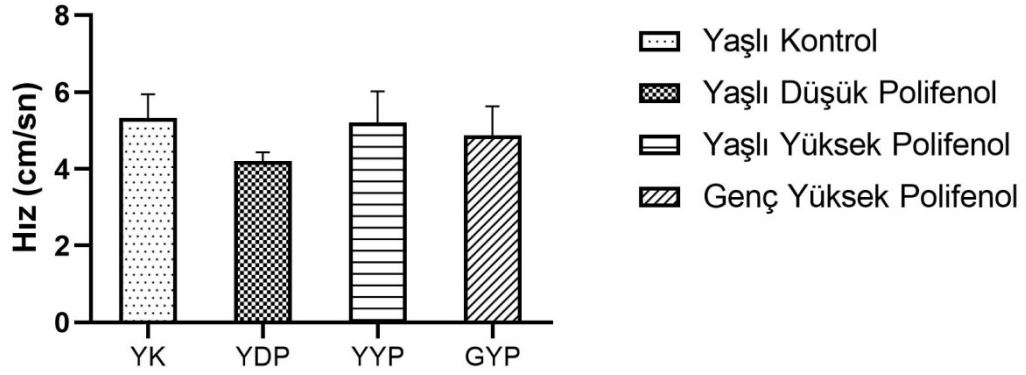
Şekil 23: Yükseltmiş artı labirent testinde kapalı kollarda geçirilen süre. Kapalı kollarda geçirilen süreler gruplar arasında farklılık göstermemiştir ($p>0.05$). Sonuçlar ortalama \pm standart hata (SEM) şeklinde verilmiştir.



Şekil 24: Yükseltilmiş artı labirent testinde orta alanda geçirilen süre. Orta alanda geçirilen süre gruplar arasında farklılık göstermemiştir ($p>0.05$). Sonuçlar ortalama \pm standart hata (SEM) şeklinde verilmiştir.

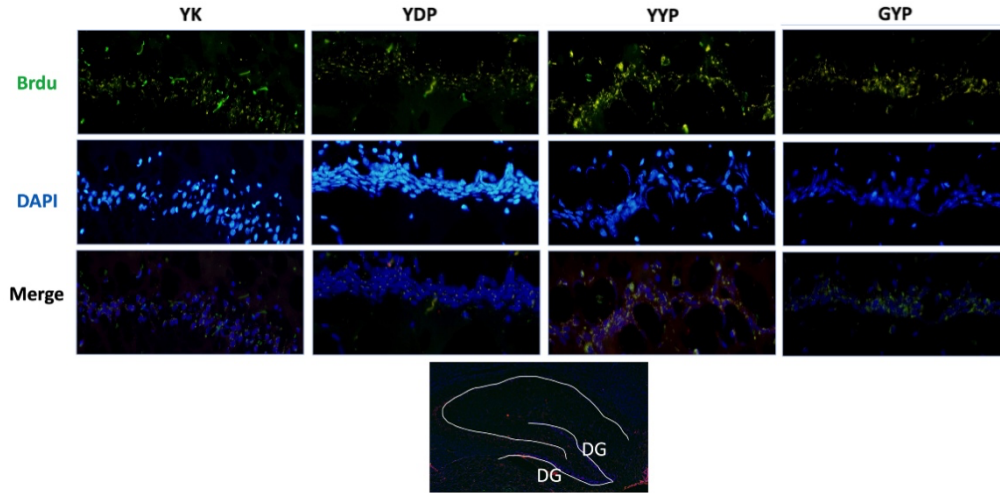


Şekil 25: Yükseltilmiş artı labirent testinde kat edilen toplam yol. Gruplar arasında kat edilen toplam mesafede istatistiksel olarak farklılık yoktur ($p>0.05$). Sonuçlar ortalama \pm standart hata (SEM) şeklinde verilmiştir.

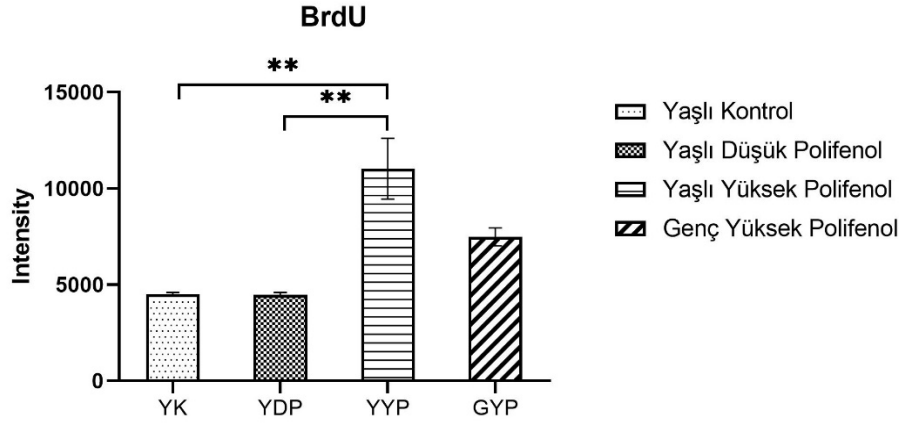


Şekil 26: Yükseltilmiş artı labirent testinde ortalama hızlar. Gruplar arasında hız açısından fark bulunamamıştır ($p>0.05$). Sonuçlar ortalama \pm standart hata (SEM) şeklinde verilmiştir.

4.4. Dendat Girus'ta Çoğalan Hücrelerin BrdU ile Belirlenmesi

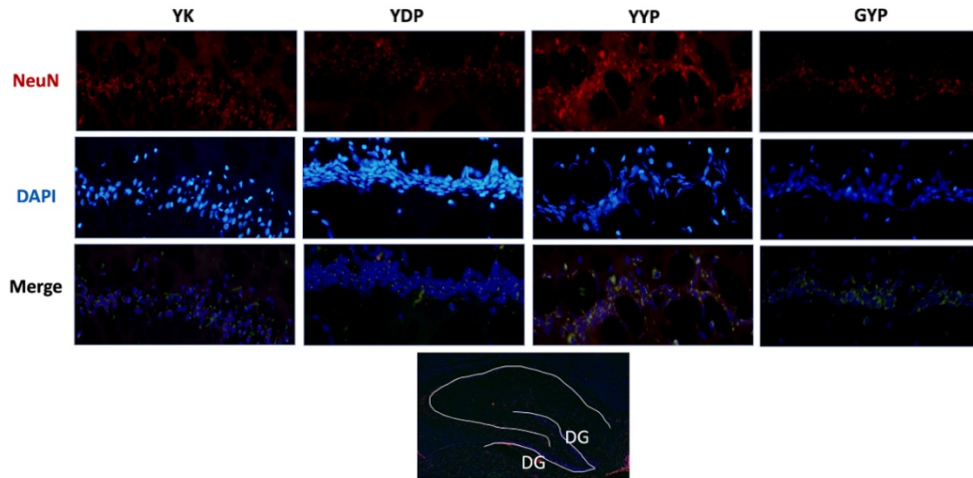


Şekil 27: Hipokampüste BrdU immün boyaması. YK: Yaşlı Kontrol. YDP: Yaşlı Yüksek Polifenol. YYP: Yaşlı Yüksek Polifenol. GYP: Genç Yüksek Polifenol.

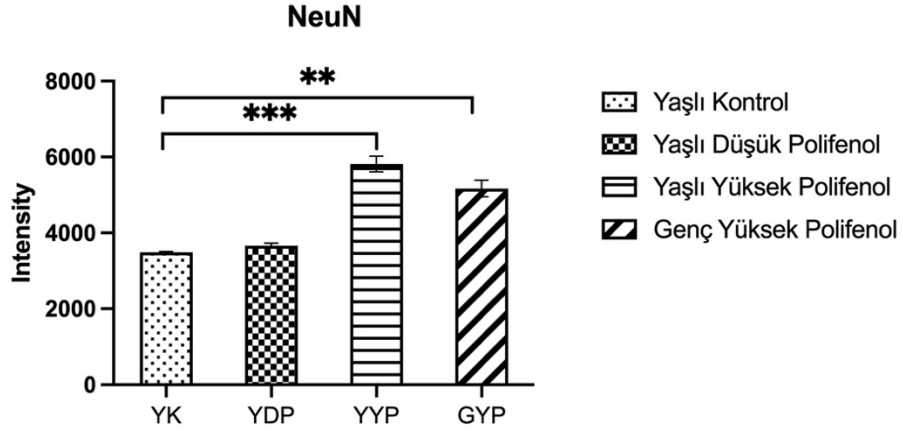


Şekil 28: Dendat Girustaki (DG) BrdU pozitif hücreler. **YYP grubunun DG'sinde çoğalan hücre sayısı YK grubuna göre yüksek bulunmuştur ($p < 0.01$). ** YYP grubunun DG'sinde çoğalan hücre sayısı YDP grubuna göre yüksek bulunmuştur. Sonuçlar ortalama \pm standart hata (SEM) şeklinde verilmiştir.

4.5. Dendat Girus'ta Olgunlaşan Hücrelerin NeuN ile Belirlenmesi



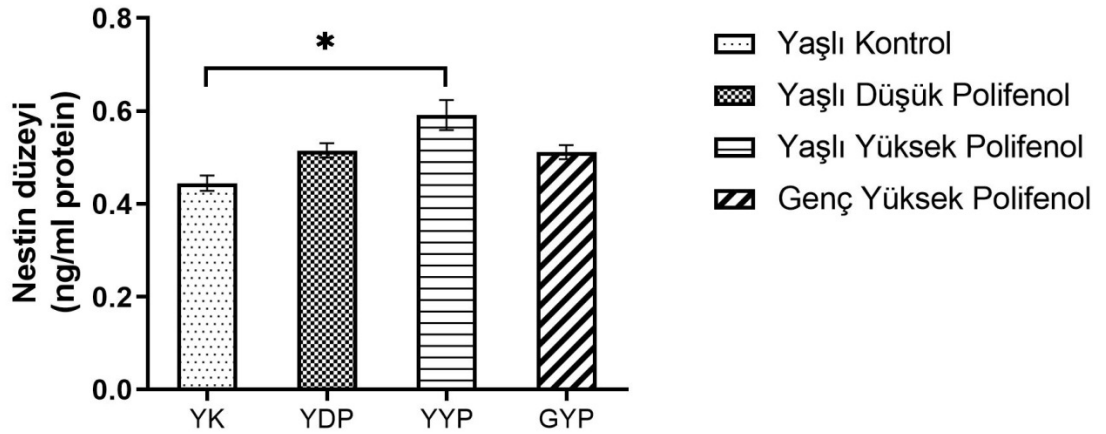
Şekil 29: Hipokampüste NeuN immün boyaması. YK: Yaşlı Kontrol. YDP: Yaşlı Yüksek Polifenol. YYP: Yaşlı Yüksek Polifenol. GYP: Genç Yüksek Polifenol.



Şekil 30: Dendat Girustaki (DG) NeuN pozitif hücreler. ***YYP grubunun DG'sinde çoğalan hücre sayısı YK grubuna göre yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$). **GYP grubunun DG'sinde çoğalan hücre sayısı YK grubuna göre yüksektir. Sonuçlar ortalama \pm standart hata (SEM) şeklinde verilmiştir.

4.6. Hipokampus Nestin Düzeyi

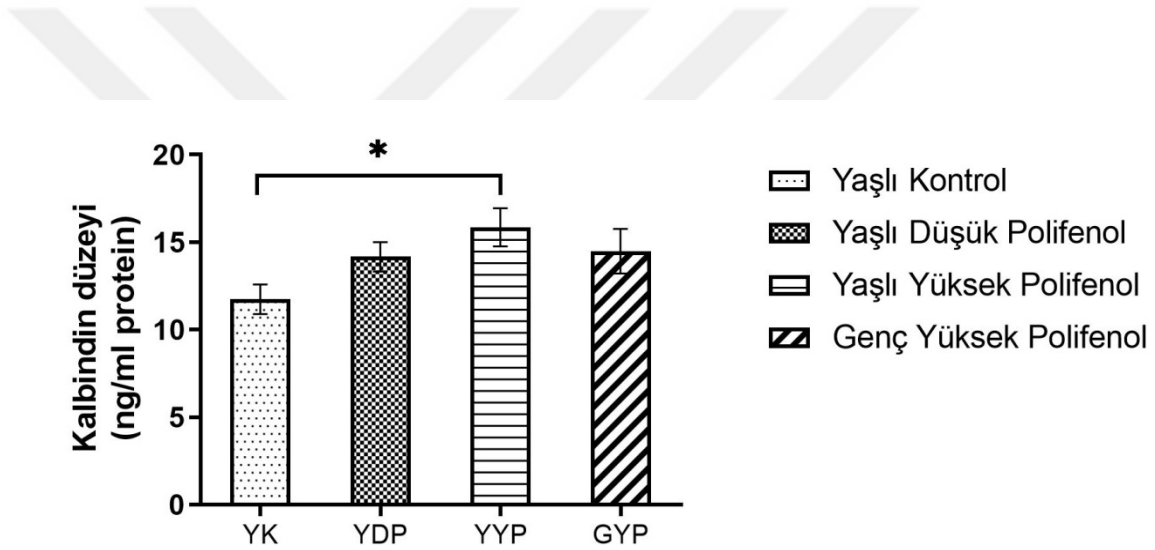
Nöral kök hücrelerden sentezlenen nestin protein düzeyleri incelendiğinde YYP grubunun nestin miktarı YK grubuna göre yüksek bulundu ($p = 0.013$) (Şekil 33). Veriler değerlendirildiğinde, yüksek polifenol içeriğinin nöral kök hücre havuzunda anlamlı bir artışa neden olduğu görüldü.



Şekil 31: Hipokampal nestin düzeyi. *YYP grubundanestinin düzeyi YK grubuna göre yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Sonuçlar ortalama \pm standart hata (SEM) şeklinde verilmiştir.

4.7. Hipokampus Kalbindin Düzeyi

Hipokampüsteki kalbindin düzeyleri karşılaştırıldığında YYP grubunun kalbindin düzeyinin YK grubuna göre anlamlı derecede fazla olduğu gözlemlendi ($p=0.028$) (Şekil 34). Analiz sonucunda yüksek polifenolün kalbindin protein sentezini arttırdığı bulundu.

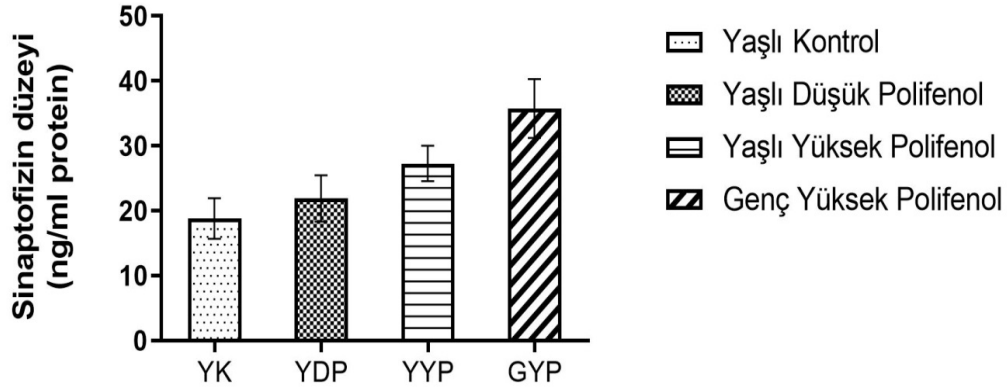


Şekil 32: Hipokampal kalbindin düzeyi. *YYP grubundakalbindin düzeyi YK grubuna göre yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Sonuçlar ortalama \pm standart hata (SEM) şeklinde verilmiştir.

4.8. Hipokampus Sinaptofizin Düzeyi

Yüksek polifenol içerikli zeytinyağının sinaptik bütünlüğe etkisini incelemek amacıyla sinaptofizin düzeylerine bakıldığında; gruplar arasında sinaptofizin düzeyleri bakımından anlamlı bir fark görülmedi ($p=0.073$). YYP grubunun sinaptofizin düzeyi YK ve YDP grubuna göre fazla; GYP grubunun ise YK, YDP ve YYP grubuna göre daha yüksek sinaptofizin düzeyine sahip olmasına rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı

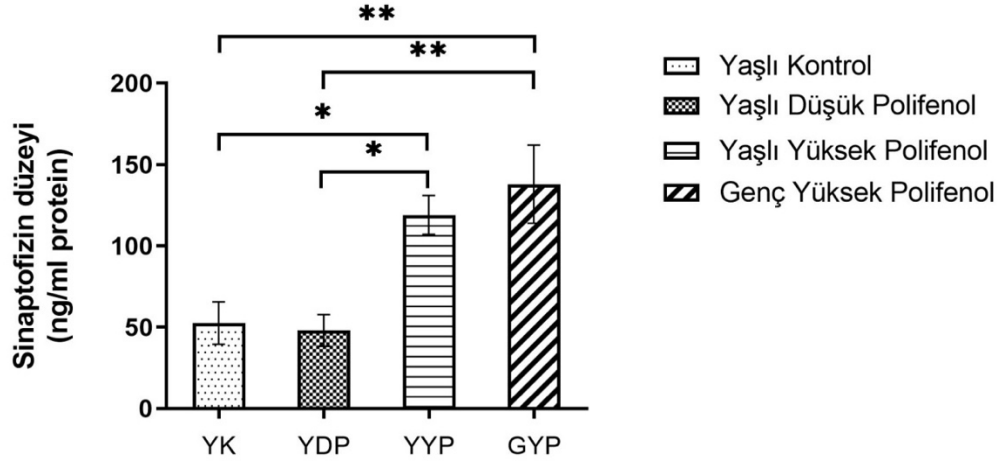
değildi. Yüksek polifenol içerikli zeytinyağı ile beslenme sinaptofizin düzeylerinde anlamlı bir artışa neden olmadı (Şekil 31).



Şekil 33: Hipokampal sinaptofizin düzeyi. Sinaptofizin düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunamamıştır ($p > 0.05$). Sonuçlar ortalama \pm standart hata (SEM) şeklinde verilmiştir.

4.9. Prefrontal Korteks Sinaptofizin Düzeyi

Prefrontal kortekste sinaptofizin düzeylerine bakıldığında YYP grubunun sinaptofizin düzeyi YK ve YDP grubuna göre anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla $p=0.047$, $p=0.041$). GYP grubun da benzer şekilde YK ve YDP grubuna göre sinaptofizin düzeyi anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla $p=0.009$, $p=0.007$) (Şekil 32).



Şekil 34: Prefrontal korteksteki sinaptofizin düzeyi. *YYP grubundasinaptofizin düzeyi YK grubuna göre yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$). *YYP grubundasinaptofizin düzeyi YDP grubuna göre yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$). **GYP grubunun sinaptofizin düzeyi YK grubuna göre yüksektir ($p < 0.01$). **GYP grubunun sinaptofizin düzeyi YDP grubuna göre yüksektir ($p < 0.01$). Sonuçlar ortalama \pm standart hata (SEM) şeklinde verilmiştir.

4.10. Korelasyon Analizi

Analiz edilen belirteçler arasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla korelasyon analizi yapıldı. Davranış testi parametreleri ile histokimyasal analiz sonucu elde edilen BrdU, NeuN düzeyi, nestin, sinaptofizin ve kalbindin protein miktarları arasında herhangi bir ilişkinin varlığı saptanmadı ($p > 0.05$).

Nöral kök hücrelerden sentezlenen nestin protein miktarı ile hipokampal kalbindin düzeyi arasında pozitif korelasyon tespit edildi ($r = 0.758$, $p < 0.001$).

5. TARTIŞMA

Zeytinyağı, Türkiye'nin de içinde bulunduğu Akdeniz ülkelerinde günlük diyet ile alınan önemli bir besin kaynağıdır. Zeytinyağındaki polifenol içeriği tarım uygulamalarına göre değişmektedir ve bu uygulamaların bir sonucu olarak düşük polifenollü zeytinyağları piyasada yaygın olarak bulunmaktadır. Zeytinyağındaki polifenol içeriğinin daha yüksek olmasının sağlık üzerindeki etkilerinin tam olarak aydınlatmamış olmasının yanı sıra, literatürdeki çalışmalar zeytinyağı içerisinde bulunan polifenollerin nörojenez üzerine etkisini spesifik olarak hidroksitirozol (HT) gibi tek veya birkaç polifenol ile incelemektedir. Günlük ve düzenli zeytinyağı tüketiminin yaşlılık sürecinden etkilenen nörojenez moleküler ve fonksiyonel etkisini ortaya koyan bir çalışma henüz literatürde bulunmamaktadır. Bu nedenle araştırmamızın amacı zeytinyağı polifenollerinin nörojenez ilişkili moleküler etkilerinin araştırılması olmuştur. Bu amaçla, çalışmamızda 20-22 aylık Sprague Dawley dişi sıçanlar altı hafta boyunca 1 ml/gün miktarında, polifenol değeri yüksek olan (668 mg/kg) ve düşük olan (77 mg/kg) zeytinyağları ile beslenmiştir. Beslenme süreci sonunda mekânsal hafıza ve anksiyete değerlendirilmesi yapılmış ve bu fonksiyonlar ile bağlantılı olan hipokampal nörojenez, hipokampus ve prefrontal korteks sinaptik yoğunluğu araştırılmıştır.

Zeytinyağı polifenollerinin etki mekanizmalarına baktığımızda yaşlanma ile ilgili hücresel süreçler ile örtüştüğü belirtilmektedir (127). Doğal bir antioksidan olan zeytinyağı polifenollerini kullanarak normal yaşlanma sürecinde artan oksidatif hasar, DNA hasarı, protein metabolizmasının bozulması ve kök hücre yıpranması gibi hücresel süreçlere müdahale ederek yaşlanmayı yavaşlatmak veya tersine çevirmek için birçok araştırma yapılmaktadır. Hipokampal nörojenez, yaşlanma sürecinden etkilenen başlıca süreçtir ve zamanla nörojenez azalmakta ve kognitif fonksiyonların azalmasına katkıda bulunduğu savunulmaktadır (7).

Çalışmamızda yüksek polifenollü zeytinyağının DG'ta bulunan bölünmekte olan hücreleri arttırıp arttırmadığına bakmak için BrdU immünohistokimya boyaması yapılmıştır. Beslemenin başladığı günden 14 gün sonra ilk BrdU enjeksiyonu

intraperitoneal olarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, beslenme süresini altı hafta olarak belirlenmesinde ve enjeksiyonun 14 gün sonra gerçekleştirilmesindeki amaç zeytinyağı kullanımı sonrasında hücre çoğalmasını incelemek ve hücrelerin olgunlaşmasına izin vermek için yaklaşık dört hafta olan olgunlaşma süresini beklemek idi. Bu süre; nörojenez sürecinde nöral kök hücrelerin olgunlaşp fonksiyonel nöral ağlara aktif olarak katıldığı sürenin yaklaşık altı hafta olmasına bağlı olarak belirlendi. Bu şekilde yapılan izleme ile zeytinyağı polifenollerinin hücrelerin hem çoğalma sürecine hem de olgunlaşma sürecine olan katkısının aydınlatılması amaçlandı.

Elde edilen deney verileri nöral hücre çoğalmasının YYP grubunda YDP ve YK grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğunu artan BrdU immünreaktivitesi ve nestin protein miktar analizleri ile gösterdi. Sonuç olarak, elde etmiş olduğumuz BrdU ve nestin verileri polifenol içeriği yüksek olan zeytinyağının günlük tüketiminin yaşlı DG'da hücre çoğalmasını arttırdığını hem immün boyama hem de protein miktar analizi olmak üzere iki farklı yöntem ile göstermektedir. Çoğalan hücrelerin olgunlaşma kapasitesinde olduğu ise bir olgunlaşma belirteci olan NeuN'nin YYP ve GYP grubunda YK grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek bulunması ile saptanmış oldu. Verilerimiz, D'Anrea ve ark.'nın (123) 15 aylık farelere hidroksitirozol'un (HT) 30 gün boyunca 100/mg/kg/gün miktarda içme suyuna karıştırarak verdikleri çalışma ile uyumluluk göstermektedir. D'Anrea ve ark. DG'ta BrdU ve NeuN boyamasıyla hücre çoğalmasının ve sağkalımının arttığını göstermişlerdir. Bizim çalışmamızla uyumlu bir başka çalışma ise Zheng ve ark.'nın (122) yapmış olduğu prenatal stres prosedürü uygulanmış sıçanlara 2 hafta boyunca 10 ve 50 mg/kg miktarda HT verildiği çalışmadır. Çalışmada yeni doğan sıçanlarda nörojenez NMDA reseptörlerinden R1, R2A ve R2B ile mRNA düzeyinde değerlendirilmiş ve reseptör ekspresyonlarının HT beslenmesi ile artması nörojenezin arttığı şeklinde yorumlanmıştır. Çalışmamızda kullanılan sıçanlar yaş itibarıyla diğer çalışmalarda kullanılanlardan yaşlıdır. Çalışmamızda insanlarda 60 yaşına denk gelen sıçanlar kullanılmıştır (24 ay). Bu yönü ile çalışmamız hipokampal hücre çoğalmasını ve olgunlaşmasının varlığını bu yaştaki sıçanlardaki gösteren ilk çalışmadır. Ayrıca, yapmış olduğumuz çalışmada kullandığımız zeytinyağı içeriğindeki polifenol miktarı oldukça

yüksektir. Deneş hayvanlarına verilen polifenol miktarları yönüyle çalışmamızı yukarıda bahsedilen araştırmalar ile karşılaştırdığımızda; Andrea ve ark.'ı saf HT'yi deneş hayvanlarına 100 mg/kg günlük tüketilen su ile (7 ml) birlikte vermişler, Zheng ve ark.'ı ise 10 ve 50 mg/kg HT'yi gavaj yolu ile deneş hayvanlarına vermişlerdir. Yapmış olduğumuz çalışmada ise HT dahil zeytinyağının içindeki tüm polifenol değerini yansıtan ve total polifenolik değeri 668 mg/kg zeytinyağı 2,7 mg/kg düzeyinde deneş hayvanlarına verilmiş ve nöral kök hücrelerin çoğalması ve olgunlaşması izlenmiştir. Yapılan diğer araştırmalar ile karşılaştırıldığında çalışmamızda kg başına verilen polifenol miktarı daha düşük düzeyde kalmaktadır. Ancak çalışmamızın, yüksek polifenol içerikli zeytinyağının oral yolla 6 hafta boyunca deneş hayvanlarına verilmesinin nöral hücre çoğalmasını ve olgunlaşmasını gösteren ilk çalışma olduğunu ve literatüre önemli bir katkı sağlayacağını öngörmekteyiz. Görüşümüzü yüksek polifenol içeriğinin hipokampal nörojenezini artırması, düşük polifenol içeriğinin ise bu etkiyi oluşturmaması desteklemektedir.

Morris su labirenti testinin ilk dört gününde sıçanların öğrenme davranışı değerlendirilmiştir. Tüm gruplarda testin 2. 3. ve 4. günündeki öğrenme parametreleri testin 1. gününe kıyasla iyileşmiştir. Bu sonuç, sıçanların öğrenme becerilerinde herhangi bir problem olmadığını yani platformun yerini öğrendiklerini göstermektedir. Gruplar arası değerlendirmede genç grubun yaşlı gruplara göre platformun yerini bulma süresinin daha az olması ve kat edilen toplam mesafenin fazla olması öğrenmenin genç grupta daha iyi olduğuna işaret etmektedir. Öğrenmenin gençlerde daha hızlı olduğu ile ilgili verilemiz literatür ile uyumluluk göstermektedir (128).

Artan nörojenezin hipokampus bağımlı bellekle ilişkisini incelemek amacıyla altı hafta sonunda Morris su labirenti testi uygulanmıştır. Nörojenezin ve sinaptik yoğunluğun mekânsal belleğe potansiyel katkısı çalışmamızda gösterilememiştir. Fark görülememesine neden olabilecek faktörler şu şekilde sıralanabilir: a. Kullanılan Morris su labirenti testinin nörojenez artışını net olarak ortaya koymakta yetersiz kalması, b. Kullandığımız zeytinyağı içindeki polifenol miktarının davranışta herhangi bir değişikliğe neden olacak düzeyde olmaması, c. İnsan karşılığı olarak 60 yaş civarına gelen deneş

hayvanlarında henüz mekânsal bellekte belirgin bir dejenerasyonun henüz oluşmamış olması.

Kempermann ve ark. (129) tarafından a şikkında belirtmiş olduğumuz Morris su tankı testinin yetersizliğine yönelik yorumlar yapılmıştır. Araştırmacılar Morris su labirent testinde kullanılan parametrelerin çoğalan hücrelerin beyin fonksiyonlarına katkısını tam olarak ifade edemediğini ve bir takım matematiksel simülasyonlara gereksinim olduğunu savunmaktadırlar. Bu görüşü destekleyen diğer çalışmalarda ise, Morris su labirenti testinde yaygın olarak kullanılan parametreler dışında dendat granül nöronlarının fonksiyonu olan patern ayırımının belirlenmesinin mekânsal hafızayı daha doğru bir şekilde ortaya koyduğu savunulmaktadır. Bunun için platformun yerinin değiştirilmesi ile yapılan deney kurgularının ve “arama stratejisi” denilen ve platformu bulmaya yönelik sıçan davranışının belirli matematiksel hesaplar ile analiz edilmesinin daha kesin bilgi verdiği düşünülmektedir (129,130).

Mekansal bellekte kullanılan polifenol miktarının önemini Zhang ve ark.’nın (131) çay polifenollerini kullanarak yaptığı araştırma ortaya koymaktadır. Zhang ve ark. 3-4 aylık dişi sıçanların yumurtalıklarını diseke ederek menopoz ve yaşlanma modeli oluşturmuşlar ve 12 hafta boyunca oral gavaj ile 75, 150 ve 300 mg/kg miktarında çay polifenolünü deney hayvanlarına vererek mekânsal bellekteki değişimi incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda sadece 300 mg/kg miktarındaki grupta mekânsal bellekte bir iyileşme görüldüğü ifade edilmektedir. Bu araştırmalara göre kullanmış olduğumuz zeytinyağındaki polifenol miktarı mekânsal hafıza gelişimi için yeterli gelmemiş olabilir ancak karşılaştırma yaptığımız araştırmalarda polifenol kaynağı olarak çay kullanılmış olmasının da göz önüne alınması gereken bir nokta olduğunu düşünmekteyiz. Yukarıda c maddesinde belirtilen diğer olasılık ise mekânsal bellek bozulmasının ölçtüğümüz yaşta belirgin olmamasıdır. Zeytinyağı polifenollerini ile kemirgenler üzerinde yapılan çalışmalara baktığımızda, Morris su labirenti testinde bizim deney kurgumuzla uyumlu ve çalışmamızın bulgularıyla benzer sonuçlar olduğunu da görmekteyiz. Pitozzi ve ark.’nın (121) on aylık ve beş aylık fareler ile yaptığı çalışmada, on iki ay süren yüksek (6 mg/kg) ve düşük polifenol içerikli yem ile beslenen farelerde mekânsal hafıza platformun olduğu

yeri geçme frekansını, platformun olduğu kadranda geçirilen süre ve platformun bulunduğu yerde geçirilen süreler değerlendirilmiştir ve hem yaşlı gruplar arasında hem de yaşlı gruplara kıyasla geen grupta fark bulunamamıştır. Araştırmacılar bu sonucu Morris su labirenti testinde yaşa bağlı farklılığın 24 aylık sıçanlarda sadece öğrenme fazında belirgin olduğu şeklinde yorumlamışlardır. Çalışmamızdaki ğrenme ve bellek testi sonuçları ile araştırmacıların yorumu uyumluluk göstermektedir.

Çalışmamızda artan nörojenezin sıçanlarda görülen anksiyete benzeri davranışa etkisinin değerlendirmesi amacıyla tikmotaksik yüzme, açık alan testi ve yükseltilmiş artı labirent testi kullanıldı. Morris su labirenti testinde kullanılan tıgmotaksik yüzme parametresi, havuzun i duvarlarına dokunarak yüzme davranışıdır ve sıçanlar stresli bir evredeyken gözlemlenmektedir. Stres hakkında bilgi veren tikmotaksik yüzme parametresinde GYP grubunun havuzun kenarlarında daha az zaman geçirmesi bu grupta anksiyetenin daha az olduğuna işaret etmektedir. Fakat bu tek başına yüksek polifenollü beslenmenin anksiyeteye etkisini açıklamak için yeterli değildir. Anksiyeteyi değerlendirmek için kullandığımız yükseltilmiş artı labirent ve açık alan testine baktığımızda yüksek ya da düşük polifenolün anksiyete benzeri davranışa bir etkisi tespit edilememiştir. Nrojenezdeki artışın anksiyete benzeri davranışa etkisi tartışmalı bir konudur. Bazı çalışmalarda nörojenezin anksiyete benzeri davranışı iyileştirmesi için önceden varolan bir stres modelinin gerekli olduğu savunulmaktadır. Hill ve ark.'nın (31) alışmasında transjenik hayvan modeli kullanılarak hipokampal nörojenezin artması sağlanmış fakat açık alan testi ve yükseltilmiş artı labirent değerlendirmesi sonucunda kontrol grubuna kıyasla anksiyetede herhangi bir farklılık görülmemiştir. Deneyin devamında kortikosteron uygulanarak stres modeli oluşturulmuş ve sonrasında tamoksifen indüksiyonu ile nörojenezin artması sağlanmıştır. Yapılan analizlerde açık alan testinde bir fark bulunamazken yükseltilmiş artı labirent testinde nörojenezdeki artma ile birlikte anksiyete benzeri davranışta iyileşme görülmüştür. Bizim alışmamızda ise geen grup da dahil olmak üzere nörojenez destekleyen tüm moleküler parametrelerde artış görülmesine rağmen anksiyete parametrelerinde herhangi bir fark görülmemesinin

nedeninin deney modelimizin önceden var olan bir stres üzerine yapılandırılmamış olması olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızda doğal bir antioksidan olan zeytinyağı polifenollerinin yaşlı sıçanların hipokampuslerinde koruyucu etki gösterip göstermediğini belirlemek amacıyla kalbindin protein seviyesini değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda YYP grubunda kalbindin düzeyinin yüksek bulunması, yüksek polifenollü zeytinyağı tüketiminin hipokampüste kalsiyum tamponlama kapasitesini arttırdığını göstermektedir. Ayrıca çalışmamızda GYP grubunun kalbindin seviyesi YYP grubu ile benzer bulunmuştur ve bu sonuç yüksek polifenolün yaşlı hipokampusünde kalbindin seviyesini koruduğunu düşündürmektedir. Zeytinyağı polifenollerinin hipokampüsteki kalbindin miktarına etkisini gösteren bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Polifenollerin kalsiyum metabolizmasına etkisini araştıran çalışmalar çoğunlukla in vitro ve kalsiyum konsantrasyonundaki değişiklikleri gösteren çalışmalardır. Carey ve ark. (132) sıçanların primer hipokampal nöronlarını kullanarak yaptıkları çalışmada, polifenol kaynağı olarak çoklu doymamış yağ asitlerinden zengin ceviz ekstraktı kullanmışlardır ve lipopolisakkarit/dopamine maruziyeti ile bozulan kalsiyum regülasyonunun hücrelerde iyileştiği kalsiyum görüntüleme yöntemi ile gösterilmiştir. Yapmış olduğumuz bu çalışmanın, yüksek polifenollü zeytinyağının yaşlanma sürecinde azalan kalsiyum tamponlama mekanizmasını kalbindin düzeyi üzerine etki ederek düzenlediğini göstermesi yönü ile literatüre önemli bir katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Sinaptofizin, sinaptik yoğunluğun değerlendirilmesinde sıkça kullanılan bir proteindir ve genellikle mekânsal bellek analizleri ile birlikte değerlendirilmektedir. Yaşlanma ile belleğin azalmasının sinaptik yoğunluk azalması ile ilişkili olduğu bilinmektedir (87). Bu bilgiye dayanarak araştırmamızda sinaptik yoğunluğu değerlendirmek amacıyla sinaptofizin düzeyleri incelenmiştir. Çalışmamızda, hipokampal sinaptofizin düzeyi yüksek polifenol ile beslenen yaşlı ve genç grupta artış göstermesine karşın bu artışın istatistiksel olarak anlamlı bir artış olmadığı saptandı. Smith ve ark.'nın (133) 6 aylık genç ve 24-28 aylık yaşlı sıçanlardaki hipokampal sinaptofizin düzeylerini ve öğrenme ve bellek davranışını karşılaştırdığı çalışma da bizim çalışmamızla benzer

sonuçlara sahiptir. Smith ve ark. sinaptofizin düzeyini IHC ile belirlenmişler ve mekânsal bellek Morris su labirenti ile test etmişlerdir. Bu araştırmada mekânsal belleği bozulmamış olan genç ve yaşlı grup arasında sinaptofizin yoğunluğu ve mekânsal bellek açısından bir fark görülmezken, mekânsal belleği bozulmuş yaşlı sıçanlarda sinaptofizin yoğunluğunun azaldığı tespit edilmiştir. Bu çalışma hem yaş ile hipokampal sinaptofizin düzeyi hem de mekânsal bellek ve hipokampüsteki sinaptofizin düzeyi arasındaki ilişkiyi göstermesi açısından çalışmamızı destekler niteliktedir.

Sinaptofizin ve mekânsal bellek arasındaki ilişki çeşitli araştırmalara konu olsa da özellikle zeytinyağı polifenollerinden ne şekilde etkileneceği henüz tam olarak aydınlatılmış değildir. Wang ve ark.'nın (134) 3, 6, 18 ve 24 aylık sıçanları kullanarak yaptıkları çalışmada yüksek antioksidan kapasitesi ile bilinen *polygonum multiflorum* bitkisi ekstratı 21 aylık sıçanlara düşük (30 mg/kg) ve yüksek (60 mg/kg) dozlarda 3 ay boyunca intragastrik yöntem ile verilmiştir. Değerlendirme sonunda hipokampal sinaptofizin miktarları ölçülmüş ve sonuç olarak düşük dozla beslenen sıçanların sinaptofizin düzeylerinde beslenmeyenlere göre farklılık gözlenmezken; yüksek dozla beslenenlerin hipokampüslerinde hem düşük doza hem de diğer gruplara kıyasla anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Bu çalışma, polifenol miktarına bağlı etkinin ortaya konulması açısından önemlidir. Zeytinyağı polifenollerinin sinaptofizin düzeyine etkisini gösteren çalışma ise Lauretti ve ark.'nın (135) transgenik hTau Alzheimer fare modeli ile yaptıkları bir çalışmadır. 6 aylık sıçanlar toplam polifenol miktarı 253 mg/kg olan zeytinyağlı diyetle (50 mg/kg/diyet) 6 ay boyunca beslenmiştir. Çalışmada yaptıkları protein miktar analizinde sıçanlarda hipokampal ve serebral korteks sinaptofizin düzeylerinde anlamlı bir fark bulunamamıştır. Morris su labirenti testinde platformun olduğu alana girme sayısı yüksek polifenol ile beslenen grupta daha yüksek bulunmuştur, bu da yüksek polifenol ile beslenmenin mekânsal belleği iyileştirdiği şeklinde yorumlanmıştır. Bizim çalışmamızda sinaptik bütünlük açısından bir fark görülmemesi mekânsal bellek ile hipokampal sinaptik yoğunluk ilişkisini doğrular niteliktedir. Ayrıca, çalışmamızda kullandığımız polifenol miktarını göz önünde bulundurursak daha yüksek miktarda verilen polifenol miktarının hipokampal sinaptofizin düzeyini etkileyebileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda yüksek polifenollü zeytinyağı ile beslenmenin hipokampüsteki sinaptofizin düzeyinin yanı sıra prefrontal korteks sinaptofizin düzeyi de analizi edildi. Yapılan analizde günlük zeytinyağı tüketiminin prefrontal kortekste yaş ile azalan sinaptik bütünlüğü arttırdığı gösterildi. Polifenollerin sinaptik bütünlüğe etkisi daha önce yapılan çalışmalarda da gösterilmiştir. Bir yeşil çay polifenolu olan epigallocatekin galat (EGCG) Guo ve ark. (136) tarafından SAMP8 farelere 5 ve 15 mg/kg miktarda 8 hafta boyunca içme suyuna karıştırılarak verilmiş ve frontal kortekste ölçülen sinaptofizin miktarının hem düşük hem de yüksek miktar polifenol uygulanan farelerde arttığı gösterilmiştir. Prefrontal korteksin anatomisi ve bilişsel fonksiyonlarla olan ilişkisi insan ve kemirgenlerde farklılık göstermektedir. İnsanlardaki anatomik sınırları ve bağlantıları iyi bilinen prefrontal korteksin kemirgenlerdeki yeri literatürde tartışmalıdır. İnsanlarda dikkat, bilginin işleme hızı, karar verme gibi yüksek bilişsel fonksiyonların oluşmasını sağlayan beyin yapısı olan prefrontal korteksin kemirgenlerdeki fonksiyonunun çalışma hafızası ile sınırlı olduğu savunulmaktadır (137). Bu nedenle, çalışmamızda prefrontal korteks sinaptik yoğunluğu artmış olmasına rağmen bu artışın fonksiyonel yansıması Morris su labirenti testi, açık alan testi ve yükseltilmiş artı labirent testi ile ölçülememiş olabilir. Sonuç olarak çalışmamızda yüksek polifenollü zeytinyağı ile beslenme kognitif kontrol davranışı için gerekli olan prefrontal korteks bölgesinde sinaptik bütünlüğü arttırmıştır.

Parametreler arasındaki ilişkinin olup olmadığına bakmak için korelasyon analizi yapıldı. Yapılan analize göre biyokimyasal ve histolojik belirteçler ve davranış testindeki parametreler korele değildi. Bu bulgulara göre belirteçlerin davranışa etkisi olmadığını düşünmekteyiz. Moleküler parametrelerde saptanılan nestin protein miktarı ile calbindin arasındaki pozitif yöndeki korelasyon çoğalan hücrelerin olgunlaşp kalsiyum tamponlayabilen nöronlara dönüşmüş olabileceğine işaret etmektedir. Nestin genel olarak nöral kök hücrelerden eksprese edilse de merkezi sinir sistemindeki diğer nöronlarda da olduğunu gösteren çalışmalar vardır (138). Nestin ve calbindin arasında korelasyon saptanmış olsa da düzeyinlere total hipokampus dokusunda bakıldığı için, DG'deki nestin ve calbindin ekspresyonunu gösteren veriler daha doğru bilgi verecektir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız yüksek polifenollü zeytinyağının günlük tüketiminin (2.7mg/kg) yaşlı hipokampüsünde nörojenezi nöral kök hücre çoğalması ve olgunlaşmasını ifade eden belirteçler ile izleyen ilk çalışma niteliğindedir. Yüksek polifenollü zeytinyağı tüketimi yaşlı hipokampüsündeki kök hücrelerin çoğalmasını ve sağ kalımını arttırmıştır. Yüksek polifenol içeren zeytinyağı ayrıca hipokampal kalbindin proteini artışı ile hipokampal kalsiyum tamponlama kapasitesinin korunmasını desteklediğini öngörmekteyiz. Ayrıca prefrontal kortekste sinaptik iletiyi destekleyici bir protein olan sinaptofizinin, zeytinyağı tüketimine bağlı olarak artmış olması beyin yaşlanmasına karşı koruyucu etkisini gösterebilir niteliktedir.

Çalışmamız aynı zamanda düşük ve yüksek polifenol içeren zeytinyağı tüketimini nörojenik etki yönüyle karşılaştıran ilk çalışmadır. Çalışmamızda düşük polifenollü zeytinyağının nörojenik etki sağlamadığı ortaya koyulmuştur. Hipokampal kalbindin ve prefrontal korteks sinaptofizin miktarı düşük polifenol içeren zeytin yağı tüketimi ile anlamlı bir değişim göstermemiştir. Düşük polifenol tüketimine dair tüm bulgular beyin yaşlanmasında beslenme ile alınan polifenol miktarının beyin yaşlanmasında koruyucu etki sağlamadaki önemini ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda zeytinyağı tüketiminin mekânsal bellek ve anksiyete benzeri davranış üzerindeki etkisi gösterilememiştir. Nörojenik ve koruyucu etkiye rağmen mekânsal bellekte herhangi bir iyileşme görülmemesi kullandığımız günlük polifenol miktarına bağlı olabilir (2,7 mg/kg) ve daha yüksek polifenol tüketiminin bellekte de iyileşme sağlayabileceğini öngörmekteyiz. Bu bağlamda, bellekteki muhtemel iyileşmeyi polifenol miktarına bağlı olarak araştırarak çalışmaların literatüre önemli bir katkı sağlayacağını düşünüyoruz.

7. KAYNAKLAR

1. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *Journal of Comparative Neurology*. 1965;
2. Spalding KL, Bergmann O, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Huttner HB, et al. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell*. 2013;
3. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell*. 2013 Jun;153(6):1194–217.
4. Nicaise AM, Willis CM, Crocker SJ, Pluchino S. Stem Cells of the Aging Brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2020;12(August):1–23.
5. Boldrini M, Fulmore CA, Tartt AN, Simeon LR, Pavlova I, Poposka V, et al. Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell*. 2018 Nisan;22(4):589-599.e5.
6. Abdallah N, Ben S. L., & Lipp, H.-P.(2007). Reversible Effect of X-Irradiation on Proliferation, Neurogenesis, and Cell Death in the Dentate Gyrus of Adult Mice.
7. Negredo PN, Yeo RW, Brunet A. Aging and Rejuvenation of Neural Stem Cells and Their Niches. *Cell Stem Cell*. 2020;27(2):202–23.
8. Couillard-Despres S, Wuertinger C, Kandasamy M, Caioni M, Stadler K, Aigner R, et al. Ageing abolishes the effects of fluoxetine on neurogenesis. 2009; Available from: www.nature.com/mp
9. Anacker C, Hen R. Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility-linking memory and mood. *Nature Reviews Neuroscience*. 2017;
10. Perera TD, Coplan JD, Lisanby SH, Lipira CM, Arif M, Carpio C, et al. Antidepressant-Induced Neurogenesis in the Hippocampus of Adult Nonhuman Primates. *J Neurosci*. 2007 May 2;27(18):4894.
11. Gurău F, Baldoni S, Prattichizzo F, Espinosa E, Amenta F, Procopio AD, et al. Anti-senescence compounds: A potential nutraceutical approach to healthy aging. *Ageing Research Reviews*. 2018;
12. Bonaccio M, Di Castelnuovo A, Costanzo S, Pounis G, Persichillo M, Cerletti C, et al. Mediterranean-type diet is associated with higher psychological resilience in a general adult population: Findings from the Moli-sani study. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2018;
13. Watson C, Kirkcaldie M, Paxinos G. *The brain: an introduction to functional neuroanatomy*. Academic Press; 2010.

14. Ackerman S. Major Structures and Functions of the Brain. In: *Discovering the Brain* [Internet]. Washington (DC): National Academies Press (US); 1992. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK234155/>
15. Squire LR, Zola-Morgan M. Conscious and unconscious memory systems. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015 Mar 2;7(3):a021667.
16. Annese J, Schenker-Ahmed NM, Bartsch H, Maechler P, Sheh C, Thomas N, et al. Postmortem examination of patient H.M.'s brain based on histological sectioning and digital 3D reconstruction. *Nature Communications*. 2014 Oct;5(1):3122.
17. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum S, Hudspeth AJ, Mack S. *Principles of neural science*. Vol. 4. McGraw-hill New York; 2000.
18. Mishkin M, Malamut B, Bachevalier J. Memories and habits: Two neural systems. In: Lynch G, McGaugh JL, Weinberger NM, editors. *Neurobiology of Learning and Memory*. New York: Guilford; 1984. p. 65–77.
19. Packard MG, McGaugh JL. Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. *Neurobiol Learn Mem*. 1996 Jan;65(1):65–72.
20. Insausti R, Amaral DG. Hippocampal Formation. *The Human Nervous System: Second Edition*. 2003. 871–914 p.
21. Bartsch T, Wulff P. The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability. *Neuroscience*. 2015 Nov 19;309:1–16.
22. Fanselow MS, Dong HW. Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? *Neuron*. 2010;65(1):7–19.
23. Shors TJ, Miesegans G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature*. 2001 Mar 1;410(6826):372–6.
24. Dupret D, Revest JM, Koehl M, Ichas F, De Giorgi F, Costet P, et al. Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS One*. 2008 Apr 9;3(4):e1959.
25. Yassa MA, Stark CEL. Pattern separation in the hippocampus. *Trends in Neurosciences*. 2011 Ekim;34(10):515–25.
26. Danielson NBB, Kaifosh P, Zaremba JDD, Lovett-Barron M, Tsai J, Denny CAA, et al. Distinct Contribution of Adult-Born Hippocampal Granule Cells to Context Encoding. *Neuron*. 2016 Apr;90(1):101–12.

27. Bergami M, Masserdotti G, Temprana SG, Motori E, Eriksson TM, Göbel J, et al. A Critical Period for Experience-Dependent Remodeling of Adult-Born Neuron Connectivity. *Neuron*. 2015;85(4):710–7.
28. Kee N, Teixeira CM, Wang AH, Frankland PW. Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus *ARTICLE S. NATURE NEUROSCIENCE VOLUME* [Internet]. 2007;10. Available from: <http://www.nature.com/natureneuroscience>
29. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*. 1997 Apr 3;386(6624):493–5.
30. Wu MV, Shamy JL, Bedi G, Choi CWJ, Wall MM, Arango V, et al. Impact of Social Status and Antidepressant Treatment on Neurogenesis in the Baboon Hippocampus. *Neuropsychopharmacology*. 2014;39:1861–71.
31. Hill AS, Sahay A, Hen R. Increasing Adult Hippocampal Neurogenesis is Sufficient to Reduce Anxiety and Depression-Like Behaviors. *Neuropsychopharmacology*. 2015/04/02 ed. 2015 Eylül;40(10):2368–78.
32. Rakic P. Pre- and post-developmental neurogenesis in primates. *Clinical Neuroscience Research*. 2002;
33. Bergmann O, Liebl J, Bernard S, Alkass K, Yeung MSY, Steier P, et al. The Age of Olfactory Bulb Neurons in Humans. *Neuron*. 2012;74(4):634–9.
34. Ernst A, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Perl S, Tisdale J, et al. Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell*. 2014 Feb 27;156(5):1072–83.
35. Bond AM, Ming GL, Song H. Adult Mammalian Neural Stem Cells and Neurogenesis: Five Decades Later. *Cell Stem Cell*. 2015;
36. Ernst A, Frisén J. Adult neurogenesis in humans- common and unique traits in mammals. *PLoS Biol*. 2015 Ocak;13(1):e1002045–e1002045.
37. Mu Y, Gage FH. Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer’s disease. *Molecular Neurodegeneration*. 2011 Aralık;6(1):85.
38. Imayoshi I, Sakamoto M, Ohtsuka T, Takao K, Miyakawa T, Yamaguchi M, et al. Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nature Neuroscience*. 2008 Ekim;11(10):1153–61.
39. Gault N, Szele FG. Immunohistochemical evidence for adult human neurogenesis in health and disease. *WIREs Mechanisms of Disease*. 2021;13(6):e1526.
40. Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine*. 1998 Kasım;4(11):1313–7.

41. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Eylül;94(19):10409–14.
42. Jabès A, Lavenex PB, Amaral DG, Lavenex P. Quantitative analysis of postnatal neurogenesis and neuron number in the macaque monkey dentate gyrus. *Eur J Neurosci*. 2010 Jan;31(2):273–85.
43. Kornack DR, Rakic P. Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 May 11;96(10):5768–73.
44. Gonçalves JT, Schafer ST, Gage FH. Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell*. 2016;
45. Clelland CD, Choi M, Romberg C, Clemenson GD Jr, Fragniere A, Tyers P, et al. A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science*. 2009 Temmuz;325(5937):210–3.
46. Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis. *Cell*. 2008 Feb 22;132(4):645–60.
47. Greene-Schloesser D, Moore E, Robbins ME. Molecular pathways: radiation-induced cognitive impairment. *Clin Cancer Res*. 2013/02/06 ed. 2013 May 1;19(9):2294–300.
48. Kozareva DA, Cryan JF, Nolan YM. Born this way: Hippocampal neurogenesis across the lifespan. *Aging Cell*. 2019 Oct;18(5):e13007.
49. Jin K, Peel AL, Mao XO, Xie L, Cottrell BA, Henshall DC, et al. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jan 6;101(1):343–7.
50. Vicidomini C, Guo N, Sahay A. Communication, Cross Talk, and Signal Integration in the Adult Hippocampal Neurogenic Niche. *Neuron*. 2020 Jan 22;105(2):220–35.
51. Gage FH, Coates PW, Palmer TD, Kuhn HG, Fisher LJ, Suhonen J O, et al. Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. Vol. 92, *Neurobiology*. 1995 p. 11879–83.
52. Pluvinage JV, Wyss-Coray T. Systemic factors as mediators of brain homeostasis, ageing and neurodegeneration. Available from: www.nature.com/nrn
53. Balu DT, Lucki I. Adult hippocampal neurogenesis: Regulation, functional implications, and contribution to disease pathology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2009 Mar;33(3):232–52.
54. Kempermann G. Adult neurogenesis: An evolutionary perspective. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2016;

55. Hirokawa N, Glicksman MA, Willard MB. Organization of mammalian neurofilament polypeptides within the neuronal cytoskeleton. *The Journal of cell biology*. 1984 Apr;98(4):1523–36.
56. Bernal A, Arranz L. Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2018;75:2177–95.
57. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RDG. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*. 1990;60(4):585–95.
58. Hua Jiang M, Cai B, Tuo Y, Wang J, Jun Zang Z, Tu an, et al. Characterization of Nestin-positive stem Leydig cells as a potential source for the treatment of testicular Leydig cell dysfunction. *Cell Research*. 2014;24:1466–85.
59. Amoh Y, Li L, Katsuoka K, Penman S, Hoffman RM. Multipotent nestin-positive, keratin-negative hair-follicle bulge stem cells can form neurons [Internet]. 2005. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0501263102
60. Chou YH, Khuon S, Herrmann H, Goldman RD. Nestin Promotes the Phosphorylation-dependent Disassembly of Vimentin Intermediate Filaments During Mitosis. *Molecular Biology of the Cell*. 2003;14:1468–78.
61. Mignone JL, Kukekov V, Chiang AS, Steindler D, Enikolopov G. Neural Stem and Progenitor Cells in Nestin-GFP Transgenic Mice. *J Comp Neurol*. 2004;469:311–24.
62. Haeseleer F, Palczewski K. CALMODULIN AND Ca²⁺-BINDING PROTEINS (CaBPs): VARIATIONS ON A THEME.
63. Wasserman RH, Taylor AN. Vitamin d3-induced calcium-binding protein in chick intestinal mucosa. *Science (New York, NY)*. 1966 May;152(3723):791–3.
64. Schmidt H. Three functional facets of calbindin D-28k. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2012;5(FEBRUARY 2012):1–7.
65. Baimbridge KG, Celio MR, Rogers JH. Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends in Neurosciences*. 1992 Aug;15(8):303–8.
66. Guo Q, Christakos S, Robinson N, Mattson MP. Calbindin D28k blocks the proapoptotic actions of mutant presenilin 1: Reduced oxidative stress and preserved mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998 Mar 17;95(6):3227.
67. Vol V, Britain G, Press P. CALBINDIN D-28k AND PARVALBUMIN IN THE RAT. 2002;35(2):1–101.
68. Jinno S, Kosaka T. Cellular architecture of the mouse hippocampus: A quantitative aspect of chemically defined GABAergic neurons with stereology. *Neuroscience Research*. 2006;56(3):229–45.

69. Müller A, Kukley M, Stausberg P, Beck H, Müller W, Dietrich D. Endogenous Ca²⁺ Buffer Concentration and Ca²⁺ Microdomains in Hippocampal Neurons. *The Journal of Neuroscience*. 2005 Jan;25(3):558 LP – 565.
70. Scharfman HE, Schwartzkroin PA. Protection of dentate hilar cells from prolonged stimulation by intracellular calcium chelation. *Science (New York, NY)*. 1989 Oct;246(4927):257–60.
71. Li JT, Xie XM, Yu JY, Sun YX, Liao XM, Wang XX, et al. Suppressed Calbindin Levels in Hippocampal Excitatory Neurons Mediate Stress-Induced Memory Loss. *Cell Reports*. 2017;21(4):891–900.
72. Jahn R, Schiebler W, Ouimet C, Greengard P. A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles (synapsin I/subcellular fractionation/integral membrane protein). Vol. 82, *Cell Biology*. 1985 p. 4137–41.
73. Barnekow A, Jahn R, Scharf M. Synaptophysin: a substrate for the protein tyrosine kinase pp60c-src in intact synaptic vesicles. *Oncogene*. 1990 Jul;5(7):1019–24.
74. O'Dell TJ, Kandel ER, Grant SG. Long-term potentiation in the hippocampus is blocked by tyrosine kinase inhibitors. *Nature*. 1991 Oct;353(6344):558–60.
75. Calhoun ME, Jucker M, Martin LJ, Thinakaran G, Price DL, Mouton PR. Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses. *Journal of neurocytology*. 1996 Dec;25(12):821–8.
76. Alder J, Kanki H, Valtorta F, Greengard P, Pool M ming. Overexpression of Synaptophysin Enhances Neurotransmitter Secretion at *Xenopus* Neuromuscular Synapses. Vol. 15, *The Journal of Neuroscience*. 1995 p. 511–9.
77. Rocher AB, Chapon F, Blaizot X, Baron JC, Chavoix C. Resting-state brain glucose utilization as measured by PET is directly related to regional synaptophysin levels: a study in baboons. *NeuroImage*. 2003;20(3):1894–8.
78. Alder J, Lu B, Valtorta F, Greengard P, Poo MM. Calcium-dependent transmitter secretion reconstituted in *Xenopus* oocytes: requirement for synaptophysin. *Science*. 1992 Jul;257(5070):657 LP – 661.
79. Schmitt U, Tanimoto N, Seeliger M, Schaeffel F, Leube RE. Detection of behavioral alterations and learning deficits in mice lacking synaptophysin. *Neuroscience*. 2009 Aug 18;162(2):234–43.
80. Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*. 1992 Sep;116(1):201–11.
81. Duan W, Zhang YP, Hou Z, Huang C, Zhu H, Zhang CQ, et al. Novel Insights into NeuN: from Neuronal Marker to Splicing Regulator. *Molecular neurobiology*. 2016 Apr;53(3):1637–47.

82. Lind D, Franken S, Kappler J, Jankowski J, Schilling K. Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular localization. *Journal of neuroscience research*. 2005 Feb;79(3):295–302.
83. Scahill RI, Frost C, Jenkins R, Whitwell JL, Rossor MN, Fox NC. A Longitudinal Study of Brain Volume Changes in Normal Aging Using Serial Registered Magnetic Resonance Imaging. *Archives of Neurology*. 2003 Jul;60(7):989–94.
84. Hedman AM, Haren NEMV, Schnack HG, Kahn RS, Pol HEH. Human Brain Changes Across the Life Span: A Review of 56 Longitudinal Magnetic Resonance Imaging Studies. *Human Brain Mapping*. 2012;33:1987–2002.
85. Liu X, Erikson C, Brun A. Cortical Synaptic Changes and Gliosis in Normal Aging, Alzheimer’s Disease and Frontal Lobe Degeneration. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*. 1996;7(3):128–34.
86. Hedden T, Gabrieli JDE. Insights into the ageing mind: a view from cognitive neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience*. 2004;5(2):87–96.
87. VanGuilder HD, Yan H, Farley JA, Sonntag WE, Freeman WM. Aging alters the expression of neurotransmission-regulating proteins in the hippocampal synaptoproteome. *Journal of Neurochemistry*. 2010 Haziran;113(6):1577–88.
88. Mukherjee J, Christian BT, Dunigan KA, Shi B, Narayanan TK, Satter M, et al. Brain imaging of 18F-fallypride in normal volunteers: Blood analysis, distribution, test-retest studies, and preliminary assessment of sensitivity to aging effects on dopamine D-2/D-3 receptors. *Synapse*. 2002;46(3):170–88.
89. Mattson MP, Maudsley S, Martin B. BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. Available from: www.sciencedirect.com
90. Volchegorskii IA, Shemyakov SE, Turygin VV, Malinovskaya NV. The age dynamics of monoamine oxidase activity and levels of lipid peroxidation products in the human brain. *Neurosci Behav Physiol*. 2004 May;34(4):303–5.
91. Wang X, Michaelis E. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2010;2:12.
92. Geinisman Y, Toledo-Morrellt LD, Morrellt F. Loss of perforated synapses in the dentate gyrus: Morphological substrate of memory deficit in aged rats (agnng/spatial memory/synapse quantitation). *Proc Nati Acad Sci USA*. 1986;
93. Small SA, Chawla MK, Buonocore M, Rapp PR, Barnes CA. Imaging correlates of brain function in monkeys and rats isolates a hippocampal subregion differentially vulnerable to aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;

94. Halliwell B. Reactive Oxygen Species and the Central Nervous System. *Journal of Neurochemistry*. 1992 Kasim;59(5):1609–23.
95. Yagami T, Ueda K, Asakura K, Nakazato H, Hata S, Kuroda T, et al. Human group IIA secretory phospholipase A2 potentiates Ca²⁺ influx through L-type voltage-sensitive Ca²⁺ channels in cultured rat cortical neurons. *Journal of Neurochemistry*. 2003 May 1;85(3):749–58.
96. Kumar A, Foster TC. Enhanced Long-Term Potentiation During Aging Is Masked by Processes Involving Intracellular Calcium Stores. *Journal of Neurophysiology*. 2004 Haziran;91(6):2437–44.
97. Kishimoto J, Tsuchiya T, Cox H, Emson PC, Nakayama Y. Age-related changes of calbindin-D28k, calretinin, and parvalbumin mRNAs in the hamster brain. *Neurobiol Aging*. 1998 Feb;19(1):77–82.
98. Riascos D, de Leon D, Baker-Nigh A, Nicholas A, Yukhananov R, Bu J, et al. Age-related loss of calcium buffering and selective neuronal vulnerability in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2011 Nov;122(5):565–76.
99. Bliss TVP, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 1993;361(6407):31–9.
100. Molinari S, Batjini R, Ferrari S, POzzit L, KILLCROSS^t AS, ROBBIN^t TW, et al. Deficits in memory and hippocampal long-term potentiation in mice with reduced calbindin D28K expression (calcium/synaptic plasticity/antisense transgenic mouse). Vol. 93, *Neurobiology*. 1996 p. 8028–33.
101. Li JT, Xie XM, Yu JY, Sun YX, Liao XM, Wang XX, et al. Suppressed Calbindin Levels in Hippocampal Excitatory Neurons Mediate Stress-Induced Memory Loss. *Cell Reports*. 2017;21(4):891–900.
102. Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: The dark side of tumor suppression. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2010;5:99–118.
103. Fjell AM, Walhovd KB, Fennema-Notestine C, Mcevoy LK, Hagler DJ, Holland D, et al. Behavioral/Systems/Cognitive One-Year Brain Atrophy Evident in Healthy Aging. 2009; Available from: <http://www.loni.ucla.edu/ADNI/Data/>
104. Park DC, Reuter-Lorenz P. The Adaptive Brain: Aging and Neurocognitive Scaffolding. *Annual Review of Psychology*. 2008 Nov;60(1):173–96.
105. Park DC, Reuter-Lorenz P. The Adaptive Brain: Aging and Neurocognitive Scaffolding. *Annual Review of Psychology*. 2009;
106. Vidal-Piñeiro D, Valls-Pedret C, Fernández-Cabello S, Arenaza-Urquijo EM, Sala-Llonch R, Solana E, et al. AGING NEUROSCIENCE Decreased Default Mode

Network connectivity correlates with age-associated structural and cognitive changes. 2014; Available from: www.frontiersin.org

107. Longo VD, Antebi A, Bartke A, Barzilai N, Brown-Borg HM, Caruso C, et al. Interventions to Slow Aging in Humans: Are We Ready? *Aging Cell*. 2015 Aug;14(4):497–510.
108. Ververidis F, Trantas E, Douglas C, Vollmer G, Kretzschmar G, Panopoulos N. Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health. *Biotechnology Journal*. 2007;
109. Figueira I, Menezes R, Macedo D, Costa I, Dos Santos CN. Polyphenols Beyond Barriers: A Glimpse into the Brain. *Curr Neuropharmacol*. 2017;15(4):562–94.
110. Narita K, Hisamoto M, Okuda T, Takeda S. Differential neuroprotective activity of two different grape seed extracts. *PLoS ONE*. 2011;
111. Arora A, Byrem TM, Nair MG, Strasburg GM. Modulation of Liposomal Membrane Fluidity by Flavonoids and Isoflavonoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2000 Jan;373(1):102–9.
112. Williams RJ, Spencer JPE, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology and Medicine*. 2004 Apr;36(7):838–49.
113. Hendrich AB. Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds 1. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2006;27(1):27–40.
114. Keys A, Menotti A, Karvonen MJ, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, et al. The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *Am J Epidemiol*. 1986 Dec;124(6):903–15.
115. Visioli F, Galli C. Biological properties of olive oil phytochemicals. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2002;42(3):209–21.
116. Casamenti F, Stefani M. Olive polyphenols: new promising agents to combat aging-associated neurodegeneration. *Expert Rev Neurother*. 2017 Apr;17(4):345–58.
117. Giovannelli L. Beneficial effects of olive oil phenols on the aging process: Experimental evidence and possible mechanisms of action. *Nutrition and Aging*. 2012;1:207–23.
118. Quiles JL, Ochoa JJ, Ramirez-Tortosa C, Battino M, Huertas JR, Martín Y, et al. Dietary fat type (virgin olive vs. sunflower oils) affects age-related changes in DNA double-strand-breaks, antioxidant capacity and blood lipids in rats. *Experimental Gerontology*. 2004 Aug;39(8):1189–98.

119. Oliveras-Ferraros C, Fernández-Arroyo S, Vazquez-Martin A, Lozano-Sánchez J, Cufí S, Joven J, et al. Crude phenolic extracts from extra virgin olive oil circumvent de novo breast cancer resistance to HER1/HER2-targeting drugs by inducing GADD45-sensed cellular stress, G2/M arrest and hyperacetylation of Histone H3. *Int J Oncol.* 2011 Jun;38(6):1533–47.
120. Farr SA, Price TO, Dominguez LJ, Motisi A, Saiano F, Niehoff ML, et al. Extra virgin olive oil improves learning and memory in SAMP8 mice. *Journal of Alzheimer's Disease.* 2012;
121. Pitozzi V, Jacomelli M, Catelan D, Servili M, Taticchi A, Biggeri A, et al. Long-term dietary extra-virgin olive oil rich in polyphenols reverses age-related dysfunctions in motor coordination and contextual memory in mice: role of oxidative stress. *Rejuvenation Res.* 2012 Dec;15(6):601–12.
122. Zheng A, Li H, Cao K, Xu J, Zou X, Li Y, et al. Maternal hydroxytyrosol administration improves neurogenesis and cognitive function in prenatally stressed offspring. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 2015;
123. Andrea GD, Ceccarelli M, Bernini R, Clemente M, Santi L, Caruso C, et al. Hydroxytyrosol stimulates neurogenesis in aged dentate gyrus by enhancing stem and progenitor cell proliferation and neuron survival. 2020;(October 2019):4512–26.
124. Gutiérrez F, Jiménez B, Ruíz A, Albi MA. Effect of olive ripeness on the oxidative stability of virgin olive oil extracted from the varieties picual and hojiblanca and on the different components involved. *J Agric Food Chem.* 1999 Jan;47(1):121–7.
125. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods.* 1984 May;11(1):47–60.
126. Carvalho-Netto EF, Nunes-de-Souza RL. Use of the elevated T-maze to study anxiety in mice. *Behav Brain Res.* 2004 Jan 5;148(1–2):119–32.
127. Fernández del Río L, Gutiérrez-Casado E, Varela-López A, Villalba JM. Olive Oil and the Hallmarks of Aging. *Molecules.* 2016 Oct;21(2):163–163.
128. Bensalem J, Dudonné S, Gaudout D, Servant L, Calon F, Desjardins Y, et al. Polyphenol-rich extract from grape and blueberry attenuates cognitive decline and improves neuronal function in aged mice. *Journal of Nutritional Science.* 2018/05/21 ed. 2018;7:e19.
129. Garthe A, Kempermann G. An old test for new neurons: refining the Morris water maze to study the functional relevance of adult hippocampal neurogenesis. *Frontiers in Neuroscience.* 2013;7:63.
130. Berdugo-Vega G, Arias-Gil G, López-Fernández A, Artegiani B, Wasielewska JM, Lee CC, et al. Increasing neurogenesis refines hippocampal activity rejuvenating

navigational learning strategies and contextual memory throughout life. *Nat Commun.* 2020 Jan 9;11(1):135.

131. Zhang L, Shi M, Song C, Cheng L, Li X, Yang Q, et al. Tea polyphenols improve the memory in aging ovariectomized rats by regulating brain glucose metabolism in vivo and in vitro. *Journal of Functional Foods.* 2021 Dec 1;87:104856.
132. Carey AN, Fisher DR, Joseph JA, Shukitt-Hale B. The ability of walnut extract and fatty acids to protect against the deleterious effects of oxidative stress and inflammation in hippocampal cells. *Journal of Functional Foods.* 2013 Jan 1;16(1):13–20.
133. Smith TD, Adams MM, Gallagher M, Morrison JH, Rapp PR. Circuit-specific alterations in hippocampal synaptophysin immunoreactivity predict spatial learning impairment in aged rats. *Journal of Neuroscience.* 2000;20(17):6587–93.
134. Wang R, Tang Y, Feng B, Ye C, Fang L, Zhang L, et al. Changes in hippocampal synapses and learning-memory abilities in age-increasing rats and effects of tetrahydroxystilbene glucoside in aged rats. *Neuroscience.* 2007 Nov 23;149(4):739–46.
135. Lauretti E, Nenov M, Dincer O, Iuliano L, Praticò D. Extra virgin olive oil improves synaptic activity, short-term plasticity, memory, and neuropathology in a tauopathy model. *Aging Cell.* 2020 Jan;19(1):e13076.
136. Guo Y, Zhao Y, Nan Y, Wang X, Chen Y, Wang S. (–)-Epigallocatechin-3-gallate ameliorates memory impairment and rescues the abnormal synaptic protein levels in the frontal cortex and hippocampus in a mouse model of Alzheimer’s disease. *NeuroReport [Internet].* 2017;28(10). Available from: https://journals.lww.com/neuroreport/Fulltext/2017/08010/___Epigallocatechin_3_gallate_ameliorates_memory.9.aspx
137. Laubach M, Amarante LM, Swanson K, White SR. What, If Anything, Is Rodent Prefrontal Cortex? *eNeuro.* 2018 Oct 25;5(5):ENEURO.0315-18.2018.
138. Hendrickson ML, Rao AJ, Demerdash ONA, Kalil RE. Expression of Nestin by Neural Cells in the Adult Rat and Human Brain. *PLoS ONE.* 2011;6(4):18535.

8. EKLER

8.1. Katkı

Bu proje Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2020.KB.SAG. 020 numarasıyla desteklenmiştir.



8.2. Etik Kurul Onayı

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (TF-HADYEK)
ETİK KURUL KARARI

Toplantı Tarihi	Karar No	Proje Yürütücüsü
04/09/2019	69/2019	Prof. Dr. Ayşe Semra Koçtürk

Karar: "Yaşlı sıçanlarda yüksek polifenollü zeytinyağın beyin dokusunda nörojenez etkisinin moleküler ve davranışsal olarak incelenmesi" isimli proje etik olarak uygun bulunmuştur.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 5 yıl

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Nazan Uysal HARZADIN	
Başkan Yardımcısı	Vet. Hek. Sevim KANDIŞ	
Üye	Prof. Dr. Lütüye KANIT	
Üye	Prof. Dr. Ersin KOYLU	
Üye	Prof. Dr. Sevil Gönenç ARDA	
Üye	Prof. Dr. Durgül YILMAZ	
Üye	Ayşe DAYI	

8.3. Zeytinyağı Analizi



T.C.
TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI
AYDIN TİCARET BORSASI ÖZEL GIDA
KONTROL LABORATUVARI
Ata Mahallesi, Denizli Bulvarı No:18 A Blok Bodrum Zemin
Kat:1-2-3-4-5-6 Efeler
AYDIN / TÜRKİYE
T: 0256 211 61 43 | F: 0256 211 01 88 | @: info@aytblab.com
www.aytblab.com



AB-0033-T
2003097
11-20

09.11.2020

MUAYENE VE ANALİZ RAPORU

Rapor No : 2003097

Analizin Amacı : Özel İstek

Namunenin Gönderen : TURGUT ANADOLU YATLTD.ŞTİ

Adres : YENİKÖY KÖYÜ YATAĞAN MUĞLA

Analiz Başlama / Bitiş Tarihi : 06.11.2020 / 09.11.2020

Numune Alma Tutanağı Tarihi ve Sayısı : /

Numune Alma Yazı Tarihi ve Sayısı : /

Mühür Numarası :

Numunenin:

Matrisi	: Zeytinyağı	Miktarı (Net)	: 250 cc
Adı/Cinsi	: ZEYTİNYAĞI		
Ambalajı	: Cam Şişe		
Üretim / Son Kullanma Tarihi	: /		
Seri-Parti No	: ZYE-1		
Üretici Firma Adı	: TURGUT ANADOLU YATLTD.ŞTİ		

Numunenin Alındığı Yer, Adres ve Tarzı : TURGUT ANADOLU YATLTD.ŞTİ
YENİKÖY KÖYÜ YATAĞAN MUĞLA

- Deney laboratuvarı olarak faaliyet gösteren AYTB Laboratuvar Hizmetleri A.Ş., TÜRKAK' tan AB-0033-T ile TS EN ISO/IEC 17025:2017 standardına göre akredite edilmiştir.
- Türk Akreditasyon Kurumu (TÜRKAK) deney raporlarının tanınırlığı konusunda Avrupa Akreditasyon Birliği (EA) ile Çok Taraflı Anlaşma ve Uluslararası Laboratuvar Akreditasyon Birliği (ILAC) ile karşılıklı tanıma anlaşması imzalamıştır.
- Bu analiz raporu, laboratuvarın yazılı izni olmadan kısmen veya tamamen kopyalanıp çoğaltılamaz.
- Bu analiz raporunun hiçbir bölümü tek başına veya ayrı ayrı kullanılamaz.
- İmzasız ve mühürlü raporlar geçersizdir.
- ** işaretli analizler akreditasyon kapsamındadır.
- Deney ve /veya ölçüm sonuçları, genişletilmiş ölçüm belirsizlikleri (olması halinde) ve deney metodları bu sertifikanın tamamlayıcı kısmı olan takip eden sayfalarda verilmiştir.
- Beyan edilen genişletilmiş ölçüm belirsizliği, standart belirsizliği k=2 olan genişletme katsayısı ile çarpımı sonucu %95 oranında güvenilirlik seviyesi sağlanmaktadır.
- Rapor numarasının yanında yer alan 'R' harfi analiz raporunun revize olduğunu belirtir.
- Numune müşteri tarafından teslim edilmiştir.Numunenin alınması,ambalajlanması,taşınması ve numune bilgilerinden kaynaklanabilecek analiz sonuçlarına etki edebilecek durumlar müşterinin sorumluluğundadır.



T.C.
TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI
AYDIN TİCARET BORSASI ÖZEL GIDA
KONTROL LABORATUVARI

Ata Mahallesi, Denizli Bulvarı No:18 A Blok Bodrum Zemin
Kat:1-2-3-4-5-6 Efeler
AYDIN / TÜRKİYE
T: 0256 211 61 43 | F: 0256 211 01 88 | @: info@aytblab.com
www.aytblab.com

MUAYENE VE ANALİZ RAPORU

AB-0033-T

2003097

11-20

Rapor No

: 2003097

09.11.2020

Analiz	Sonuç	Ölçüm Belirsizliği	Ölçüm Limiti	Limit Değer	Geri Kazanım	Analiz Metodu	Cihaz
1- Serbest Yağ Asitliği (Oleik Asit Cins.) * (%)	0,30	%7	-	<= 0,8	-	TS EN ISO 660	-
2- Peroksit Sayısı (değeri) Tayini * (meq aktifoksijen/kg yağ)	5,64	%11	-	<= 20	-	TS EN ISO 3960	-
3- Toplam Biofenol Miktarı (tyrosol cins.) * (mg/kg)	668	%10	-	-	-	COI/T.20/Doc.No 29	HPLC-UV

-Analiz sonuçları birinci sayfada özellikleri belirtilen ve laboratuvarımıza teslim edilen numune için geçerlidir.

- Müşterinin ölçüm belirsizliği talep ettiği durumlarda, laboratuvarın belirlediği güven aralığında (k=2 %95) ilgili parametreler için bulunan sonuç; sonuca ölçüm belirsizliği eklendiğinde mevzuatta verilen üst sınırın üstünde ise veya sonuçtan ölçüm belirsizliği çıkarıldığında mevzuatta verilen alt sınırın altında ise 'uygun değil' olarak değerlendirilir. Belirlenen mevzuat limitleri içerisinde veya mevzuat limitlerine eşit olan sonuçlar 'uygun olarak değerlendirilir.



T.C.
TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI
AYDIN TİCARET BORSASI ÖZEL GIDA
KONTROL LABORATUVARI
Ata Mahallesi, Denizli Balvarı No:18 A Blok Bodrum Zemin
Kat:1-2-3-4-5-6 Efeler
AYDIN / TÜRKİYE
T: 0256 211 61 43 | F: 0256 211 01 88 | @: info@aytblab.com
www.aytblab.com



AB-0033-T

2003099

11-20

09.11.2020

MUAYENE VE ANALİZ RAPORU

Rapor No : 2003099
Analiz Amacı : Özel İstek
Numuneyi Gönderen : TURGUT ANADOLU YAT.LTD.ŞTİ.
Adres : YENİKÖY KÖYÜ YATAĞAN MUĞLA
Analiz Başlama / Bitiş Tarihi : 06.11.2020 / 09.11.2020
Numune Alma Tutanağı Tarih ve Sayısı : /
Numune Alma Yazı Tarih ve Sayısı : /
Mühür Numarası :
Numunenin:
Matriksi : Zeytinyağı
Adı/Cinsi : ZEYTİNYAĞI
Ambalajı : Cam Şişe **Miktarı (Net)** : 250 cc
Üretim / Son Kullanma Tarihi : /
Seri-Parti No : RV
Üretici Firma Adı : TURGUT ANADOLU YAT.LTD.ŞTİ.
Numunenin Alındığı Yer, Adres ve Tarihi : TURGUT ANADOLU YAT.LTD.ŞTİ.
: YENİKÖY KÖYÜ YATAĞAN MUĞLA

- Deney laboratuvarı olarak faaliyet gösteren AYTBLAB Laboratuvar Hizmetleri A.Ş., TÜRKAK' tan AB-0033-T ile TS EN ISO/IEC 17025:2017 standardına göre akredite edilmiştir.
- Türk Akreditasyon Kurumu (TÜRKAK) deney raporlarının tanınırlığı konusunda Avrupa Akreditasyon Birliği (EA) ile Çok Taraflı Anlaşma ve Uluslararası Laboratuvar Akreditasyon Birliği (ILAC) ile karşılıklı tanıma anlaşması imzalamıştır.
- Bu analiz raporu, laboratuvarın yazılı izni olmadan kısmen veya tamamen kopyalanıp çoğaltılamaz.
- Bu analiz raporunun hiçbir bölümü tek başına veya ayrı ayrı kullanılamaz.
- İmzasız ve mühürsüz raporlar geçersizdir.
- ** İşaretili analizler akreditasyon kapsamındadır.
- Deney ve /veya ölçüm sonuçları, genişletilmiş ölçüm belirsizlikleri (olması halinde) ve deney metodları bu sertifikanın tamamlayıcı kısmı olan takip eden sayfalarda verilmiştir.
- Beyan edilen genişletilmiş ölçüm belirsizliği, standart belirsizliği k=2 olan genişletme katsayısı ile çarpımı sonucu %95 oranında güvenilirlik seviyesi sağlamaktadır.
- Rapor numarasının yanında yer alan 'R' harfli analiz raporunun revize olduğunu belirtir.
- Numune müşteri tarafından teslim edilmiştir.Numunenin alınması,ambalajlanması,taşınması ve numune bilgilerinden kaynaklanabilecek analiz sonuçlarına etki edebilecek durumlar müşterinin sorumluluğundadır.



T.C.
TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI
AYDIN TİCARET BORSASI ÖZEL GIDA
KONTROL LABORATUVARI

Ata Mahallesi, Denizli Bulvarı No:18 A Blok Bodrum Zemin
Kat:1-2-3-4-5-6 Efeler
AYDIN / TÜRKİYE
T: 0256 211 61 43 | F: 0256 211 01 88 | @: info@aytblab.com
www.aytblab.com

MUAYENE VE ANALİZ RAPORU

AB-0033-T

2003099

11-20

Rapor No

: 2003099

09.11.2020

Analiz	Sonuç	Ölçüm Belirsizliği	Ölçüm Limiti	Limit Değer	Geri Kazanım	Analiz Metodu	Cihaz
1- Serbest Yağ Asitliği (Oleik Asit Cins.) * (%)	0,34	%7	-	≤ 0,8	-	TS EN ISO 660	-
2- Peroksit Sayısı (değer) Tayini * (meq aktifoksijen/kg yağ)	7,90	%11	-	≤ 20	-	TS EN ISO 3960	-
3- Toplam Biofenol Miktarı (tyrosol cins.) * (mg/kg)	77	%10	-	-	-	COI/T.20/Doc.No 29	HPLC-UV

-Analiz sonuçları birinci sayfada özellikleri belirtilen ve laboratuvarımıza teslim edilen numune için geçerlidir.

- Müşterinin ölçüm belirsizliği talep ettiği durumlarda, laboratuvarın belirlediği güven aralığında (k=2 %95) ilgili parametreler için bulunan sonuç; sonuca ölçüm belirsizliği eklendiğinde mevzuatta verilen üst sınırın üstünde ise veya sonuçtan ölçüm belirsizliği çıkarıldığında mevzuatta verilen alt sınırın altında ise 'uygun değil' olarak değerlendirilir. Belirlenen mevzuat limitleri içerisinde veya mevzuat limitlerine eşit olan sonuçlar 'uygun olarak değerlendirilir.

8.4. Özgeçmiş

ÖZGÜN KIMIZOĞLU

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi

Telefon

E-posta

İnternet Sayfası

Öğrenim Bilgileri

01 Ocak 2019 - Şu Anda (3 yıl 5 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, SINIRBİLİMLER ANABİLİM DALI

01 Şubat 2013 - 01 Haziran 2013 (5 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, GHENT UNIVERSITY, BELÇİKA
GHENT UNIVERSITY, GHENT UNIVERSITY

01 Eylül 2008 - 01 Haziran 2013 (4 yıl 10 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FİZİK TEDAVİ VE REHABİLİTASYON YÜKSEKOKULU, FİZYOTERAPİ VE
REHABİLİTASYON BÖLÜMÜ

Deneyim / İşyeri Bilgileri

01 Haziran 2014 - Şu Anda (8 yıl) (Yarı Zamanlı)
UZMAN, ÖZEL ARTI BAKIŞ ÖZEL EĞİTİM VE REHABİLİTASYON MERKEZİ

Yabancı Dil Bilgileri

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

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Panelistik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

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

