



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**



DOKTORA TEZİ

**KOKU BOZUKLUĞU OLUŞTURULAN SIÇANLARDA ALFA MELANOSİT
STİMÜLAN HORMONUN KOKU ALMA MEKANİZMALARINA ve TEDAVİYE
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Oğuzhan EKİCİ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Gönül ŞİMŞEK**

Fizyoloji Anabilim Dalı

Fizyoloji Programı

Temmuz, 2024

TEZ KABUL VE ONAYI

Oğuzhan EKİCİ tarafından, **Prof. Dr. Gönül ŞİMŞEK** danışmanlığında hazırlanan " **KOKU BOZUKLUĞU OLUŞTURULAN SIÇANLARDA ALFA MELANOSİT STİMÜLAN HORMONUN KOKU ALMA MEKANİZMALARINA ve TEDAVİYE ETKİSİNİN İNCELENMESİ** " başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından **22/07/2024** tarihinde yapılan sınav sonucunda **oy birliği** ile başarılı bulunarak **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

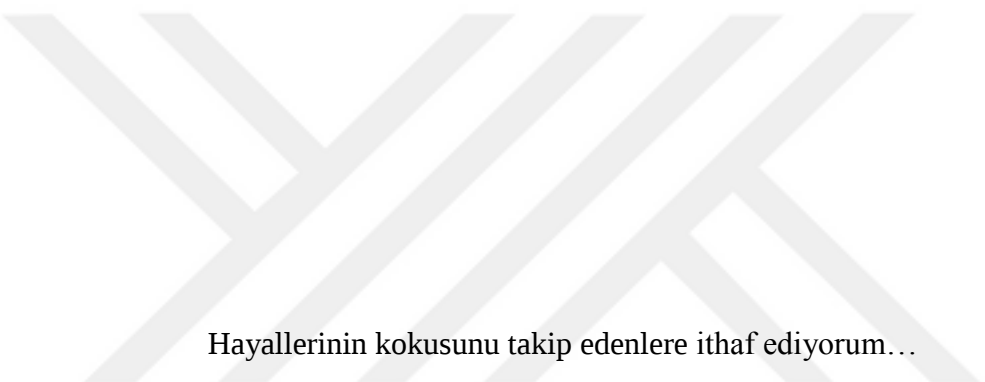
Tez Jürisi

	İmza	Sonuç
DANIŞMAN	Prof. Dr. Gönül ŞİMŞEK	☐
	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Fizyoloji Anabilim Dalı	Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Nermin YELMEN	☐
	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Fizyoloji Anabilim Dalı	Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Hafize UZUN	☐
	Atlas Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Gamze TANRIVERDİ	☐
	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Gökhan METİN	☐
	İstanbul Üniversitesi Spor Hekimliği Anabilim Dalı	Kabul ☐ Ret

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve bilimsel etik kuralları içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve her türlü hukuki sorumluluğu aldığımı kabul ederim.

Oğuzhan EKİCİ



Hayallerinin kokusunu takip edenlere ithaf ediyorum...

BÜTÇE DESTEKLERİ

KOKU BOZUKLUĞU OLUŞTURULAN SIÇANLARDA ALFA MELANOSİT STİMÜLAN HORMONUN KOKU ALMA MEKANİZMALARINA ve TEDAVİYE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Bu tez çalışması, 20125 numaralı Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB) 2022-
ACİL-08 projesi ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Uzun ve zorluklarla dolu doktora eğitimimin her adımında yanımda olan, desteğini, ilgisini ve merhametini eksik etmeyen sayın danışman hocam Prof. Dr. Gönül ŞİMŞEK'e,

Bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren değerli hocalarım; Prof. Dr. Hakkı Oktay SEYMEN'e, Prof. Dr. Nuran DARIYERLİ'ye, Prof. Dr. Nermin YELMEN'e, Prof. Dr. Sibel AKYOL'a, Prof. Dr. Gülderen ŞAHİN'e, Prof. Dr. Gökhan METİN'e, Prof. Dr. İbrahim GÜNER'e, Prof. Dr. Hafize UZUN'a

Tez sürecimde sürekli kapısını aşındırdığım ve her seferinde yardımlarını, ilgisini ve güler yüzünü benden esirgemeyen kıymetli hocam Prof. Dr. Gamze TANRIVERDİ'ye,

Deneysel çalışmalarım sırasında beni kendi bölümümde gibi hissettiren sayın hocam Prof. Dr. Gözde ERKANLI ŞENTÜRK'e ve Arş. Gör. Hakan ŞAHİN, Dr. Merjem PURELLKU, Dr. Bahadır ASLAN, Uzm. Dr. Duygu NECCAR ve Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki diğer arkadaşlarıma,

Tezimin deneysel kısmında çok emeği olan canım ablam Mediha ESEN'e,

İş ve tez döneminde manevi yardımlarını sürekli hissettiğim sevgili arkadaşlarım Dr. Gafur RAKICI'ya, Dr. Sıla GÜVENİR'e, Uzm. Dr. Eda GÖRGÜN'e ve Dr. Hasan EGE'ye,

Doktora eğitimime başlamama vesile olan, beni cesaretlendiren ve hayallerimi takip etmemi teşvik eden çok kıymetli hocam Prof. Dr. Elif ERGÜL EKİZ'e,

Varlıklarıyla hayatıma neşe katan Tiyatrohanem Sanat Atölyesi ailesine,

Canım ailem ve dostalarıma

Teşekkür ederim.

Temmuz 2024

Oğuzhan EKİCİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI.....	ii
BEYAN	iii
BÜTÇE DESTEKLERİ	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ.....	xi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE	4
2.1. Olfaktör Sistem Anatomisi ve Fizyolojisi	4
2.1.1. Olfaktör Epitel.....	5
2.1.2. Olfaktör Bulbus	10
2.1.3. Koku Alma Merkezleri.....	12
2.2. Beyinde Nörogenez.....	13
2.2.1. Subventriküler Bölge’de Nörogenez	14
2.3. Alfa Melanosit Stimülan Hormon.....	18
2.3.1. Melanokortin Reseptörleri.....	19
2.3.2. Alfa Melanosit Stimülan Hormon’un Etkileri.....	20
3. YÖNTEM	22
3.1. Deney Hayvanları ve Etik Kurul Onayı.....	22
3.2. Deney Protokolü ve Deneyde Kullanılan Kimyasallar	22
3.2.1. Koku Testleri.....	22
3.2.2. Çinko Sülfat ile Periferik Koku Bozukluğu Modeli Oluşturulması	23
3.2.3. Deney Grupları ve Tedavi Protokolü	24
3.3. Dokuların Toplanması ve Analizlere Hazırlanması.....	25

3.4. Histolojik ve Biyokimyasal Analizler.....	26
3.4.1. İmmunohistokimya ve İmmüno Floresan Analizler	26
3.4.2. Biyokimyasal Analizler.....	28
3.5. İstatistiksel Analizler ve Değerlendirme.....	28
4. BULGULAR	29
4.1. HİSTOLOJİK BULGULAR.....	29
4.1.1. Olfaktör Epitel Bulguları.....	29
4.1.2. Subventriküler Alan ve Olfaktör Bulbus Bulguları.....	43
4.2. BİYOKİMYASAL BULGULAR.....	52
4.3. KOKU TESTLERİ BULGULARI	52
4.3.1. Gömülü Gıda Testi.....	52
4.3.2. Koku Ayırım Testi.....	55
5. TARTIŞMA.....	58
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	69
KAYNAKLAR.....	71
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	80
ETİK KURUL İZİN YAZISI	81
KURUM İZNİ YAZILARI.....	82
ÖZGEÇMİŞ	83

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2-1: OE Hücreleri	6
Şekil 2-2: OE Nörogenezi.	9
Şekil 2-3: OB Hücre Tabakaları. G, Granül hücre; Gl, Glomerul; PG, Periglomeruler ara nöron; M, Mitral hücre; T, Tiftik hücre.	11
Şekil 2-4: Beyinde Nörogenez.....	14
Şekil 2-5: SVZ'deki hücreler	15
Şekil 2-6: POMC'den oluşan melanokortinler.....	18
Şekil 3-1: Aorta kanül yerleştirme.....	26
Şekil 4-1: OE Kalınlığı grafiği.	30
Şekil 4-2: ASCL1+ immunohistokimya görüntüsü.	31
Şekil 4-3: ASCL1+ Hücre grafiği.....	32
Şekil 4-4: GAP-43+ Hücre grafiği.	33
Şekil 4-5: GAP-43+ immunohistokimya görüntüsü.....	34
Şekil 4-6: OMP+ Hücre grafiği.	35
Şekil 4-7: OMP+ immunohistokimya görüntüsü.	36
Şekil 4-8: IL-10+ H-skor grafiği.	37
Şekil 4-9: IL-10+ immunohistokimya görüntüsü.	38
Şekil 4-10: NGF+ H-skor grafiği.	39
Şekil 4-11: NGF+ immunohistokimya görüntüsü.	40
Şekil 4-12: BDNF+ H-skoru grafiği.....	41
Şekil 4-13: BDNF+ immunohistokimya görüntüsü.	42
Şekil 4-14: Nestin/ASCL1+ Hücre grafiği.	43
Şekil 4-15: Nestin/ASCL1+ çift boyama immunofloresan görüntüsü.	44
Şekil 4-16: SVZ - NGF+ H-skoru grafiği.....	45

Şekil 4-17: SVZ - NGF+ immunohistokimya görüntüsü.	46
Şekil 4-18: SVZ - BDNF+ H-skoru grafiği.	47
Şekil 4-19: SVZ - BDNF+ immunohistokimya görüntüsü.	48
Şekil 4-20: OB - DCX+ H-skoru grafiği.	49
Şekil 4-21: OB - DCX+ immunofloresan görüntüsü.	49
Şekil 4-22: NeuN+ Hücre grafiği.	50
Şekil 4-23: NeuN+ immunohistokimya görüntüsü.	51
Şekil 4-24: α -MSH serum konsantrasyon grafiği.	52
Şekil 4-25: Gömülü Gıda Testi gruplar arası değerlendirme.	54
Şekil 4-26: Gömülü Gıda Testi zamansal değişim.	54
Şekil 4-27: Koku Ayrım Testi gruplar arası değerlendirme.	56
Şekil 4-28: Koku Ayrım Testi zamansal değişim.	57

Sayfa No

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 4-1: OE Kalınlığı.....	29
------------------------------	----



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama

Kisaltmalar	Açıklama
-------------	----------

α -MSH	: Alfa Melanosit Stimulan Hormon
AON	: Ön koku alma çekirdeği
ASCL-1	: Achaete-scute homolog 1
BDNF	: Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
cAMP	: Siklik adenosin monofosfat
DPT	: Dış pleksiform tabaka
EC	: Entorinal korteks
GAP-43	: Büyüme ilişkili protein 43
GBC	: Globoz bazal hücreler
GABA	: Gama aminobütirik asit
GHT	: Granül hücre tabakası
GT	: Glomerular tabaka
HBC	: Horizontal bazal hücreler
IF	: İmmünofloresan
IHC	: İmmunohistokimya
IL-1 β	: İnterlökin 1Beta
IL-10	: İnterlökin-10
IL-6	: İnterlökin 6
IL-8	: İnterlökin 8
INP	: Acil nöronal öncüller
İPT	: İç pleksiform tabaka
MCR1	: Melanokortin reseptörü 1

MCR2	: Melanokortin reseptörü 2
MCR3	: Melanokortin reseptörü 3
MCR4	: Melanokortin reseptörü 4
MCR5	: Melanokortin reseptörü 5
MHT	: Mitral hücre tabakası
MPP	: Multipotent progenitörler
NF-κB	: Nükleer faktör kappa beta
NGF	: Sinir büyüme faktörü
NKH	: Nöral kök hücreler
OB	: Olfaktör Bulbus
OBP	: Koku bağlayıcı protein
OE	: Olfaktör Epitel
OEK	: Olfaktör Kılıf Hücreler
OMP	: Olfaktör işaretleyici protein
OR	: Olfaktör reseptör
OSN	: Olfaktör duyu nöronu
OST	: Olfaktör sinir tabakası
OT	: Koku alma tüberkülü
PC	: Piriform korteks
PG	: Periglomeruler
POMC	: Proopiomelanokortin
RMS	: Rostral göç yolu
SGZ	: Subgranüler alan
SVZ	: Subventriküler Alan
TAC	: Geçici amplifikasyon hücreler
TNF-α	: Tümör nekroz faktörü alfa
VNO	: Vomer nazal organ
ZnSO4	: Çinko sülfat

ÖZET

[DOKTORA TEZİ]

[KOKU BOZUKLUĞU OLUŞTURULAN SIÇANLARDA ALFA MELANOSİT STİMÜLAN HORMONUN KOKU ALMA MEKANİZMALARINA VE TEDAVİYE ETKİSİNİN İNCELENMESİ]

[Oğuzhan EKİCİ]

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Fizyoloji Anabilim Dalı

Fizyoloji Programı

[Danışman : Prof. Dr. Gönül ŞİMŞEK]

[Amaç: Koku alma bozuklukları; üst solunum yolu enfeksiyonları, kafa travmaları ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalıkta meydana gelmektedir. Özellikle Covid-19 pandemisiyle birlikte koku duyusu kaybının insan sağlığı ve yaşam kalitesi üzerindeki etkileri dikkat çekici hale gelmiştir. Koku alma bozuklukları dünya çapında yaygın olarak görülmesine rağmen patofizyolojisi ve tedavisi hakkında yeterli bilgi mevcut değildir.

Bu çalışmada; periferik koku bozukluğunda Alfa Melanosit Stimülan Hormon (α -MSH)'un olfaktör epitel (OE), olfaktör bulbus (OB) ve Subventriküler alan (SVZ)'daki nörogeneze ve NGF, BDNF, IL-10 ekspresyonlarına etkileri incelenerek, α -MSH'nin koku alma mekanizmalarındaki ve tedavideki olası rolü araştırılmıştır.

Yöntem: 48 adet Sprague Dawley cinsi erkek sıçanlar 8 gruba ayrılmıştır. Koku bozukluğu modeli oluşturmak amacıyla deney hayvanlarının yarısına burun içi %10'luk çinko sülfat uygulanırken diğer yarısına burun içi salin verilmiştir. Burun içi çinko sülfat/salin verilen sıçanların yarısına α -MSH (5 mg/kg), diğer yarısına salin intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Sıçanlara 4 ve 21 günlük α -MSH/salin uygulamasından sonra deney sonlandırılmıştır. Tüm sıçanlara; deney başlangıcında (T0), çinko sülfat/salin uygulandıktan sonra (T1) ve ötenaziden 1 gün önce (T2) gömülü gıda ve koku ayırım testleri yapılarak koku duyuları değerlendirilmiştir. Sıçanlardan kan örnekleri alındıktan sonra, %4'lük paraformaldehit ile perfüze edilerek burun ve beyin dokuları izole edilmiştir. Kan örnekleri ELİSA yöntemiyle, burun ve beyin dokuları ise immunohistokimya/immünofloresan yöntemleriyle analiz edilmiştir.

Bulgular: Çalışmamızda koku bozukluğu (KB) oluşturulan sıçanlara 21 günlük α -MSH tedavisinin (KB+ α -MSH grubu), KB grubuna göre OE hasarında iyileştirici etki gösterdiği bulunmuştur. KB+ α -MSH grubunun ASCL1+, GAP-43+ ve OMP+ immunoreaktivitelerinde artış eğilimi oluşturarak OE nörogenezinde olumlu etkiler meydana getirdiği saptanmıştır. 21. günde KB+ α -MSH grubunun IL-10 immunoreaktivitesi KB grubuna göre artış eğilimi göstermiş, bu artış ile KB+ α -MSH grubunun IL-10+ immunoreaktivitesinin kontrol grubundan yüksek olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). KB+ α -MSH grubunda 4. ve 21. günlerde KB grubuna göre NGF+ ve BDNF+ immunoreaktivitelerinde artış eğilimleri saptanmamıştır. KB+ α -MSH grubundaki sıçanların SVZ'sinde 4. 21. günlerde Nestin/ASCL1 immunoreaktivitesinin KB grubundaki sıçanlara göre artış eğilimi gösterdiği, DCX+ immunoreaktivitesinin ise azalma eğilimi gösterdiği belirlenmiştir. OB'de KB+ α -MSH grubunun NeuN+ immunoreaktivitesinin KB grubuna göre 4. günde artma eğiliminde olduğu, 21. günde ise anlamlı azalma gösterdiği saptanmıştır. KB+ α -MSH grubunda özellikle 21. günde koku testlerinde daha iyi sonuçlar alınmıştır.

Sonuç: 21 günlük α -MSH tedavisi; OE'de kök hücre, olgunlaşmamış nöron ve olgun nöron artışına neden olarak OE nörogenezini olumlu etkileyebilir. α -MSH'nin OE nörogenezine etkisi direkt ve/veya antiinflamatuvar etkileriyle dolaylı olarak gerçekleşebilir. α -MSH, SVZ nörogenezini ve OB'deki olgun nöronları da etkileyerek periferik koku bozukluğunda olumlu etkiler gösterebilir. |

Temmuz 2024 , |100| sayfa.

Anahtar kelimeler: | Koku bozukluğu, α -MSH, Nörogenez

ABSTRACT

Ph.D. THESIS

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF ALPHA MELANOCYTE STIMULATING HORMONE ON OLFACTORY MECHANISMS AND TREATMENT IN RATS WITH INDUCED OLFACTORY DYSFUNCTION

Oğuzhan EKİCİ

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Physiology

Physiology, PhD Program

Supervisor : Prof. Dr. Gönül ŞİMŞEK

Objective: Olfactory disorders occur in many diseases such as upper respiratory tract infections, head traumas and neurodegenerative diseases. Especially with the Covid-19 pandemic, the effects of loss of sense of smell on human health and quality of life have become remarkable. Although olfactory disorders are common worldwide, there is insufficient information about their pathophysiology and treatment.

In this study, the effects of Alpha Melanocyte Stimulating Hormone (α -MSH) on neurogenesis and NGF, BDNF, IL-10 expressions in olfactory epithelium (OE), olfactory bulb (OB) and subventricular zone (SVZ) in peripheral olfactory disorder were examined and the possible role of α -MSH in olfactory mechanisms and treatment was investigated.

Method: 48 male Sprague Dawley rats were divided into 8 groups. In order to create an odor impairment model, half of the rats received intranasal 10% zinc sulfate and the other half received intranasal saline. Half of the rats given intranasal zinc sulfate/saline received α -MSH

(5 mg/kg) and the other half received saline intraperitoneally. The experiment was ended after 4 and 21 days of α -MSH/saline administration. Olfactory senses of all rats were evaluated by performing buried food and odor discrimination tests at the beginning of the experiment (T0), after zinc sulfate/saline administration (T1) and 1 day before euthanasia (T2). After blood samples were taken from the rats, nasal and brain tissues were isolated by perfusing with 4% paraformaldehyde. Blood samples were analyzed by ELISA method and nasal and brain tissues were analyzed by immunohistochemistry/immunofluorescence methods.

Results: In our study, it was found that 21-day α -MSH treatment (KB+ α -MSH group) in rats with olfactory dysfunction (OD) showed an ameliorative effect on OE damage compared to the OD group. KB+ α -MSH group was found to have positive effects on OE neurogenesis by inducing an upward trend in ASCL1+, GAP-43+ and OMP+ immunoreactivities. IL-10+ immunoreactivity of KB+ α -MSH group was found to be higher than the control group. In the KB+ α -MSH group, there was no upward trend in NGF+ and BDNF+ immunoreactivity on days 4 and 21 compared to the KB group. Nestin/ASCL1 immunoreactivity in the SVZ of rats in the KB+ α -MSH group showed an increasing trend on days 4 and 21 compared to the rats in the KB group, while DCX+ immunoreactivity showed a decreasing trend. In OB, NeuN+ immunoreactivity in the KB+ α -MSH group tended to increase on day 4 and showed a significant decrease on day 21 compared to the KB group. In the KB+ α -MSH group, better results were obtained in odor tests, especially on day 21.

Conclusion: 21-day α -MSH treatment may positively affect OE neurogenesis by increasing stem cells, immature neurons and mature neurons in OE. The effect of α -MSH on OE neurogenesis may be direct and/or indirect through its anti-inflammatory effects. α -MSH may also affect SVZ neurogenesis and mature neurons in the OB, exhibiting positive effects in peripheral olfactory disorder. |

July 2024, |100| pages.

Keywords: |Olfactory dysfunction, α -MSH, Neurogenesis|

1. GİRİŞ

Koku duyusu, dış ortamdan bilgi almamızı sağlayan ve filogenetik olarak en eski duyulardan biridir [1] İnsanlar ve hayvanlar için önem arz eden birçok durumda koku duyusu önemli rol oynamaktadır. Koku duyusu; gıdanın bulunması, yiyeceğin zararlı olup olmadığının değerlendirilmesi ve tat duyusunun desteklenmesine katkı sağlamaktadır [2]. Beslenme ve enerji metabolizmasının düzenlenmesine ek olarak öğrenme, hafıza ve sosyal etkileşim gibi bilişsel işlevlerde de görev almaktadır [3]. Koku duyusunun kaybolması canlının yaşam kalitesi, fiziksel güvenliği ve sosyal ilişkilerinde ciddi etkiler yaratmaktadır. Yetişkin bireylerde koku bozuklukları; doğal gaz sızıntıları, kimyasal buharlar, yangınlar ve bozulmuş yiyeceklerin tüketilmesi gibi sebeplerle ölüm oranını 4 kata kadar artırabilmektedir [4].

Koku duyusu, olfaktör duyu nöron (OSN)'larının dış ortamla temas etmesi nedeniyle çeşitli patojenlere ve zararlı maddelere maruz kalabilmektedir. Ayrıca nörodejeneratif hastalıklar, kafa travmaları ve psikolojik rahatsızlıklar gibi beyni etkileyen çeşitli hastalıklar koku duyusunun bozulmasına neden olabilmektedir [5–7]. Periferik koku bozuklukları; olfaktör epitel (OE) yapısının bozulması, OSN hasarı ve hava yolu tıkanıklığı gibi çeşitli sebepler ile oluşabilmektedir. Merkezi koku bozuklukları; olfaktör bulbus (OB) ve koku merkezlerinin hasarlanması ile meydana gelebilmektedir [8]. Koku bozukluklarının iyileşmesinde; OE'de bulunan horizontal bazal hücreler (HBC) ve globoz bazal hücreler (GBC), kök hücre görevi görerek olfaktör sinir ve olfaktör epitelin yenilenmesini sağlamaktadır [9,10]. Beyindeki iki germinal hücre bölgesinden biri olan Subventriküler bölge (SVZ)'de, yeni nöroblastlar üretilerek OB'ye göç etmektedir. Nöroblastlar, OB'de olgun ara nöron halini alarak koku ayırımının yapılmasında görev almaktadır [11].

OE'de bulunan kök hücreler, periferdeki epitel ve/veya sinir hasarını onarabilmektedir. SVZ'de bulunan kök hücreler ise sürekli olarak nöroblast üretmekte ve OB'de yeni nöron oluşturarak koku duyusunu desteklemektedir. Koku duyusu, periferik ve merkezi sistemde iki kök hücre kaynağına sahiptir.

Koku bozukluklarında, hasarın şiddetine bağlı olarak inflamasyon meydana gelebilmektedir. İnflamasyonun hafifletilmesi veya ortadan kaldırılması koku bozukluklarının

düzeltilmesinde önemli rol oynamaktadır [12–14]. Ayrıca hasardan sonra nöron sağ kalımı, rejenerasyon ve yeni nöronların olgunlaşması için NGF ve BDNF gibi büyüme faktörlerine de ihtiyaç duyulmaktadır. Büyüme faktörlerinin salınması koku alma bozukluklarının giderilmesinde önemli rol almaktadır [15].

Koku bozuklukları kendiliğinden iyileşebilmekte veya kalıcı olarak koku duyusu kaybolabilmektedir. Koku bozukluğu tedavilerinde denenen çok sayıda ilaç ve yöntem bulunmasına rağmen etkin bir tedavi henüz mevcut değildir [16]. Koku bozukluklarında etkin bir tedavi oluşturabilmek için, hem periferik hem de merkezi olfaktör sistemde yarar sağlayabilecek seçenekler önem arz etmektedir. Koku bozukluklarında; periferik ve merkezi koku alma sistemindeki kök hücrelerin uyarılması, inflamasyonun giderilmesi ve büyüme faktörlerinin salınımında artış oluşturan ajanlar, tedavide başarı şansını artırabilir.

Alfa Melanosit Stimülan Hormon (α -MSH), Proopiomelanokortin (POMC) adı verilen öncü hormonun proteolitik bölünmesiyle üretilmektedir. α -MSH'nin özellikle pigmentasyon, beslenme davranışı ve enerji homeostazi görevleri iyi bilinmektedir. Bu görevlerine ek olarak antiinflamatuvar, immunmodülasyon ve nöroproteksiyon gibi rolleri ile α -MSH'nin vücutta çok sayıda fizyolojik mekanizmayı düzenleyebileceği düşünülmektedir. α -MSH'nin, beyinde Melanokortin reseptörü 3 (MCR3) ve Melanokortin reseptörü 4 (MCR4) aracılığıyla etki gösterdiği belirtilmektedir [17–19].

Periferik koku bozukluklarında; özellikle üst solunum yolu enfeksiyonları, toksik maruziyet ve sinonazal hastalıklarda sıklıkla inflamasyon görülmektedir. İnflamasyon, yeni sinir üretimini ve sinir yenilenmesini yavaşlatarak koku bozukluklarının iyileşmesinde engel oluşturmaktadır [20]. Burunda olfaktör sinirlerin etrafını saran Olfaktör Kılıf Hücreler (OEC)'de Melanokortin reseptörü 1 (MCR1) bulunduğu bildirilmiştir. Sıçanlarda OEC'lerden elde edilen hücre kültürü çalışmasında, α -MSH'nin TNF- α inhibisyonu ile inflamasyonu gidererek sinir rejenerasyonuna neden olduğu gösterilmiştir [21]. Astım, kistik fibroz, nazal alerji, rinit ve sinüzit gibi kronik inflamatuvar hastalıklarda aşırı münin üretimi hava yollarını tıkayabilmektedir [22]. İnsan nazal epitel hücrelerinde α -MSH'nin, TNF- α inhibisyonu ile münin üretimini sağlayan gen ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir [23]. α -MSH'nin alerjik rinitte, bazofillerdeki MCR1 reseptörlerine bağlanarak proinflamatuvar sitokinlerin salınımını inhibe ettiği ve antiinflamatuvar sitokin olan interlökin-10'un salınımını artırdığı belirtilmiştir [24,25]. Söz konusu çalışmalar α -MSH'nin periferik koku alma sisteminde antiinflamatuvar

etkileriyle önemli rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Ancak α -MSH'nin periferik koku bozukluklarında etkisinin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ayrıca koku bozukluklarında sinir ve epitel hasarına bağlı olarak olfaktör epitelde nörogenez tetiklenmektedir. Beyinde α -MSH'nin nörogeneze etkisini inceleyen çalışmalar bulunmasına rağmen α -MSH'nin OE nörogenezine etkisini araştıran herhangi bir çalışmanın da olmadığı belirlenmiştir.

Diğer taraftan travmatik beyin hasarı, nörodejeneratif hastalıklar ve infarktüs gibi çeşitli nedenlerle beyinde meydana gelen hasar sonucu koku bozuklukları meydana gelebilmektedir [26,27]. α -MSH'nin beyinde meydana gelen hasarlarda antiinflamatuvar, nöroprotektif ve nörogenez etkileri gösterilmiştir. Ayrıca inflamasyonun, beyindeki nörogenez sürecini olumsuz etkilediğini gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır [28–30]. İnflamasyonun giderilmesinin nörogenezin gerçekleşmesi için uygun mikro ortam yarattığı bildirilmiştir [31]. Bu bilgiler kapsamında α -MSH'nin merkezi koku bozukluklarında da inflamasyonu gidererek ve nöroprotektif etkiler göstererek iyileşme meydana getirebileceğini düşünebiliriz. İlâveten POMC nöronlarının SVZ ile anatomik bağlantılarının olduğu gösterilmiş, POMC etkinliğinin artması veya azalmasına paralel olarak SVZ'deki nörogenezin değiştiği bildirilmiştir [32,33]. Melanokortin agonistlerinin SVZ'de nörogenezi tetikleyerek beyin hasarını azalttığını gösterilmiştir. SVZ'de üretilen nöroblastların olfaktör bulbusta olgunlaşarak ara nöron haline geldiği bilinmektedir. Bu bilgiler doğrultusunda α -MSH'nin SVZ'de nörogenezi tetikleyerek olfaktör bulbusta olgun ara nöron artışı ile koku duyusuna destek sağlayabileceği düşünülmüştür. Bu kapsamda, burun içi çinko sülfat ile koku bozukluğu modeli oluşturulan sıçanlarda; OE, OB ve SVZ'de α -MSH'nin nörogeneze, NGF, BDNF ve IL-10 ekspresyonuna etkileri incelenerek α -MSH'nin, koku alma mekanizmalarındaki ve tedavideki olası rolü araştırılmıştır.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1. Olfaktör Sistem Anatomisi ve Fizyolojisi

Olfaktör sistem en eski ve primitif duyulardan biri olması sebebiyle geniş bağlantılara sahiptir. Olfaktör sistem; koku moleküllerinin bağlandığı olfaktör epitel, koku bilgisinin kodlandığı olfaktör bulbus ve koku bilgisinin işlendiği olfaktör merkezlerinden oluşmaktadır. Ayrıca olfaktör sistem ile bağlantılı birçok alan bulunması koku duyusunu daha da karmaşık hale getirmektedir.

Koku bilgisinin oluşması için koku moleküllerinin OSN tarafından tanınması gerekmektedir. Bu kemosensöral nöronlar en yaygın olarak burun boşluğundaki ana koku alma epitelinde (olfaktör epitelde) ve vomeronazal organda (VNO) bulunmaktadır [34]. Ana koku alma epiteli burun boşluğunun rostral bölümde yer almaktadır. Burun boşluğunun bazal bölümünde yer alan VNO, aksesuar koku alma sisteminin bir parçasıdır. VNO, canlılar arası iletişimde rol oynayan feromon adı verilen özel koku moleküllerinin tanınmasında görev almaktadır. VNO, insanda doğum öncesi gelişim sırasında mevcutken doğumdan sonra rudimenter hale geldiği düşünülmektedir [35]. Ana koku alma sistemine dahil olmayan iki yapı daha burun boşluğunda bulunmaktadır. Septal organ; nazofarinks girişinde, nazal septumun üzerinde kemosensör nöronlar içeren epitel yapısıdır. Septal organ nöronları OB’de belirli glomerullara aksonlarını uzatmaktadır. Gıdaların yutulması sırasında kokusunun alınmasına yardımcı olduğu düşünülmektedir. Grueneberg gangliyonu; nazal septumun ön ucunda iki taraflı bulunan nöron grubudur. Belirli sinir demetiyle glomerulde sonlanmaktadır ancak işlevi henüz net değildir [36].

Koku moleküllerinin OSN’lere ulaşması için önemli aşamalardan geçmektedir. Koku moleküllerinin içinde bulunduğu solunum havası konkalardan geçmektedir. Burunda alt, orta ve üst konka olarak üç konka bulunmaktadır. Konkalar, koku moleküllerinin olfaktör epitele ulaşması için gerekli hava akışı iskelesini oluşturmaktadır [37]. Ayrıca konkalar yardımıyla hava burun boşluğuna girdiğinde ısıtılmakta ve nemlendirilmektedir.

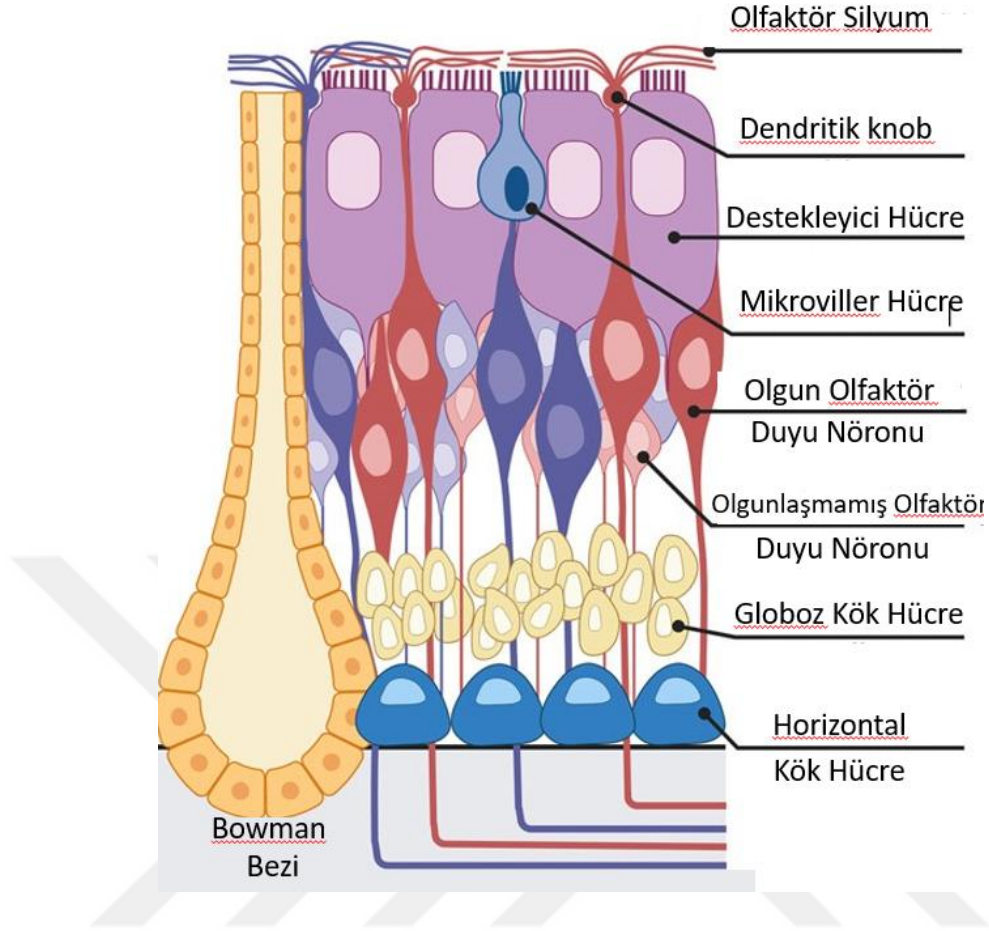
Koku duyusunun algılanmasında üç adet kranial sinir rol almaktadır. Koku bilgisinin taşındığı en önemli yol olfaktör sinirdir. Trigeminal sinir, iritan ve ağrılı uyarıların algılanmasını sağlamaktadır. Terminal sinir son dönemlerde keşfedilmiş olup 0. Kranial sinir

olarak adlandırılmaktadır. Terminal sinirin üreme davranışları üzerinde etkisi olduğu varsayılmaktadır [38].

2.1.1. Olfaktör Epitel

Nazal mukoza, regio olfactoria (olfaktör mukoza) ve regio respiratoria (solunum mukozası) olmak üzere iki bölümden oluşmaktadır. Nazal mukozanın büyük bir bölümünde solunum mukozası mevcuttur. Olfaktör mukoza, nazal boşluğun posterodorsalinde ve kribriform tabakanın ventralinde yer almaktadır. Solunum mukozası, yalancı çok katlı silli silindirik epitel ile kaplanmıştır ve Goblet hücreleri bulunmaktadır. Olfaktör mukoza da, yalancı çok katlı silli silindirik epitel ile döşenmiştir ancak epitel yüksekliği solunum mukozasına göre daha fazladır. Olfaktör mukozada Goblet hücreleri yer almamakta ve lamina propria içerisinde Bowman bezleri bulunmaktadır [39].

Koku alma epiteli (olfaktör epitel); çeşitli hücre katmanları, otonom sinirleri ve kan damarlarını içeren nöroepitelyumdur. Olfaktör epitelde; olfaktör duyu nöronları, destekleyici hücreler, mikroviller hücreler ve bazal hücreler yer almaktadır (Şekil 2-1).



Şekil 2-1: OE Hücreleri

2.1.1.1. Olfaktör Duyu Nöronları

OSN veya Olfaktör Reseptör Nöronu olarak adlandırılan nöronlar, bipolar afferent sinir hücreleridir. Memeli burun boşluğunda yaklaşık 6-10 milyon OSN bulunmaktadır. OSN bipolar nöronların dendritleri olfaktör epitelin apikal kısımda bulunurken, aksonları olfaktör epitelin bazal kısmında yer almaktadır. OSN dendritleri, üzerinde silyaların bulunduğu “knob” adı verilen şişlikler oluşturarak epitel yüzeyine ulaşmaktadır [40]. Silyalar, olfaktör epitel yüzeyinde mukus içerisinde bulunmaktadır. Mukus, uçucu organik bileşiklerin yakalanması için koku bağlayıcı protein (OBP) içermektedir. Uçucu koku molekülleri, OBP yardımıyla silyalar üzerinde eksprese edilen reseptörlere bağlanarak elektriksel uyarı oluşumunu başlatmaktadır [41].

Olfaktör reseptör (OR)’ler, memeli genomundaki en geniş multigen ailesini oluşturan G protein bağlı reseptörlerdir. OR’ler, yalnızca olgun OSN’lerde bulunmaktadır. Olgunlaşmamış

OSN'ler, silialarında OR eksprese ederek olgun nöronlara dönüşmektedir. Ancak her bir olgun OSN bir tip OR eksprese edebilmektedir [42]. OR'lere koku molekülü bağlandıktan sonra bir dizi hücre içi olay başlamaktadır. OR, koku alma G proteini olan Golf'u aktifleştirmektedir. Golf, hücre membranında bulunan adenilat siklaz III aktivasyonuna neden olmaktadır. Adenilat siklaz III, ikincil haberci olan siklik adenozin monofosfat (cAMP)'ın üretimini artırmaktadır. Ortamda cAMP artışı, siklik nükleotid kapılı kanal ile etkileşime girerek hücre içine katyon girişini sağlamaktadır. Sodyum ve kalsiyum girişi hücre depolarizasyonuna neden olmaktadır. Ayrıca kalsiyum, klor kanalı aktivasyonu ile hücre dışına klor çıkışı sağlayarak da hücre depolarizasyonuna katkıda bulunmaktadır. OSN'ler yaklaşık -65 mV'a yakın dinlenim membran potansiyeline sahiptir. Koku molekülü uyarımından sonra yaklaşık 30 mV'luk depolarizasyon meydana gelerek aksiyon potansiyeli başlamaktadır [43].

Olfaktör epitelin bazalinden çıkan OSN aksonlarının miyelin kılıfları bulunmamaktadır. Ancak OSN aksonları lamina propria içinde OEC olarak tanımlanan glia hücreleri tarafından çevrelenmektedir. OEC'ler, OSN aksonlarını Schwan hücrelerine benzer şekilde sardığı için olfaktör Schwan hücreleri olarak da adlandırılmaktadır. OEC'ler, gelişmemiş aksonların ve ölü hücrelerin fagosite edilmesini sağlamaktadır. Ayrıca aksonal gelişim için gerekli birçok nörotrofik faktörü salgılamaktadır [44]. OSN aksonlarının; büyümesi, yenilenmesi ve olfaktör bulbus ile sinaps yapabilmesi için OEC'ler tarafından yapısal ve kimyasal olarak desteklenmesine ihtiyaç duymaktadır. OSN aksonları demetler halinde OEC'ler ile sarılarak olfaktör siniri oluşturmaktadır. Olfaktör sinir kribriform tabakadan geçerek beyinde olfaktör bulbusa ulaşmaktadır.

2.1.1.2. Destekleyici Hücreler

Olfaktör epitelde fazla sayıda Destekleyici hücre bulunmaktadır. Bu hücrelerin çekirdekleri epitelin apikal kısmına yakın olması sebebiyle kolayca ayırt edilebilmektedir. Sitoplazmalarında bol miktarda düz endoplazmik retikulum bulunmaktadır. Ayrıca mitokondri, golgi aygıtı, ribozom ve granüllü endoplazmik retikulum da fazlaca mevcuttur. Destekleyici hücreler; olfaktör epitele özgü sitokrom P450, sitokeratin 8, sitokeratin 18 ve aquaporin 5 gibi bazı hücre belirteçlerini eksprese etmektedir [45]. Olfaktör epitel yüzeyinden bazal laminaya kadar destekleyici hücreler uzanmaktadır. OSN'ler ile destekleyici hücreler arasında sıkı bağlantı fibrilleri bulunmaktadır. Bu sebeple destekleyici hücreler, OSN'lere hem yapısal hem de metabolik destek sağlamaktadırlar. Destekleyici hücrelerin apikal kısımlarında çok sayıda mikrovillus bulunmaktadır. Mikrovilluslar epitel yüzeyindeki mukus ile kaplanmıştır.

Destekleyici hücreler, OSN'ler gibi aksiyon potansiyeli oluşturabilen hücreler değildir bu nedenle koku duyusunun iletiminde katkıları bulunmamaktadır.

2.1.1.3. Mikroviller Hücreler

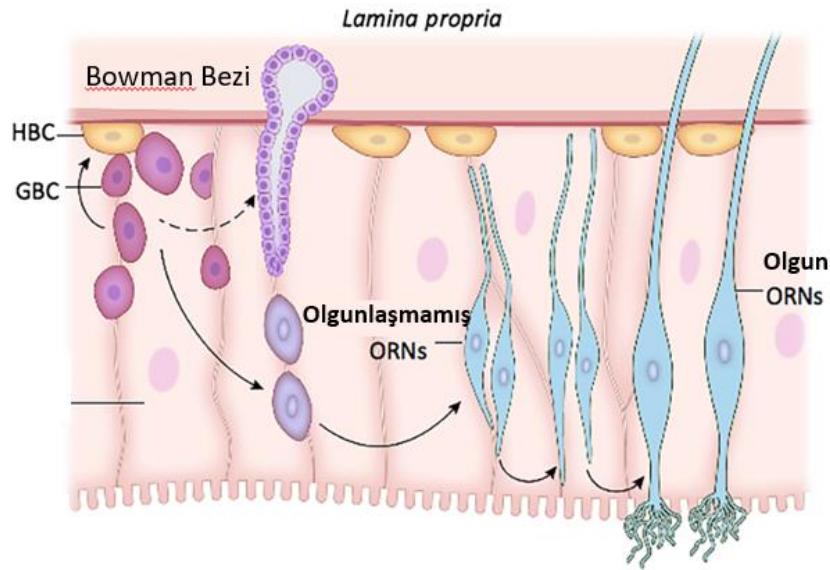
Mikroviller hücreler, epitel yüzeyine ulaşan mikrovillüslara sahiptirler. OE'de yaklaşık 1-2 milyon mikroviller hücre bulunmaktadır. Bu sayı olfaktör duyu nöronlarının onda birine tekabül etmektedir [46]. Bazalde aksona benzer sitoplazmik uzantıları lamina propriaya kadar uzanmaktadır. Mikroviller hücreler, merkezi sinir sistemiyle bağlantısı olmadığından kimyasal uyarıyı iletememektedir bu nedenle kemoreseptör olarak nitelendirilmemektedir. İki çeşit mikroviller hücre bulunmaktadır. Birincisi TrpM5 katyon kanalı eksprese ederken, ikincisi TrpC6, IP3R3, CFTR ve Ascl3'ü üretmektedir. Ayrıca ikinci tip mikroviller hücreler nöropeptit Y de oluşturabilmektedir. Nöropeptit Y, GBC proliferasyonunu artırdığı ileri sürülmüştür [47].

2.1.1.4. Bazal Hücreler

OE'de meydana gelen koku alma bozuklukları kendiliğinden iyileşebilmektedir. Bu iyileşme özelliğinin altında yatan sebep OE'de bulunan kök hücrelerdir. OE'de iki tip kök hücre bulunmaktadır: HBC'ler, OE'nin bazal laminasına desmozomlar ile bağlanmış hücrelerdir, GBC'ler ise, bazal laminadan uzakta epitelium boyunca dağılmış hücrelerdir. HBC'ler; sitokeratin-14, sitokeratin-5, Epidermal büyüme faktörü reseptörü ve hücreler arası adezyon moleküllü gibi immunobelirteçler ile işaretlenebilmektedir. HBC'ler, multipotent kök hücrelerdir ve hem kendilerini hem de OE'deki GBC dahil tüm hücre tiplerini oluşturabilmektedir [48]. OE'de meydana gelen hasarlarda, özellikle destek hücrelerinin zarar görmesiyle HBC proliferasyonu artmaktadır. OE hasarı ile aktive olan HBC'ler çoğalarak zarar gören hücelere dönüşmektedir. GBC'lerin farklı alt tipleri mevcuttur. HBC'lere benzer şekilde multipotent özelliğe sahip multipotent progenitörler (MPP), geçici amplifikasyon hücreler (TAC) ve acil nöronal öncüller (INP) GBC alt tiplerini oluşturmaktadır. MPP, Sox-2 gibi bazı transkripsiyon faktörlerini eksprese etmektedir. MPP, TAC'a farklılaştığında Achaete-scute homolog 1 (ASCL-1) ekspresyonuna başlamaktadır. TAC'a farklılaşma hücrenin nöronal seçim yaptığını göstermektedir. ASCL-1 eksprese eden progenitör hücreler farklılaşarak INP'yi oluşturmaktadır. INP; Neurog1, NeuroD1 ve NeuroD2 ekspresyonu yapmaktadır. GBC'ler, OE ve OSN hasarında hücre çoğalmasını artırmaktadır. HBC'ler sinir hasarında aktive olmazken GBC'ler sinir hasarına duyarlıdır ve çoğalarak nörojenezi başlatmaktadır. GBC'ler nöroenez ile olgunlaşmamış nöronlara dönüşerek yeni sinirleri oluşturmaktadır [49].

2.1.1.5. Olfaktör Epitelde Nörojeniz

Koku bilgisinin oluşabilmesi için koku moleküllerinin OSN'leri uyarak aksiyon potansiyeli oluşturmaı gerekmektedir. OSN ve/veya OSN'lerin dahil olduğu OE'nin hasarlanması koku iletimini engellemektedir. OSN ve OE, dış ortama açık olması nedeniyle zararlı etmenlere sürekli maruz kalabilmektedir. Bu durum, OSN'lerin diğeri nöronlara göre daha fazla kaybına neden olmaktadır. OE'de birçok dokudan farklı olarak embriyogenezden sonra nörojeniz devam etmektedir. HBC ve GBC'ler nörojenizi başlatan kök hücrelerdir ve hasarın çeşidine göre aktifleşmektedir. OE hasarı ile bazal laminada bulunan HBC'ler çoğalmaktadır. HBC'ler, MPP tip GBC'lere farklılaştığında nöral hücre çoğalması başlatılmaktadır. Sırasıyla TAC ve INP tip GBC ler meydana geldikten sonra, GAP-43 eksprese eden olgunlaşmamış OSN'ler oluşturulmaktadır. Olgunlaşmamış OSN'ler yüzeylerinde olfaktör reseptör oluşturmamış fonksiyonel olmayan nöronlardır. Olgunlaşmamış nöronlar, olfaktör işaretleyici protein (OMP) eksprese ederek olgun OSN'lere dönüşmektedir. Olgunlaşmamış OSN'lerin olgun nöron haline gelebilmesi için büyüme faktörlerine ihtiyaçları vardır. OE hasarından 24-48 saat sonra kök hücre çoğalması başlayarak 1 haftada zirve yapmakta ve 4. haftadan sonra azalmaktadır [50]. OE hasarından 3 gün sonra olgunlaşmamış OSN'ler oluşmaya başlamaktadır. İlk olgun OSN'ler hasardan 7-14 gün sonra meydana gelmektedir. Olgun OSN'ler 4-6 hafta sonra normal sayıya yaklaşmaktadır. OE ancak 8 haftanın sonunda normal görünümüne ulaşabilmektedir [51] (Şekil 2-2).



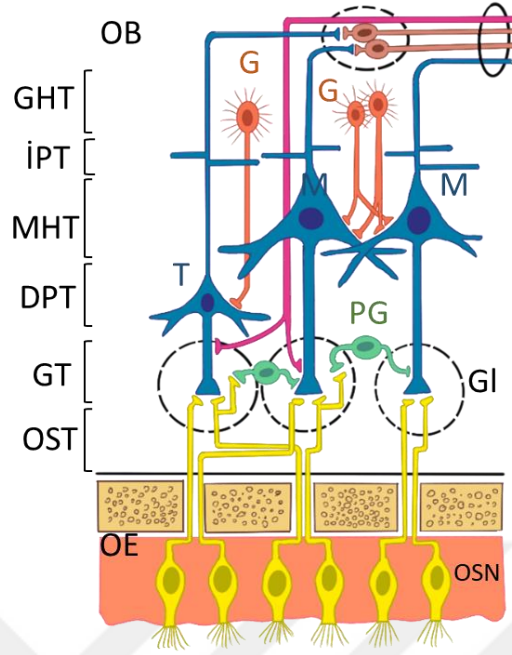
Şekil 2-2: OE Nörojenizi.

2.1.2. Olfaktör Bulbus

OSN aksonları kribriiform tabakayı geçtikten sonra OB'ye gelmektedir. OB, koku duyusunun beyinde algılandığı ilk bölgedir. OB'de koku ayrımı yapılmakta ve koku bilgisi beyindeki koku merkezlerine iletilmektedir. OB, çeşitli tabakalara ayrılmakta ve farklı işlevlere sahip hücrelerden oluşmaktadır.

2.1.2.1. Olfaktör Bulbus Tabakaları

OB, 6 tabaka ile düzenlenmiştir; olfaktör sinir tabakası (OST), glomerular tabaka (GT), dış pleksiform tabaka (DPT), mitral hücre tabakası (MHT), iç pleksiform tabaka (İPT) ve granül hücre tabakası (GHT) (Şekil 2-3). OSN aksonları, OST'yi teğet geçerek GT'deki glomerul adı verilen bölgelere ulaşmaktadır. Glomerullarda, OSN aksonları ile mitral ve tiftik hücreleri sinaps yapmaktadır. Aynı reseptörü eksprese eden OSN aksonları benzer glomerullarda bir araya gelmektedir. Bu durum GT'nin, reseptör tipine göre OSN'lerin bağlandığı bölgesel alanları meydana getirmektedir. Benzer koku moleküllerini algılayan OSN'ler birleştirilerek, kokunun işlenmesi ve tanımlanması için moleküler sınıflandırma yapılmaktadır. GT'de, glomerullar arasında bağlantıyı sağlayan periglomeruler (PG) ara nöronlar mevcuttur. PG ara nöronlarının lateral inhibisyon yaparak koku sinyallerinin güçlendirdiği düşünülmektedir. DPT'de, tiftik hücre somaları ile granül hücrelerin mitral ve tiftik hücrelerle sinaps yaptığı sekonder dendritleri bulunmaktadır. MHT'de, mitral hücrelerin somaları mevcuttur. Mitral ve tiftik hücreler birbirine benzemektedir ancak mitral hücreler somalarının daha büyük olması sebebiyle tiftik hücrelerden ayırt edilebilmektedir. İPT, MHT ile GHT arasında geçiş tabakasıdır ve hücre bulunmamaktadır. GHT, granül hücre somalarının bulunduğu tabakadır. Granül hücreler, PG nöronları gibi inhibitör ara nöronlardır. Mitral ve tiftik hücreleri arasında dendrodendritik sinaps yapmaktadır. Granül hücreler bu benzersiz sinaps sayesinde hem presinaptik hem de postsinaptik özelliklere sahiptir. Böylece granül hücreler, uyarı alınan hücreyi inhibe edebileceği gibi komşu hücreyi de inhibe edebilmektedir. Ayrıca granül hücreler, piriform korteks ve entorinal korteks gibi birçok üst merkezden bilgi almaktadır. Granül hücrelerin %90-95'i doğumdan sonra nörogenez ile üretilen nöronlardır. PG ve granül ara nöronlar, SVZ'de üretilip göç ederek OB'ye ulaşan ve bu bölgede olgunlaşan nöronlardır [52–54].



Şekil 2-3: OB Hücre Tabakaları. G, Granül hücre; Gl, Glomerul; PG, Periglomeruler ara nöron; M, Mitral hücre; T, Tiftik hücre.

2.1.2.2. Olfaktör Bulbus Organizasyonu ve Koku Ayrımı

OSN'lerin her biri yaklaşık 1000 adet koku reseptörü geninden birini eksprese etmektedir. Aynı resptörü eksprese eden OSN'ler, OB'de bulunan glomerulların bir veya ikisine ulaşmaktadır. OSN'lerin OE'deki hücre gövdelerinin konumları ile OB'ye ulaşan aksonların konumları benzerlik göstermektedir. Bu durum OSN'lerin OB'de topografik olarak bir harita oluşturduğunu düşündürmektedir. Örneğin ventral OE'den çıkan OSN aksonları, ventral OB glomerullarını tercih etmektedir [55]. OB'den çıkan mitral ve tiftik hücreler de koku merkezlerinde benzer lokasyonlara ulaşmaktadır. OB'ye giriş yapan OSN'ler ve çıkış yapan mitral ve tiftik hücreler fazla plastisiteye sahip değildir. Ancak PG ve granül ara nöronları yüksek plastisiteye sahip dinamik hücrelerdir. Ara nöronlardaki dinamik yapı koku ayrımı ve öğrenmesi için önem arz etmektedir. OSN ve mitral/tiftik hücreler arasındaki sinapsta glutamat nörotransmiteri kullanılmaktadır. PG ve granül ara nöronların büyük çoğunluğu GABAerjik iken kalanları dopaminerjiktir. Glutamat ile uyarılan ara nöronlar GABA salgılayarak lateral inhibisyon yapmaktadır. Lateral inhibisyon ince koku ayrımının yapılabilmesi için gereklidir. Ara nöronların sayısının azalması koku ayrımının bozulmasına neden olmaktadır. Ara

nöronların alt tipleri mevcuttur ve hangi alt tipinin oluşturulacağına nöroblastın üretildiği SVZ konumu belirlemektedir [56,57].

2.1.3. Koku Alma Merkezleri

Koku bilgisinin algılanması, diğer duyuyla entegre edilmesi ve yanıtın oluşturulması koku alma merkezleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Merkezi koku alma sisteminin, diğer duyu sistemlerine göre farklılıkları bulunmaktadır. İlk olarak koku duyusu, talamusla sinaps yapmadan doğrudan koku alma merkezlerine iletilmesi nedeniyle diğer duyulardan ayrılmaktadır. Bu durum koku bilgisinin filtrelenmeden algılanmasına neden olmaktadır. Ayrıca koku alma merkezleri diğer duyularda olduğu gibi belirgin kortikal alanlara sahip değildir. OB'den çıkan aksonların monosinaptik bağlantı yaptığı bölgeler birincil koku alma korteksi olarak adlandırılmaktadır. Birincil koku alma korteksleri koku bilgisini ikincil koku alma merkezlerine iletmektedir. Birden fazla koku alma korteksinin olması, koku bilgisinin farklı kortikal alanlar tarafından işlenerek çok sayıda bağlantı kurmasını sağlamaktadır [58].

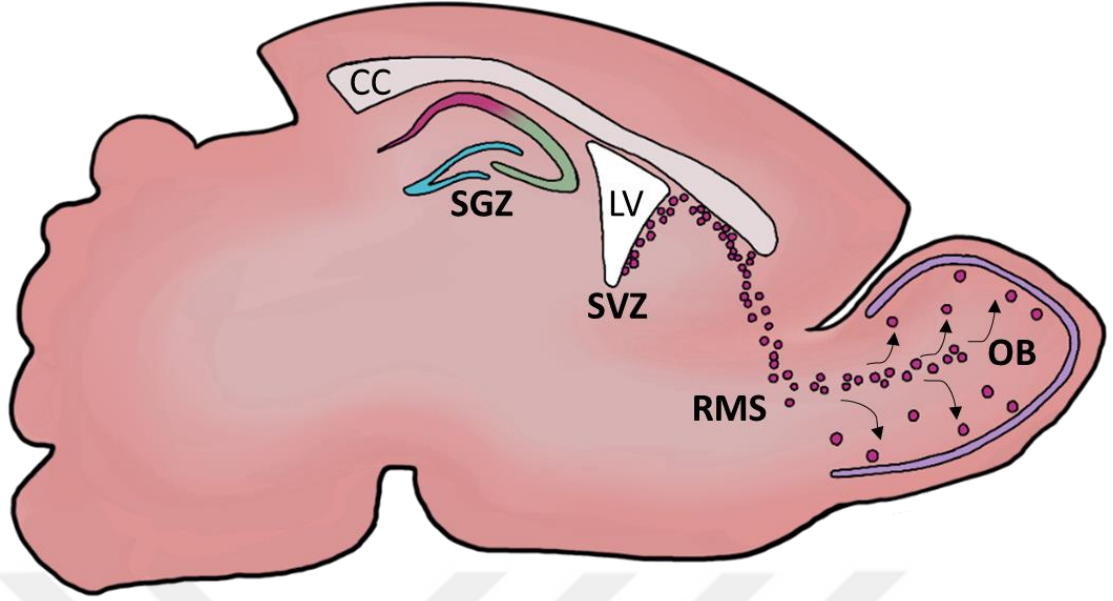
Birincil koku alma korteksleri; ön koku alma çekirdeği (AON), piriform korteks (PC), koku alma tüberkülü (OT), entorinal korteks (EC), amigdala ve periamigdaloid korteksin ön çekirdeğinden oluşmaktadır. Bu korteks yapıları, beyin yüzeyinde bulunması ve piramidal hücrelerden oluşması nedeniyle genel olarak neokorteks yapılarına benzemektedir. Ancak birçoğu iki veya üç katmanlı yapısı sebebiyle neokorteksten ayrılmaktadır. AON, birincil koku alma korteksleri arasında en ön tarafta bulunan bölgedir. Mitral ve tiftik hücre aksonlarının bir kısmı AON'de sinaps yapmaktadır. AON, kontralateral koku alma korteksleriyle sinaps yaparak koku bilgisinin diğer beyin hemisferine iletilmesini sağlamaktadır. PC, birincil koku alma korteksleri arasında en büyük koku alma merkezidir. Koku duyusu uyanlarının merkezi olarak tespit ve ayırt edilmesinde PC rol oynamaktadır. Koku alma korteksleri birbirleriyle etkileşime giren geniş kortikal ağ sistemine sahiptir. PC, bu kortikal ağ sisteminde en fazla bağlantı kuran yapıdır. PC, OT haricinde tüm koku alma kortekslerine dağılan aksonlara sahiptir. PC; ventral striatum, insula ve arka orbitofrontal kortekse önemli projeksiyonlar yapmaktadır. Ayrıca PC'den talamus ve lateral hipotalamusa giden bağlantılar da mevcuttur. OT, kortikal bir yapı olmasına rağmen bazı özellikleri korpus striatuma benzemektedir. Ventral striatumdaki nükleus akkumbens ile yakın ilişkide ve nükleus akkumbense benzer şekilde yüksek yoğunlukta asetilkolinesteraz içermektedir. Ayrıca ventral orta beyinden dopaminerjik girdiler alıp ventral palliduma bağlantılar çıkarmaktadır. EC, 5 katmanlı laminer yapısı sebebiyle diğer koku alma kortekslerine göre daha farklı kortikal yapıya sahiptir. EC,

hipokampusa giriş kapısı olarak bilinmektedir. Hipokampusa ulaşan girdilerin büyük bir bölümü EC'den geçmektedir. Bu nedenle hipokampusun öğrenme ve bellek işlevleri üzerinde EC'nin de rolü bulunmaktadır. Kemirgen ve bazı hayvanlarda OB liflerinin %50'si, primat ve insanlarda %10'u EC'ye ulaşmaktadır. OB'den çıkan mitral ve tiftik hücre aksonlarının bir bölümü de amigdala ve periamigdaloid kortekse uzanmaktadır. Kokunun duygusal yanıtları bu bölümde oluşturulmaktadır [59–61].

İkincil koku alma merkezleri arasında, orbitofrontal korteks, hipokampus, ventral striatum, hipotalamus ve talamus bulunmaktadır. Hipokampus, koku duyusuyla yakından ilişkilidir. Koku bilgisinin talamusa uğramadan hipokampusa iletilmesi koku hafızasının oluşmasına olanak sağlamaktadır. Hipokampusa özellikle entorinal korteksten güçlü bir koku alma bilgisi ulaştırılmaktadır. Primat ve insan hipokampusunda koku girdileri devam etmesine rağmen öğrenme ve bellek oluşturmada görme duyusu daha etkin hale gelmiştir [62].

2.2. Beyinde Nöroenez

Memeli beyninde, embriyogenezen sonra nöron üretiminin devam etmediği savunulmuştur. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile hem doğumdan sonra hem de yetişkinlikte yeni nöronların oluşturulabildiği gösterilmiştir. Beyinde iki germinal bölge nörogeneze devam etmektedir. SVZ; lateral ventrikülün duvarında bulunmakta ve üretilen nöroblastlar Rostral göç yolu (RMS) boyunca göç ederek OB'ye ulaşmaktadır (Şekil 2-4). Subgranüler alan (SGZ); hipokampusun dentat girusunda bulunmakta ve granüler bölgede yeni nöronlar olgunlaşmaktadır. Bazı çalışmalar, SVZ ve SGZ dışında serebral korteks, hipotalamus, substansiya nigra ve striatumda da yeni nöronların oluşturulduğunu göstermiştir [63].



Şekil 2-4: Beyinde Nörogenez

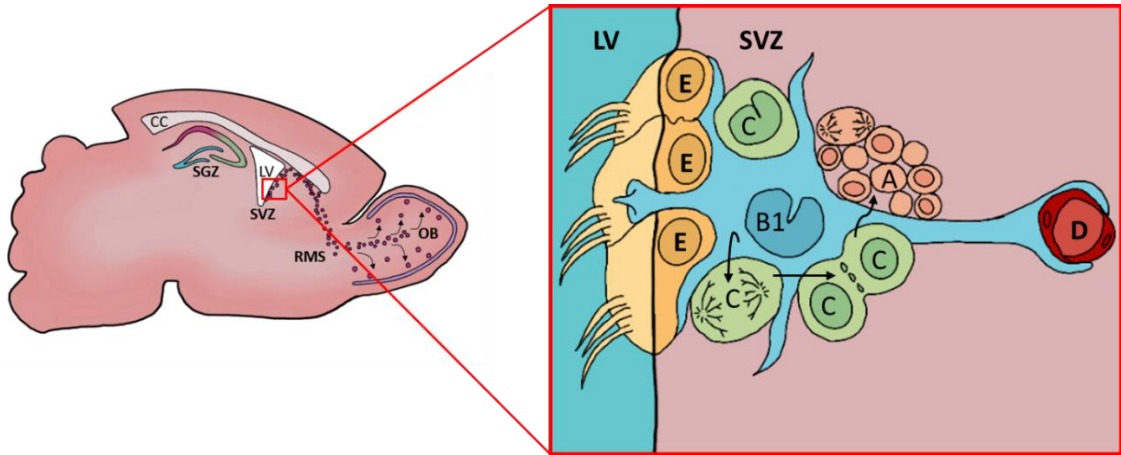
2.2.1. Subventriküler Bölge’de Nörogenez

SVZ, lateral ventrikül duvarında nöral kök hücreler (NKH)’den oluşan germinal bölgedir. NKH’ler; nöron, astrosit ve oligodendrosit meydana getirebilen multipotent hücrelerdir. SVZ’deki NKH’lere, B1 tipi hücre adı verilmektedir. Embriyoda radyal glialar nöron ve astrosit üretebilmektedir. Radyal gliaların doğumdan sonra B1 tipi hücelere dönüştüğü savunulmaktadır. Yetişkin fare SVZ’sinde yaklaşık 7000 adet B1 tipi hücre bulunduğu gösterilmiştir. B1 tipi hücreler; simetrik bölünerek rezerv kök hücre meydana getirebilirken, asimetric bölünerek hem B1 tipi hücre hem de C tipi hücre olarak adlandırılan ara progenitör hücreleri oluşturabilmektedir. C tipi hücreler bölünerek A tipi hücre olarak bilinen nöroblastları üretmektedir [64] (Şekil 2-5).

SVZ nörogenezini düzenleyen çok sayıda faktör mevcuttur. Bu faktörlerden bazıları lateral ventrikülün temasta bulunduğu beyin omurilik sıvısı (BOS)’nda bulunmaktadır. Lateral ventrikül duvarlarını örten endodimal hücreleri, bariyer görevi görerek BOS’un beyin parankimine geçmesini engellemektedir. B1 tipi hücreler endodimal hücrelerin arasından çıkıntılar uzatarak BOS’a temas etmektedir. BOS’ta bulunan; insülin benzeri büyüme faktörü-

2, sonic hedgehog proteini, Wnt sinyal yolu ve retinoik asit gibi faktörler SVZ nörogenezini etkilemektedir. B1 tipi hücrelerin bazal uçları kan damarları ile temastadır. Damar endotelinden salınan faktörler SVZ’de nöron üretimini düzenlemektedir. Ayrıca bazı nöronal bağlantılar da nörogenez üzerinde rol oynamaktadır. Rafe nukleusu kaynaklı serotonerjik nöronlar ile substansia nigra ve ventral tegmental alan kökenli dopaminerjik nöronlar SVZ nörogenezini düzenlemektedir. Hipotalamustaki POMC nöronlarının SVZ’yi innerve ettiği gösterilmiştir. POMC nöronlarının aktivasyonunun B1 tipi hücrelerde nörogenezi artırdığı belirtilmiştir. Bazı in vitro ve in vivo çalışmalar; fibroblast büyüme faktörü-2, epidermal büyüme faktörü, siliyer nörotrofik faktör, vasküler endoteliyal büyüme faktör ve BDNF gibi büyüme faktörlerinin SVZ’deki B1 tipi hücreleri uyarak nörogenezi artırdığını göstermişlerdir. Nitrik oksit, SVZ’de nörogenezi azaltarak sınırlayıcı bir rol oynamaktadır. Bunlara ek olarak koku duyusu bozukluklarında da SVZ nörogenezi etkilenmiştir. OSN aksonlarının kesilmesi, RMS’nin hasarlanması ve OB’nin cerrahi olarak çıkarılması SVZ’deki nörogenezi düzenleyerek yeni nöron üretiminin arttığı gösterilmiştir [65–67].

SVZ’deki nörogenezin temel amacı, üretilen nöroblastların OB’ye göç edip olgun nöronları oluşturmaktır. Ancak beynin farklı bölgelerinde meydana gelen hasara bağlı olarak, SVZ’de üretilen nöroblastlar hasarlı bölgeye göç edebilmektedir. Nöroblastlar hasarlı bölgeye göç edip olgunlaşarak fonksiyonel nöron halini almaktadır. Hasarlı bölgede olgunlaşan yeni nöronların sayısı tamamen iyileşme için yeterli değildir. Bu sebeple SVZ’de meydana gelen nörogenez, hasarlı bölgede sınırlı ölçüde nöron yenilemesi sağlayabilmektedir.



Şekil 2-5: SVZ’deki hücreler

2.2.1.1. Nöroblastların Subventriküler Bölge'den Göç Etmesi

SVZ'deki B1 tip hücreler bir dizi bölünme işlemi geçirerek A tipi hücreleri (nöroblast) meydana getirmektedir. Nöroblastlar, uzun ve kıvrımlı bir yol olan RMS boyunca göç ederek OB'ye ulaşmaktadır. Nöroblastın göç ederek OB'ye ulaşması ve OB'de olgun nöron halini alması yaklaşık 15 gün sürmektedir. Nöroblast, üç aşamadan oluşan sıçramalı tipte hareketle göç etmektedir. Birinci aşama, nöroblastın öncü uzantılar meydana getirerek göç yoluna yönelmesiyle gerçekleşmektedir. Öncü uzantıların mikrotübüler yönelimi için flamentöz aktine ihtiyaç duyulmaktadır. İkinci aşamada öncü uzantıların proksimalinde sitozolik genişleme oluşmaktadır. Mitokondri, golgi ve sentrozom gibi organellerin hücre içi hareketiyle sitozolik genişleme meydana gelmektedir. Üçüncü ve son aşamada aktomiyozin kasılmalarıyla soma da taşınarak nöroblastın hareketi tamamlanmış olmaktadır [68].

Nöroblastların göç için yönlendirilmesi ve göç yolunda tutulması birçok mekanizma ile gerçekleşmektedir. Bu mekanizmalar arasında; nöroblastların kendi özellikleri, bulundukları mikromimarıden yararlanma ve ortamda salgılanan moleküler kuvvetler yer almaktadır. Nöroblastlar, zincir adı verilen kümeler oluşturma yeteneğine sahiptir. Nöroblastların birbirlerine bağlanarak meydana getirdiği zincirler göç yolunu oluşturmaktadır. Nöral hücre yapışma moleküllü ve N-kadherini eksprese eden nöroblastlar, bu moleküllerin üretilmediği durumlarda zincir oluşumunu gerçekleştirememektedir [69]. Ancak in vitro yapılan çalışmalar nöroblastların zincir oluşturmada da göç edebildiğini göstermiştir. Nöroblast göçü için zincir oluşturma mekanizmasının gerekli olmadığı düşünülse de, zincir yapısı nöroblastların koordineli hareketine olanak sağlamaktadır [70]. Nöroblastlar; hücre dışı matriks, astrosit ve damar yapılarını kullanarak göç hareketini gerçekleştirebilmektedir. RMS boyunca, tenascin ve laminin gibi hücre dışı matriks proteinleri bulunmaktadır. Nöroblastlar integrin eksprese ederek bu hücre dışı matriks yapılarına bağlanmakta ve göç için zemin oluşturmaktadır [71]. Nöroblastlar göç sırasında astrosit ve damarlardan da destek almaktadır. Astrositler, nöroblastları çevreleyerek RMS boyunca tüneller oluşturmaktadır. Astrosit tünel yapıları, nöroblastların yönlendirilmesinde ve göç yolunda ilerlemelerini desteklemektedir [72]. Ayrıca astrositler; BDNF, glutamat ve gama aminobütirik asit (GABA) salgılayarak nöroblastların hayatta kalımlarını ve göç etme özelliklerini düzenleyebilmektedir. BDNF ve glutamat, nöroblast hayatta kalımını ve nöroblast göçünü artırmaktadır. GABA ise nöroblast göçünü azalttığı bildirilmiştir. Nöroblastlar, salınan bazı moleküllerin etkisiyle itici ve çekici uyarılardan etkilenmektedir. OB'de üretilen prokineticin-2 ve netrin1, nöroblastlar için

kimyasal çekici moleküllerdir. Ancak OB ablasyonu ile nöroblastların aynı göç yolunu takip ettiği gösterilmiştir [73]. Bu durum OB'den salınan çekici moleküllerin, nöroblast göçündeki rolünün belirsiz olduğunu düşündürmektedir. Nöroblastlar için itici kuvvetler, Slit-Robo sinyal yolağı ile oluşturulmaktadır. SVZ ve RMS'de bulunan astrositler Robo reseptörünü ifade etmektedir. Nöroblastlar ise Robo reseptörüne bağlanan Slit'leri eksprese etmektedir. BOS ve çevre dokularda Slit akışı oluşmaktadır ve konsantrasyon farkı meydana getirilerek nöroblastlar üzerinde itici kuvvet oluşturmaktadır [74].

Nöroblastlar, beyinde meydana gelen hasara yanıt olarak yaralı bölgeye göç edebilmektedir. Hasar meydana gelen bölgede astrositler monosit kemo-çekici protein 1 salgılamaktadır. Nöroblastlar bu çekici kuvvet sayesinde hasarlı bölgeyi tespit edebilmektedir. Nöroblastların hasarlı bölgede göç edebilmesi için RMS'den çıkması ve yeni alanı keşfetmesi gerekmektedir. Bu amaçla nöroblastlar tekrarlayan öncü uzantılar oluşturarak yönlerini tayin etmektedir. Nöroblastların hasar oluşan beyin bölgesini keşfetmesi ve göç yönünü yeniden saptaması nedeniyle daha fazla süre harcanmaktadır [75].

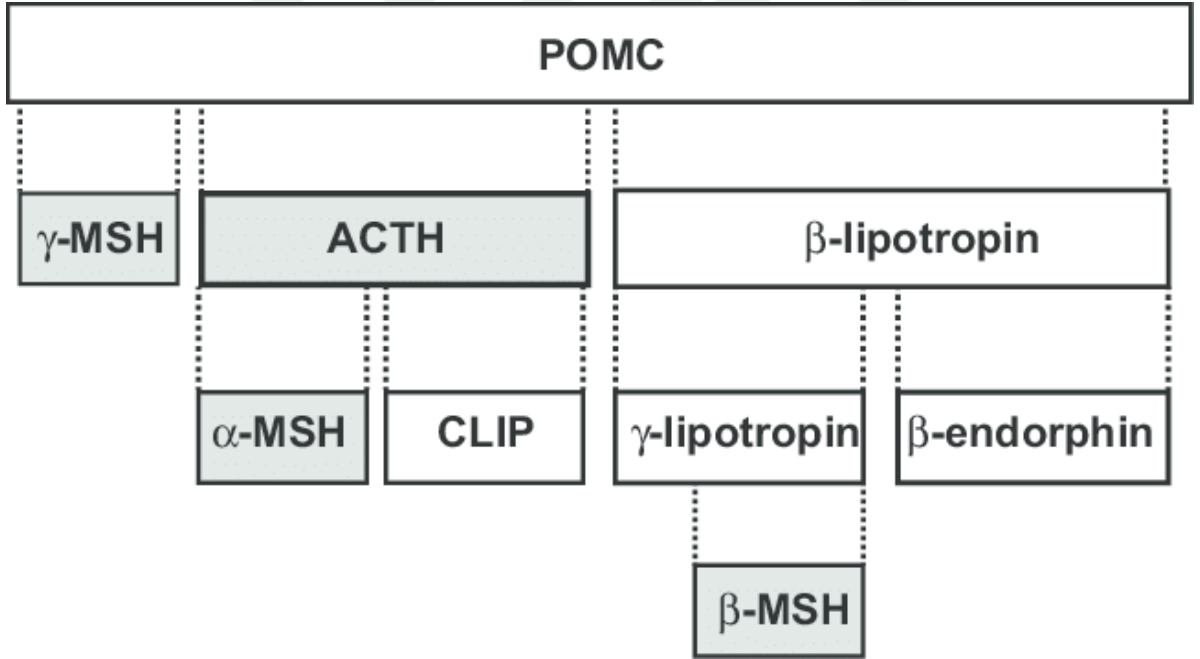
2.2.1.2. Nöroblastların Olfaktör Bulbus'da Olgunlaşması

SVZ'de oluşturulan nöroblastlar RMS boyunca göç ettikten sonra OB'de olgun nöron haline gelmektedir. RMS boyunca zincir şeklinde göç eden nöroblastlar OB'ye ulaştığında zincir yapısından çıkarak OB'de olgunlaşacağı alana göç etmektedir. Nöroblastların zincir yapısını Reelin, Tenascin-R ve Prokineticin-2 gibi hücre dışı matriks proteinleri düzenlemektedir [76]. Nöroblastlar zincir yapısından ayrıldıktan sonra OB katmanlarına göç etmektedir. Nöroblastların %95'i OB'nin GHT'sinde granül hücrelere dönüşürken, kalanlar GT'de periglomerüler hücrelere farklılaşmaktadır [77]. Bu olgun ara nöronlar; kalbindin, kalretinin veya tirozin hidroksilaz eksprese eden GABAerjik nöronlar veya glutamaterjik nöronlar halini almaktadır. Olgun ara nöronların aktivasyonu mitral ve tiftik hücrelerin baskılanmasını sağlayarak koku algısının keskinleşmesini sağlamaktadır. Bu durum koku ayırımında önem arz etmektedir. OB'ye entegre olan olgun nöronların hayatta kalabilmesi ve sinaptik bağlantı kurabilmesi için koku deneyimine ihtiyaç duymaktadır. Ayrıca koku yoksunluğu OB'deki Reelin ve Tenascin-R ekspresyonunu azaltarak nöroblastların radyal göçünü engellemektedir [78]. Bu durum koku girişinin OB'deki nöroblastlar üzerindeki indükleyici etkisini göstermektedir. Olgun ara nöronlar beynin üst merkezlerinden de bildirim almaktadır. Üst merkezler ara nöronlar aracılığıyla mitral ve tiftik hücre aktivitesini ayarlayarak

koku modülasyonunu sağlamaktadır [79]. Bu modülasyonun algısal öğrenme ve koku davranışı ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

2.3. Alfa Melanosit Stimulan Hormon

α -MSH, POMC öncü hormonunun bölünmesiyle oluşan 13 aminoasitli peptittir. POMC nöronları insanlarda hipotalamusun arkuat çekirdeğinden köken alırken diğer memelilerde hipotalamus kontrolündeki hipofizin pars intermediasından çıkmaktadır [80]. POMC eksprese eden nöronların aktivasyonu POMC peptidinin üretilmesine neden olmaktadır. POMC'un prohormon konvertaz 1 ve prohormon konvertaz 2 enzimleri ile bölünmesiyle α -MSH, β -MSH, γ -MSH, β -Endorfin ve ACTH'nin de dahil olduğu melanokortinler oluşturulmaktadır (Şekil 2-6). α -MSH ilk olarak hipofiz hormonu olarak kabul edilse de monositler, astrositler, keratinositler ve gastrointestinal hücreler gibi hipofiz dışı birçok dokuda üretildiği gösterilmiştir [81]. Ayrıca merkezi sinir sisteminin talamus, beyin sapı, orta beyin, diensefalon, ön beyin, epifiz bezi ve limbik sistem bölgelerinde bol miktarda α -MSH bulunmaktadır.



Şekil 2-6: POMC'den oluşan melanokortinler

2.3.1. Melanokortin Reseptörleri

Melanokortin peptitleri etkilerini G protein bağlı reseptör süper ailesine ait melanokortin reseptörleri (MCR)'ne bağlanarak göstermektedir. MCR1-MCR5 olmak üzere beş adet reseptör alt tipi tanımlanmıştır. MCR'ler yedi sarmallı transmembran reseptörlerdir. MCR uyarılması hücre içinde adenilil siklazı aktifleştirerek cAMP sinyal yolağını uyarmaktadır. İkincil haberci olan cAMP artarak protein kinaz A ve C fosforilasyonu ile hücre içi etkilerini göstermektedir [82].

MCR1, ilk tanımlanan melanokortin reseptörüdür. MCR1 ağırlıklı olarak melanositlerde bulunmakla birlikte makrofajlarda ve beyinde periaküaduktal gri alanda da eksprese edildiği bulunmuştur [83,84]. Bu reseptörler vücutta geniş alanlara dağılması nedeniyle pigmentasyon, antiinflamatuvar ve antipiretik etkiler dahil birçok fizyolojik süreçte rol almaktadır. Melanokortinlerin afiniteleri α -MSH > ACTH > γ -MSH şeklindedir.

MCR2, yalnızca adrenokortikotropin (ACTH) tarafından aktive edilmektedir. Adrenal bezdeki ekspresyonuna ek olarak deride de MCR2 bulunmaktadır [85]. Farelerde adipositlerde MCR2 eksprese edildiği ve lipolizde görev aldığı gösterilmiştir [86].

MCR3, kendisine bağlanan melanokortinler eşit derecede afinite göstermektedir. MCR3 çoğunlukla beyinde eksprese edilmesine rağmen plasenta, mide ve pankreasta da ifade edildiği gösterilmiştir [87]. MCR3'ün vücut kütlesi ve gıda alımıyla bağlantısı olduğundan enerji metabolizmasında rol almaktadır. Ayrıca MCR3 inflamatuvar yanıtta rol aldığı bulunmuştur [88]. Melanokortinlerin afiniteleri γ -MSH = ACTH $\geq$ α -MSH şeklindedir.

MCR4; beyinde, otonom sinir sisteminde ve omurilikte eksprese edilmektedir. MCR4'ün gıda alımı ve enerji düzenlenmesindeki rolü iyi bilinmektedir. MCR4 mutasyonlarının insanlarda obeziteyle ilgili olduğu gösterilmiştir [89]. MCR4 beyinde yaygın olarak bulunmaktadır. MCR4'ün, nörogenez ve nöroprotektif etkileri gösterilmiştir [90]. Ayrıca MCR4 erektil disfonksiyon ve ağrı duyumuyla ilgili olduğu saptanmıştır [91]. Melanokortinlerin afiniteleri α -MSH = ACTH > γ -MSH şeklindedir.

MCR5; deri, adrenal bez, böbrek, karaciğer, iskelet kası, lenf düğümleri, yağ dokusu ve ekzokrin bezler dahil birçok dokuda eksprese edilmektedir. Bağışıklığın düzenlenmesi, lipidlerin üretimi ve lakrimal bezden gözyaşı salgılanmasında rol aldığı bildirilmiştir [92,93]. Melanokortinlerin afiniteleri α -MSH $\geq$ ACTH > γ -MSH şeklindedir.

2.3.2. Alfa Melanosit Stimulan Hormon'un Etkileri

α -MSH etkilerini MCR'lere (MCR2 hariç) bağlanarak göstermektedir. α -MSH'nin ilk keşfedilmesi sebebiyle en bilinen özelliği melanositlerde pigmentasyonu sağlamaktır. α -MSH, derinin epidermis tabakasında bulunan melanositleri MCR1 aracılığıyla uyararak melanin salınmasına neden olmaktadır. Melanin derinin rengini veren pigmenttir. Canlıların birçoğunda melanosit ve α -MSH bulunmaktadır [94].

POMC nöronlarından salınan melanokortinlerin hem insan hem de hayvanlarda gıda alımı ve vücut ağırlığının düzenlenmesinde rol almaktadır. α -MSH, POMC'tan türetilen güçlü bir nöropeptittir. α -MSH; enerji harcamasını artırmakta, kilo kaybını sağlamakta ve yağ kütesini azaltmaktadır [95]. MCR4 gen bozukluklarının obezite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [96].

Daha sonra yapılan hem in vitro hem de in vivo çalışmalar α -MSH'nin güçlü antiinflamatuvar özelliğini ortaya koymuştur. α -MSH antiinflamatuvar özelliğini farklı yollarla göstermektedir. TNF- α , İnterlökin 1 β (IL-1 β), İnterlökin 6 (IL-6) ve İnterlökin 8 (IL-8) gibi proinflamatuvar sitokinlerin baskılanması ile α -MSH inflamasyonu azaltmaktadır. α -MSH, IL-10 gibi immünsüpresif sitokinlerin indüklenmesinde de rol oynamaktadır. Ayrıca α -MSH, T lenfositlerin aktivasyonu ve çoğalmasını düzenlemektedir [97]. α -MSH, antiinflamatuvar etkilerini özellikle proinflamatuvar sitokinler üzerine etkisini nükleer faktör- κ B (NF- κ B) aktivasyonunu baskılayarak yapmaktadır. α -MSH'nin güçlü antiinflamatuvar etkileri sepsis, inme ve akut solunum sıkıntısı modellerinde gösterilmiştir [98].

α -MSH'nin antiinflamatuvar etkilerine ek olarak antipiretik aktivitesi de mevcuttur. Endojen veya ekzojen pirojen maddelerin merkezi uygulamalarıyla deneysel ateş modeli oluşturulan laboratuvar hayvanlarında α -MSH uygulaması ateşi ortadan kaldırdığı saptanmıştır [99]. Bu etkiler yalnızca intraserebral uygulamalarda değil sistemik enjeksiyon ve intragastrik uygulanmalarda da gözlemlenmiştir. α -MSH'nin kan beyin bariyerini geçerek merkezi etkilere yol açması tedavide kullanımını kolaylaştırmaktadır.

α -MSH ve sentetik analoglarının nöroprotektif ve nörogenezi tetikleyici etkileri bulunmaktadır. İn vivo ve in vitro yapılan çalışmalar nöron hasarlanmalarında α -MSH'nin etkilerini incelemiştir. Serebral iskemi sonrası α -MSH uygulanması nöronların hayatta kalım oranını artırdığı gösterilmiştir [100]. Nörodejeneratif hastalıklarda α -MSH uygulanması fonksiyonel iyileşmeye ve bilişsel gerilemenin engellenmesine katkı sağladığı bulunmuştur

[101]. Nörodejeneratif hastalıklarda meydana gelen eksitotoksisite, oksidatif stres, apoptoz ve inflamatuvar yanıtta α -MSH'nin etkili olduğu saptanmıştır [102]. α -MSH'nin nöroprotektif ve nörorejeneratif etkisine ek olarak nörojenezi artırıcı özelliği de bulunmaktadır. Beyindeki nörojenez merkezleri olan SVZ ve SGZ'de α -MSH'nin nörojenezi tetiklediği gösterilmiştir [90]. POMC nöronları beyindeki SVZ'ye direkt innervasyonu bulunmaktadır. POMC nöronlarının aktivitesinin artması SVZ'de nörojenezi tetiklerken, azalması nörojenezi inhibe ettiği gösterilmiştir [32]. α -MSH'nin serebral infarktüs ve nörodejeneratif hastalıklarda nörojenez üzerine etkisinin POMC nöronlarının bağlantısı ve özellikle MCR4 aktivasyonu ile meydana geldiği düşünülmektedir.



3. YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları ve Etik Kurul Onayı

Çalışmada, İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü tarafından üretilen 48 adet, 12-16 haftalık ve 250-400 gr ağırlığında erkek Sprague Dawley cinsi sıçan kullanılmıştır. Deney süresince sıçanlar; 22-24 °C oda sıcaklığında, %50-55 nem ortamında, 12 saat aydınlık-karanlık döngüsünde ve standart sıçan kafeslerinde barındırılmıştır. Sıçanlar koku testlerinin uygulandığı günler dışında, yem ve su ihtiyaçlarına ad libitum olarak ulaşmışlardır. Çalışma; İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan, 25.02.2022 tarihli 2022/03 no'lu karar ile etik kurul onayı almıştır.

3.2. Deney Protokolü ve Deneyde Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan hayvan sayısını belirlemek için Güç analizi yapılmıştır. %90 güven düzeyi, $\alpha = 0.05$ anlamlılık seviyesi ve %93 güç için örneklem sayısı 6 bulunmuştur. Sıçanlar rastgele seçilerek 8 gruba ayrılmıştır; kontrol grubu (4.gün), kontrol grubu (21.gün), α -MSH grubu (4.gün), α -MSH grubu (21.gün), koku bozukluğu grubu (4.gün), koku bozukluğu grubu (21.gün), koku bozukluğu+ α -MSH grubu (4.gün) ve koku bozukluğu+ α -MSH grubu (21.gün).

Sıçanlarda koku bozukluğu oluşturmak için çinko sülfat ($ZnSO_4$) (US Pharmacopeia-1724769) satın alınmıştır. Serum fizyolojik içinde çözündürülerek %10'luk çinko sülfat çözeltisi elde edilmiş ve sıçanların burun içine 0,1 ml uygulanmıştır. Koku bozukluğu tedavisinde kullanmak için α -MSH (Sigma-Aldrich - M4135) satın alınmıştır. α -MSH sıçanlara 0,5 mg/kg dozda, 4 ve 21 gün süreyle intraperitoneal (i.p.) olarak uygulanmıştır.

3.2.1. Koku Testleri

Deney başlangıcından dört gün önce sıçanlar elle tutularak insan temasına alıştırılmıştır. Deneye başlamadan önce tüm sıçanların koku duyusunu ölçmek için koku testleri uygulanmıştır (T0). Koku testleri; burun içi çinko sülfat/salin uygulamasından sonraki gün (T1) ve ötenaziden önceki günlerde (T2) tekrarlanmıştır.

3.2.1.1. Gömülü Gıda Testi

Gömülü gıda testi, kemirgenlerin koku alma yeteneklerini araştırmak için yaygın olarak kullanılan bir metottur. Sıçanlar testten önce 15 saat boyunca gıdadan mahrum bırakılmış ancak su ihtiyaçları kısıtlanmamıştır. Standart (45x35x35 cm) temiz sıçan kafesine 5 cm kalınlığında kullanılmamış talaş koyulmuştur. Talaşın 1 cm altına pelet yem (yaklaşık 5 gr) gömülerek sıçanların görsel olarak yeme ulaşması engellenmiştir [103,104]. Yeni yeme karşı oluşan hipofajiyi engellemek için sıçanların sürekli tükettiği pelet yem tercih edilmiştir. 15 saat gıda kısıtlaması yapılan sıçanların pelet kokusunu takip ederek yeme ulaşmaları gözlenmiştir. Sıçanların kafese bırakılma zamanı ile pelet yemi bulup ön ayakları ve/veya dişleri ile kavraması arasındaki süre kronometre ile ölçülmüştür. 5 dakika süresince pelet yemi bulamayan sıçanların test süreleri 300 saniye olarak kaydedilmiştir [105,106]. Test, dijital video kamera ile (Canon 30D) jpeg formatında kayıt altına alınmıştır.

3.2.1.2. Koku Ayrım Testi

Koku ayırım testi, 40x30x30 cm boyutunda, 10x10 cm açıklığındaki bir kapıyla iki eşit odaya ayrılan plastik kafeste yapılmıştır. Sıçan kafeslerinin zeminine serilen talaş, koku ayırım testine kadar iki gün süreyle değiştirilmemiştir. Kafesin bir odası sıçanın kokusunun sindiği talaş ile kaplanırken diğer odasına temiz talaş serilmiştir. Sıçanlar temiz talaş olan odaya bırakılarak kafese alınmakta ve bölmeler arasında geçirdikleri süreler ölçülmektedir. Kemirgenlerin tanıdık kokuya sahip ortamda durmayı tercih ettikleri bildirilmiştir [107,108]. Koku ayırımının yapıldığını anlamak için koku ayırım indeksi hesaplanmaktadır. Koku ayırım indeksi: $(\text{tanıdık koku} - \text{yabancı koku}) / (\text{tanıdık koku} + \text{yabancı koku}) * 100$ formülüyle hesaplanmaktadır. Koku ayırım indeksinin yüksek olması bir bölmede geçirilen sürenin fazla olmasını yani tercih etmesini ifade ederken koku ayırım indeksinin düşük olması bölmeler arasında geçirilen süreler arasındaki farkın az olduğunu yani koku tercihi olmadan rastlantısal bulunduğunu göstermektedir. Koku ayırım testleri, dijital video kamera ile (Canon 30D) jpeg formatında kaydedilmiştir.

3.2.2. Çinko Sülfat ile Periferik Koku Bozukluğu Modeli Oluşturulması

İlk koku testleri (T0) uygulandıktan sonra sıçanların yarısına periferik koku bozukluğu modeli oluşturmak için burun içi çinko sülfat uygulanmış, diğer yarısına ise burun içi salin verilmiştir. Çinko sülfat iritan bir madde olması sebebiyle uygun doz ve miktarı tayin etme amacıyla ön çalışma yapılmıştır. Bu doğrultuda sıçanlara, burun içi 0,1 ml, %10'luk çinko sülfatın uygulanması uygun görülmüştür.

Sıçanlar Sevofluran gaz anestezisi ile anestezide alınmıştır. Anestezide uygulanan sıçanlar sırt üstü yatırılarak eğimli bir yüzeyde kafaları aşağıda kalacak şekilde yerleştirilmiştir. Çinko sülfat, ucu köreltilmiş polietilen boru yardımıyla burun içine yavaşça boşaltılmıştır. Çinko sülfatın farinkse kaçmasını engellemek için sıçanlar kuyruktan tutularak baş aşağı pozisyonda birkaç saniye bekletilmiş ve fazla sıvının burun ucundan akması sağlanmıştır. Sıçanlar kafeslerine alınıp havlu ile sarılarak vücut ısısının düşmesi engellenmiştir. Çinko sülfat uygulamasından sonra bazı sıçanlarda halsizlik ve durgunluk gibi semptomlar gözlenmiş ancak bu semptomlar ertesi gün sona ermiştir.

Sıçanlara burun içi çinko sülfat uygulamasından sonraki gün (T1) koku testleri tekrar uygulanmıştır. T1 testi sonuçları ile çinko sülfat uygulanan sıçanlarda koku bozukluğu modelinin meydana geldiği gösterilmiştir.

3.2.3. Deney Grupları ve Tedavi Protokolü

Araştırmamızda deney hayvanları 8 gruba ayrılmıştır. Her grupta 6 sıçan bulunmaktadır. Deney hayvanlarının yarısına 4. günde, diğer yarısına ise 21. günde ötenazi uygulanmıştır.

- Kontrol grubu (4.gün): Burun içi 0,1 ml salin uygulanan sıçanlara 4 gün süreyle i.p. salin enjeksiyonu yapılmıştır.
- Kontrol grubu (21.gün): Burun içi 0,1 ml salin uygulanan sıçanlara 21 gün süreyle i.p. salin enjeksiyonu yapılmıştır.
- α -MSH grubu (4.gün): Burun içi 0,1 ml salin uygulanan sıçanlara 4 gün süreyle i.p. olarak 0,5 mg/kg dozunda α -MSH enjeksiyonu yapılmıştır.
- α -MSH grubu (21.gün): Burun içi 0,1 ml salin uygulanan sıçanlara 21 gün süreyle i.p. olarak 0,5 mg/kg dozunda α -MSH enjeksiyonu yapılmıştır.
- Koku Bozukluğu grubu (KB) (4.gün): Burun içi 0,1 ml %10'luk çinko sülfat uygulanan sıçanlarda periferik koku bozukluğu oluşturulmuştur. Bu gruptaki sıçanlara 4 gün süreyle i.p. salin enjeksiyonu yapılmıştır.
- Koku Bozukluğu grubu (KB) (21.gün): Burun içi 0,1 ml %10'luk çinko sülfat uygulanan sıçanlarda periferik koku bozukluğu oluşturulmuştur. Bu gruptaki sıçanlara 21 gün süreyle i.p. salin enjeksiyonu yapılmıştır.

- Koku Bozukluğu + α -MSH grubu (KB+ α -MSH) (4.gün): Burun içi 0,1 ml %10'luk çinko sülfat uygulanan sıçanlara 4 gün süreyle i.p. olarak 0,5 mg/kg dozunda α -MSH enjeksiyonu yapılmıştır.
- Koku Bozukluğu + α -MSH grubu (KB+ α -MSH) (21.gün): Burun içi 0,1 ml %10'luk çinko sülfat uygulanan sıçanlara 21 gün süreyle i.p. olarak 0,5 mg/kg dozunda α -MSH enjeksiyonu yapılmıştır.

Tüm sıçanlar ötenazi günlerinden 1 gün önce (3. ve 20. gün), tekrar koku testlerine (T2) tabi tutulmuştur.

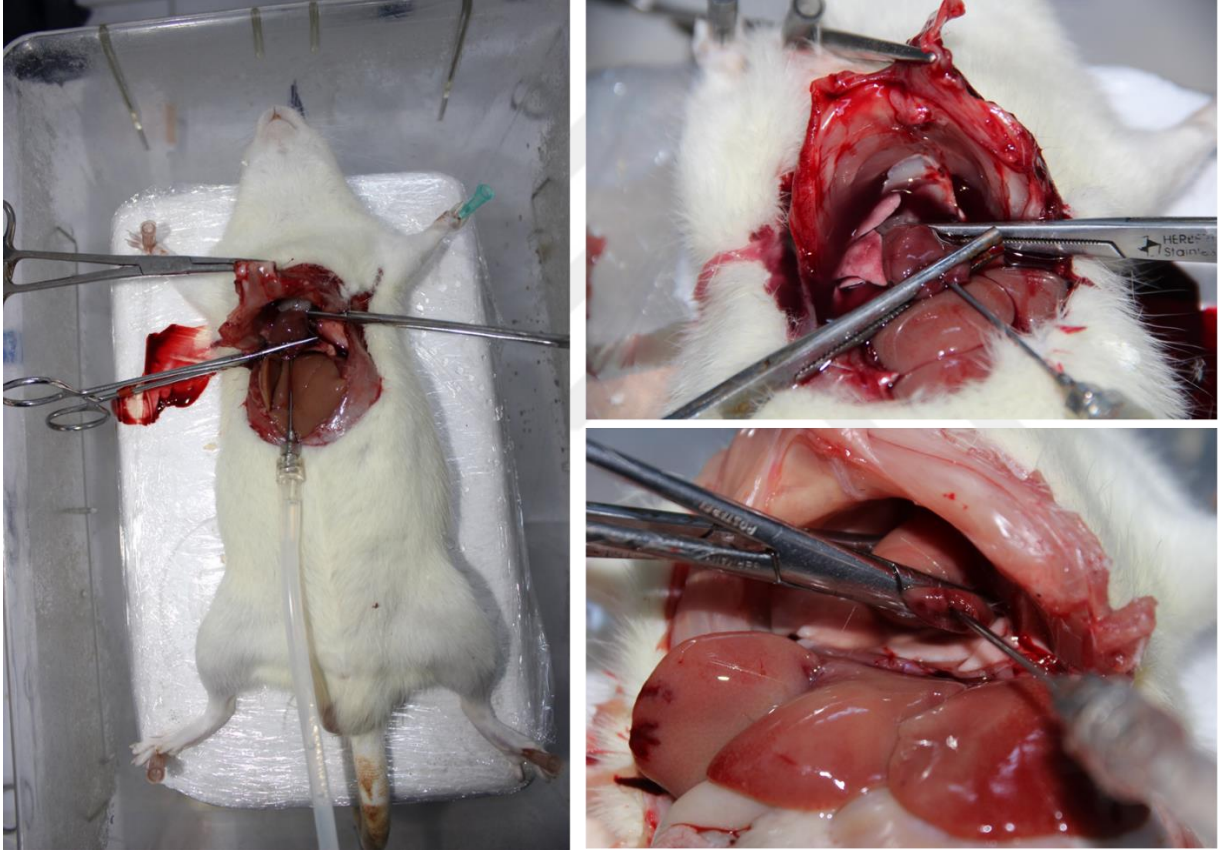
3.3. Dokuların Toplanması ve Analizlere Hazırlanması

Deney hayvanlarının yarısına 4. günde, diğer yarısına ise 21. günde ötenazi yapılmıştır. Ötenazi yapılacak sıçanlara preanestezik (ksilazin: 10 mg/kg, i.p.) ve anestezik (ketamin: 75 mg/kg, i.p.) maddeler uygulanmıştır. Sıçanların genel anestezide girmesi ağrı duyusunun kontrolü ile (kuyruk ve parmak pens ile sıkılarak) sağlanmıştır. Genel anestezide altındaki sıçanlara; bir ucu perfüzyon cihazına bağlı gavaj kanülüyle, sol ventrikülden giriş yapılarak kanül aorta yerleştirilmiştir. Dolaşımdan dönen kanın boşaltılması için sağ atriya kesi atılmıştır (Şekil 3-1). Perfüzyon cihazı ile önce PBS, daha sonra %4'lük paraformaldehit dolaşıma verilmiştir. Karaciğer ve diğer dokularda renk değişikliğinin meydana gelmesi ve dokuların sertleşmesinin tespiti paraformaldehit perfüzyonunun tüm sisteme geçtiğini düşündürmüştür. Paraformaldehit perfüzyonundan sonra sıçanlar dekapite edilerek; olfaktör epiteli içeren burun dokuları ve OB ve SVZ'yi kapsayan beyin dokuları çıkarılmıştır. Dokular %10 nötral tamponlu paraformaldehit fiksatifine alınmış ve işlem gününe kadar aralıklarla fiksatif yenilenmiştir.

Burundaki kemik yapıların mikrotom ile kesilebilir hale gelebilmesi için dokular dekalsifiye edilmiştir. Burun dokuları bir gece boyunca fiksatife maruz bırakılmış ve ertesi gün ticari hızlı dekalsifikasyon solüsyonuna alınmıştır. Her burun dokusu 40-50 ml dekalsifikasyon çözeltisinde 10 gün süreyle bekletilmiştir. Kemik dokuların her gün ince iğne ile yumuşaklığı kontrol edilmiştir. Burun dokuları dekalsifikasyon çözeltisinden çıkarılarak 5-6 saat akan su altında bekletilmiş ve nötral formaldehit çözeltisine koyulmuştur.

Burun ve beyin dokuları dehidrasyon amacıyla yükselen etil alkol serisinden (sırasıyla 70°, 90°, 96° ve 100°) geçirilerek ksilene alınmıştır. Ardından sırasıyla ksilen-parafin karışımı ve saf parafinde bekletilen dokular parafin bloklar içerisine gömülmüştür. Parafin bloklardan mikrotom yardımıyla 4-5 µm kalınlıklarında kesitler alınarak pozitif şarjlı lamlara alınmıştır. Beyin dokuları sagittal, burun dokuları koronal düzlemde kesilerek incelenmeye hazırlanmıştır.

Biyokimyasal analizler için sıçanlardan perfüzyondan önce kan alınmıştır. Alınan kanlar 3000 RPM’de 10 dakika santrifüj edilmiş ve elde edilen serum örnekleri -80°C’de ilgili biyokimyasal analizler yapılana kadar saklanmıştır.



Şekil 3-1: Aorta kanül yerleştirme.

3.4. Histolojik ve Biyokimyasal Analizler

3.4.1. İmmünohistokimya ve İmmünofloresan Analizler

Dokuların bir bölümü immunohistokimya (IHC) bir bölümü ise immünofloresan (IF) yöntemi ile incelendi. Beyin dokularında DCX ve Nestin-ASCL1 antikorları IF yöntemiyle

işaretlendi. Diğer antikorlar ise IHC yöntemiyle incelendi. IHC ve IF analizlerinin yapılabilmesi için dokuların önce rehidrasyon işleminden geçmesi gerekmektedir. Bu amaçla dokular sırasıyla ksilenden, düşen etil alkol serisinden (sırasıyla 100°, 96°, 90°, 70°) ve distile sudan geçirildi.

Streptavidin-biotin immünoperoksidaz yöntemi ile IHC yapıldı. Tüm antikorlara deneme boyamalar yapılarak uygun protokol ve seyreltme oranları bulundu. Dokular 3 kez PBS ile yıkandı ardından spesifik olmayan boyamaların engellenmesi amacıyla H₂O₂ ile muamele edildi. 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra dokulara aynı amaçla serum bloklaması da uygulanmıştır. Ardından dokuların üzeri uygun bir primer antikorlar (dilüsyon oranları: ASCL1 1:300, GAP-43 1:100, OMP 1:50, IL-10 1:300, NGF 1:300, BDNF 1:200, NeuN 1:200) ile kaplanarak bir gece boyunca +4°C’de bekletildi. Ertesi gün dokular PBS ile yıkanarak primer antikordan uzaklaştırıldı. Daha sonra dokular uygun sekonder antikorda bekletildi ve yıkama işlemi tekrarlandı. Dokular HRP’de bekletilerek sekonder antikorlara bağlanması sağlandı. Kesitlere kromojen eklenerek dokularda tepkimenin meydana gelmesi sağlandı ve distile su ile yıkama yapılarak tepkime durduruldu. Beyin dokularında kresil violet ile, burun dokularında ise Hematoksilen-Eozin ile zıt boyama yapıldı. Zıt boyamalardan sonra dokular yükselen alkol serisinden ve tolüenden geçirildi. Dokulara entellan solüsyonu eklenerek lamel ile kapatıldı. IHC yöntemiyle incelenen dokular mikroskop (Olympus BX61, Japonya) ile incelendi. Kesitlerde x20/x40/x100 objektifleri kullanılarak uygun büyütmelerde DP72 kamera ve CellSens yazılımı (Olympus, Japonya) kullanılarak fotoğraflar alındı. Deney grupları kör bir araştırmacı tarafından H-skoru veya yüzde cinsinden değerlendirilerek veriler elde edildi.

IF yöntemiyle incelenen dokulara ilk gün IHC ile aynı protokol uygulandı (dilüsyon oranları: Nestin 1:200/ASCL1 1:300, DCX 1:200). Ertesi gün PBS ile yıkanan dokulara Alexaflora 488 (dilüsyon oranı 1:500) ve 568 (dilüsyon oranı 1:1000) sekonder antikorları eklendi. Dokular ışığa maruz bırakılmadan bekletildi ve sonrasında yıkama yapıldı. Son olarak dokular, nükleusların floresan ışımaya vermesi amacıyla DAPI içeren kapatıcı medyum ile kapatıldı. İmmünofloresan yöntemi ile işaretlenen kesitler mikroskop (Olympus BX61, Japonya) altında incelendi. Kesitlerde x20/x40/x100 objektifleri kullanılarak uygun büyütmelerde ilgilenilen alanlardan DP72 kamerası ve CellSens yazılımı (Olympus, Japonya) kullanılarak fotoğraflar alındı. Deney grupları için kör bir araştırmacı tarafından ImageJ yazılımı [109] kullanılarak DAPI ile işaretlenmiş nükleuslar (A) ve pozitif reaktivite vermiş

hücreler sayılarak (B) yüzde hesabı yapılmıştır. Böylece histolojik veriler % cinsinden elde edildi ($B/A \cdot 100$).

OE kalınlığının ölçümünde, burunda incelenen ASCL1, GAP-43 ve OMP antikorlarının IHC boyamaları kullanıldı. IHC boyamalarında tüm grupların 1, 2 ve 3. konkalarının OE kalınlıkları ölçülerek ortalamaları alındı. ASCL1, GAP-43 ve OMP boyamalarının ortalama OE kalınlıklarının da ortalamaları alınarak genel OE kalınlığı ortalaması saptandı.

3.4.2. Biyokimyasal Analizler

Sıçanlardan alınan serum örneklerinde α -MSH biyokimyasal olarak ölçüldü. α -MSH ELİSA kiti kullanılarak serum α -MSH değerleri saptandı. Analizler sandwich ELİSA yöntemine göre yapıldı. Bu yöntemle göre yapılacak olan analize uygun antikorla (yakalama antikor) kaplanmış kuyucukların olduğu plakalar kullanıldı. Kuyucuklara numune eklendikten sonra eklenen numunede bulunan antijen ile kuyucukta bulunan yakalama antikoruna birbirine bağlanır. Analize uygun biyotinlenmiş antikor (işaretlenmiş deteksiyon antikor) kuyucuğa eklendi. Deteksiyon antikoruna yakalama antikoruna bağlanmış antijene farklı bir epitopundan bağlanır. Daha sonra Streptavidin-HRP eklenir ve biyotinlenmiş antikora bağlanır. İnkübasyondan sonra bağlanmamış Streptavidin-HRP yıkama solüsyonu ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Daha sonra substrat solüsyonu eklendi ve numunede bulunan antijen miktarı ile orantılı olarak mavi renk gelişti. Reaksiyon asidik durdurma solüsyonunun eklenmesiyle sonlandırıldı ve 450 nm’de absorbans ölçüldü.

3.5. İstatistiksel Analizler ve Değerlendirme

İstatistiksel analizler SPSS-22 (IBM) yazılımı kullanılarak yapıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu analitik yöntemlerle (Kolmogorov-Smirnov) incelendi. Tanımlayıcı analizler; normal dağılıma uygun veriler için ortalama ve standart sapma, ayrıca normal dağılmayan değişkenler için ortanca ve çeyrekler arası aralık olarak verildi. Normal dağılıma sahip ikiden fazla grubun karşılaştırılmasında One-Way ANOVA testi kullanıldı. Koku testlerinin zamansal karşılaştırmasını yapmak için Two-Way ANOVA testi kullanıldı. Normal dağılmayan değişkenlerin gruplar arasında farklılıkları Kruskal-Wallis testi kullanılarak karşılaştırıldı. Analiz sonuçları $p < 0,05$ için anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. HİSTOLOJİK BULGULAR

4.1.1. Olfaktör Epitel Bulguları

Burun kesitlerinde olfaktör epitel kalınlığı araştırıldığında; 4. günde KB grubunun OE kalınlığının, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak düşük olduğu saptanmıştır ($p < 0.001$). 4. günde KB+ α -MSH grubunun OE kalınlığının KB grubuna göre değişmediği gözlenmiştir. KB+ α -MSH grubunun OE kalınlığı 4. günde, kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur ($p < 0.001$). 21. günde KB grubunun OE kalınlığının kontrol grubuna göre düşük olduğu belirlenmiştir ($p < 0.001$). 21. günde KB+ α -MSH grubunun OE kalınlığı, KB grubuna göre artış eğilimi göstermesine rağmen anlamlı fark oluşturmamıştır. 21. günde KB+ α -MSH grubunun OE kalınlığının kontrol grubuna göre düşük olduğu belirlenmiştir ($p < 0.001$). Ayrıca 21. günde KB+ α -MSH grubunun OE kalınlığının 4. gündeki KB+ α -MSH grubuna göre arttığı saptanmıştır ($p < 0.05$) (Tablo 4-1) (Şekil 4-1).

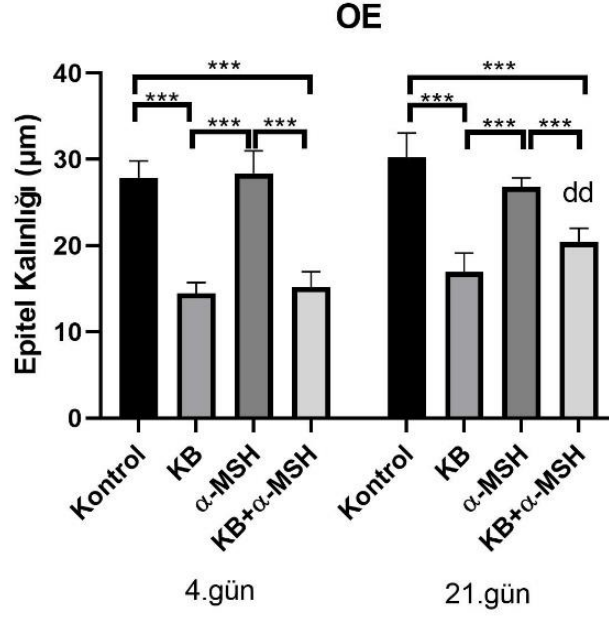
Tablo 4-1: OE Kalınlığı

Gruplar	Genel Ortalama OE Kalınlığı (μm)	ASCL1 OE Kalınlığı Ortalama (μm)	GAP-43 OE Kalınlığı Ortalama (μm)	OMP OE Kalınlığı Ortalama (μm)
Kontrol(4.g)	27,86 $\pm$ 1,74 ^{bd}	27,04 $\pm$ 6,79	33,97 $\pm$ 3,49	23,52 $\pm$ 2,65
KB(4.g)	14,48 $\pm$ 1,14 ^{ac}	16,65 $\pm$ 2,35	16,18 $\pm$ 2,07	10,62 $\pm$ 0,82
α -MSH(4.g)	28,38 $\pm$ 2,39 ^{bd}	32,49 $\pm$ 2,54	31,13 $\pm$ 3,87	21,53 $\pm$ 3,49
KB+ α -MSH(4.g)	15,22 $\pm$ 1,61 ^{ac}	18,34 $\pm$ 3,98	15,68 $\pm$ 1,71	11,65 $\pm$ 1,82
Kontrol(21.g)	30,2 $\pm$ 2,61 ^{BD}	34,50 $\pm$ 6,73	35,92 $\pm$ 2,36	20,19 $\pm$ 1,90
KB(21.g)	16,99 $\pm$ 1,97 ^{AC}	17,02 $\pm$ 3,56	21,99 $\pm$ 1,93	11,97 $\pm$ 1,74
α -MSH(21.g)	26,81 $\pm$ 0,96 ^{BD}	28,02 $\pm$ 1,26	29,26 $\pm$ 1,16	17,16 $\pm$ 2,00
KB+ α -MSH(21.g)	20,44 $\pm$ 1,45 ^{AC#}	19,38 $\pm$ 2,96	23,98 $\pm$ 2,23	17,95 $\pm$ 1,64

^a $p < 0.001$ Kontrol (4.g) grubuna göre, ^b $p < 0.001$ KB (4.g) grubuna göre, ^c $p < 0.001$ α -MSH (4.g) grubuna göre, ^d $p < 0.001$ KB+ α -MSH (4.g) grubuna göre istatistiksel anlamlılık

^A $p < 0.001$ Kontrol (21.g) grubuna göre, ^B $p < 0.001$ KB (21.g) grubuna göre, ^C $p < 0.001$ α -MSH (21.g) grubuna göre, ^D $p < 0.001$ KB+ α -MSH (21.g) grubuna göre,

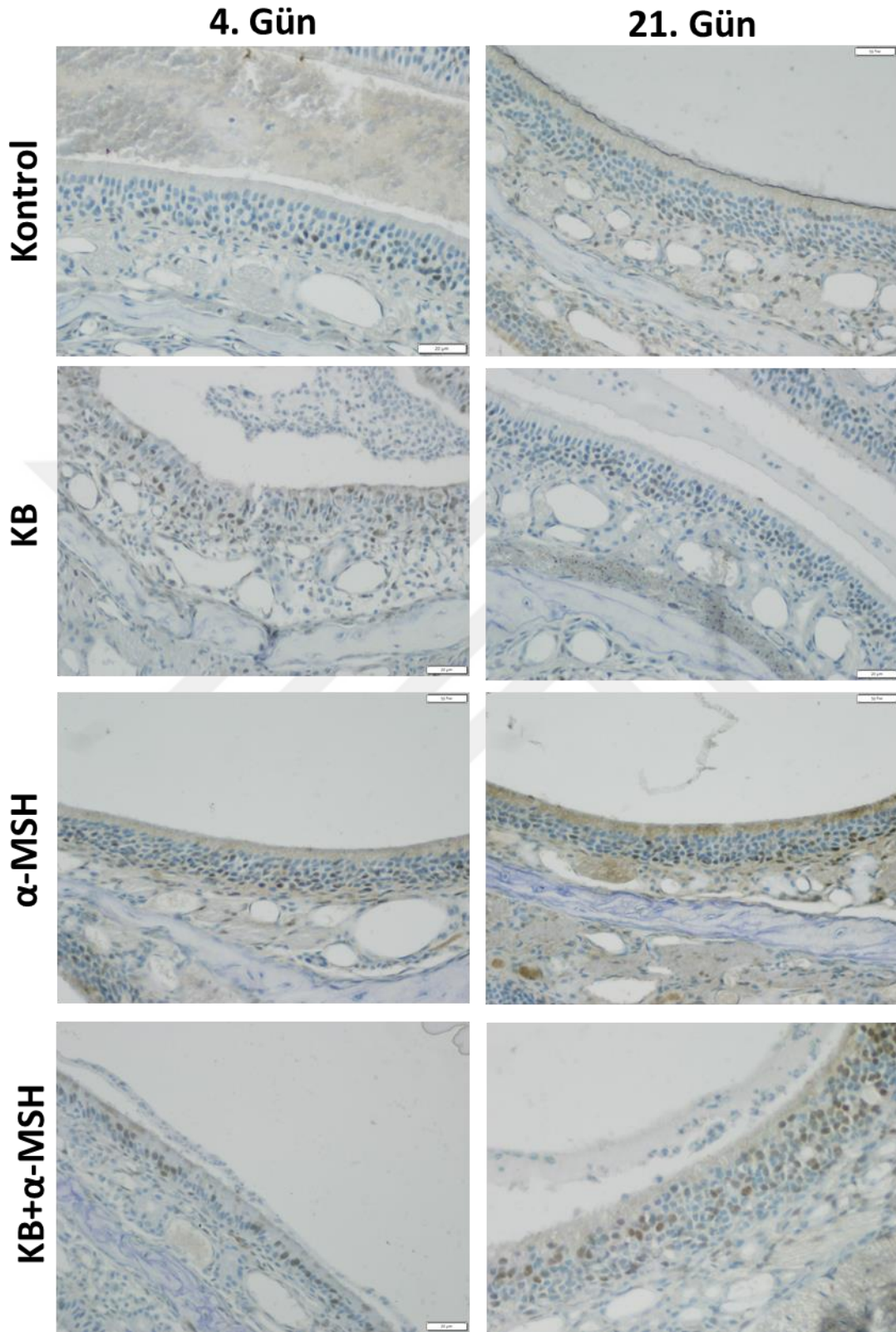
[#] $p < 0.01$ KB+ α -MSH (4.g) grubuna göre istatistiksel anlamlılık



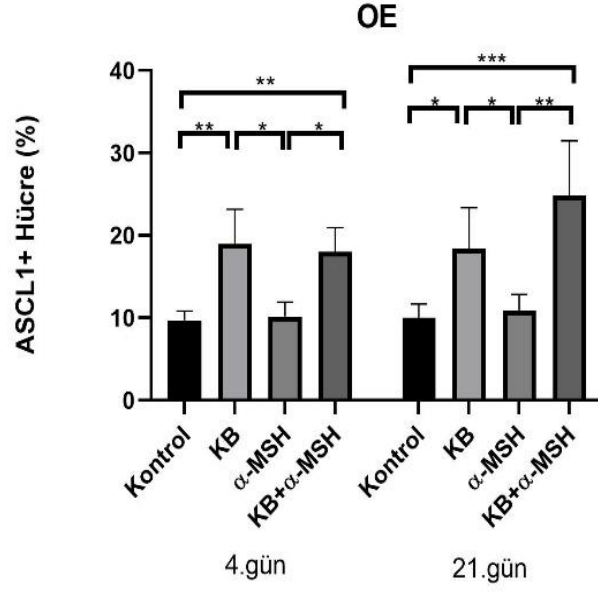
Şekil 4-1: OE Kalınlığı grafiği.

*** $p < 0.001$; ^{dd} $p < 0.01$, 4. gün KB+ α -MSH grubuna göre anlamlılık.

Olfaktör epitel kesitlerinde kök hücre belirteci olan ASCL1+ immunoreaktivitesinin yüzdesel oranı incelendiğinde, 4. günde KB grubunun ASCL1+ immunoreaktivitesinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu bulunmuştur ($p < 0.01$). 4. günde KB+ α -MSH grubunun ASCL1+ immunoreaktivitesinin KB grubuna göre değişmediği belirlenmiştir. 4. günde KB+ α -MSH grubunun ASCL1+ immunoreaktivitesinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu saptanmıştır ($p < 0.01$). 21. günde KB grubunun ASCL1+ immunoreaktivitesinin kontrol grubuna göre arttığı bulunmuştur ($p < 0.05$). 21. günde KB+ α -MSH grubunun ASCL1+ immunoreaktivitesinin KB grubuna göre artış eğiliminde olduğu belirlenmiştir. 21. günde KB+ α -MSH grubunun ASCL1+ immunoreaktivitesinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu saptanmıştır ($p < 0.001$) (Şekil 4-2, Şekil 4-3).



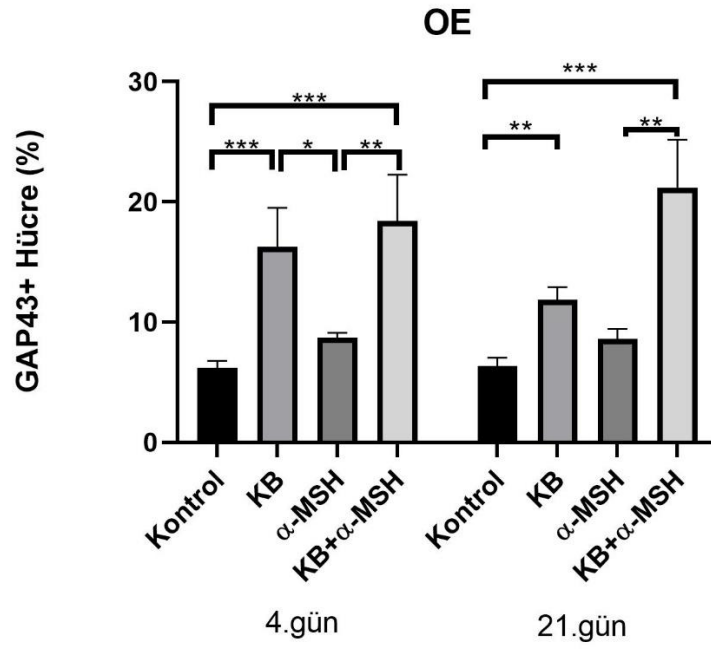
Şekil 4-2: ASCL1+ immunohistokimya görüntüsü.



Şekil 4-3: ASCL1+ Hücres grafiği.

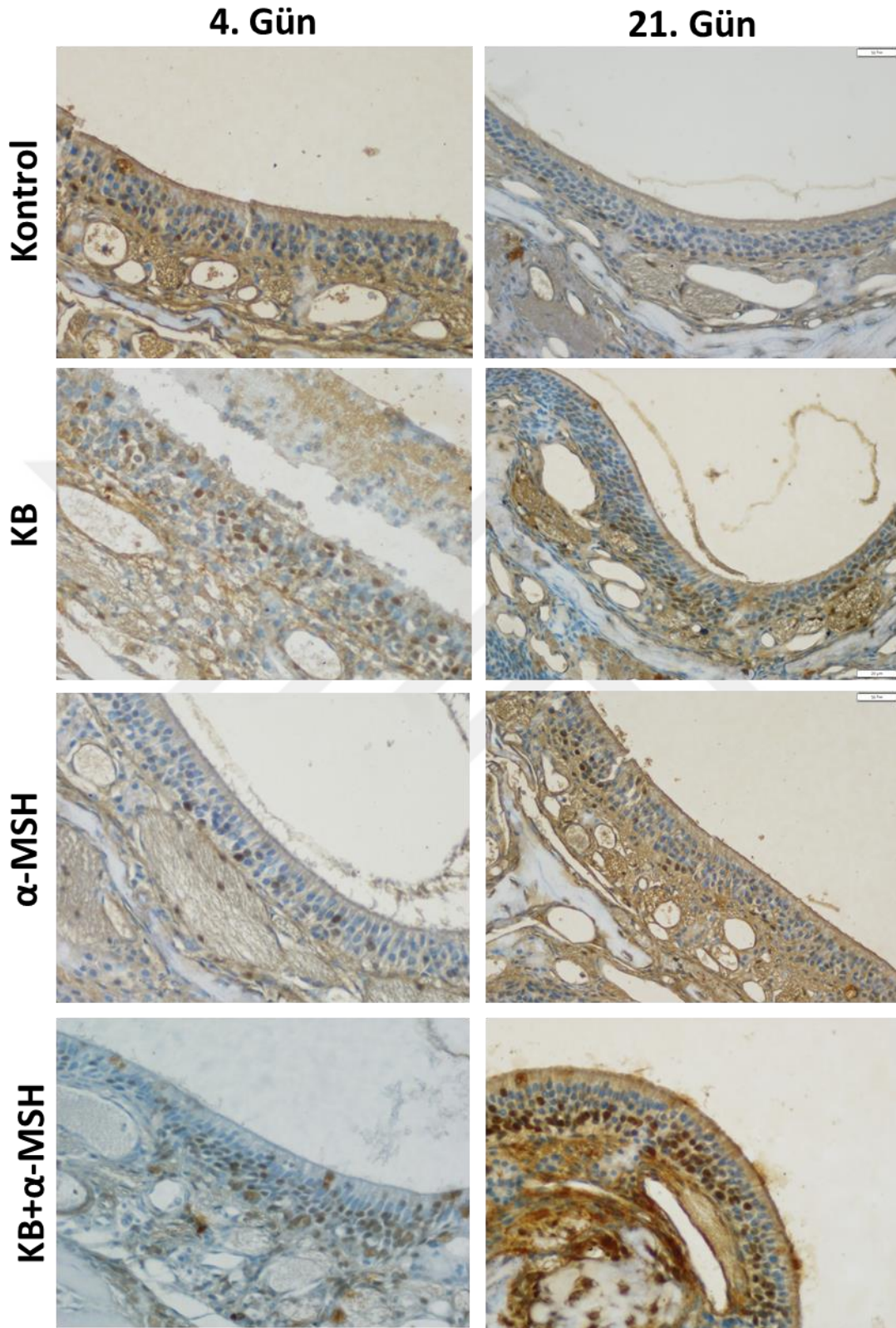
***p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 istatistiksel anlamlılık.**

Olfaktör epitelde olgunlaşmamış nöron göstergesi GAP-43+ immunoreaktivitesi yüzdesel olarak ölçülmüştür. 4. günde KB grubunun GAP-43+ immunoreaktivitesi, kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$). 4. günde KB+α-MSH grubunun GAP-43+ immunoreaktivitesinin KB grubuna göre artış eğiliminde olduğu tespit edilmiştir. 4. günde KB+α-MSH grubunun GAP-43+ immunoreaktivitesinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu saptanmıştır ($p < 0.001$). 21. günde KB grubunun GAP-43+ immunoreaktivitesinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı belirlenmiştir ($p < 0.01$). 21. günde KB+α-MSH grubunun GAP-43+ immunoreaktivitesinin KB grubuna göre yükselme eğiliminde olduğu bulunmuştur. 21. günde KB+α-MSH grubunun GAP-43+ immunoreaktivitesinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu saptanmıştır ($p < 0.001$) (Şekil 4-4, Şekil 4-5).



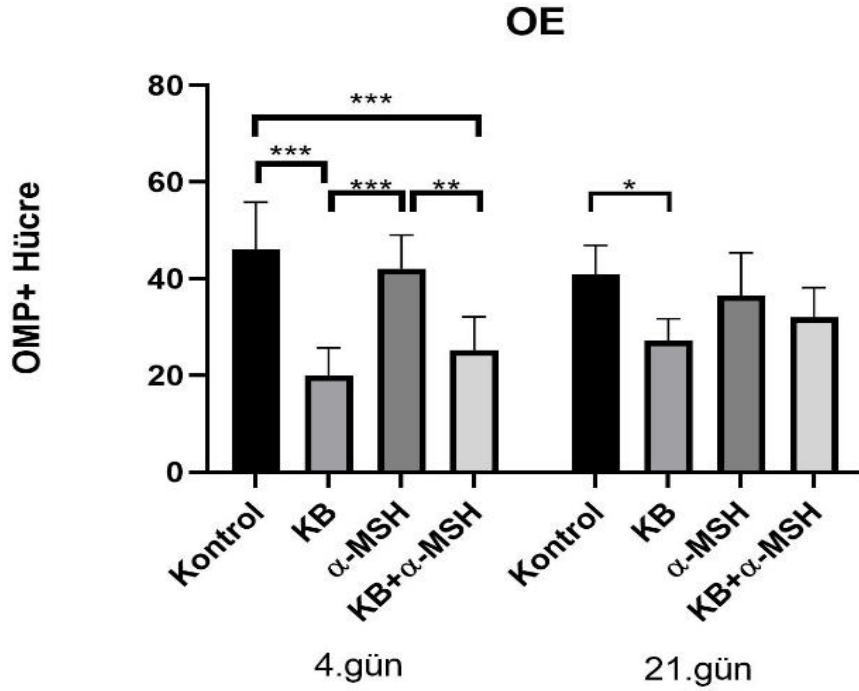
Şekil 4-4: GAP-43+ Hücres grafiği.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ istatistiksel anlamlılık.



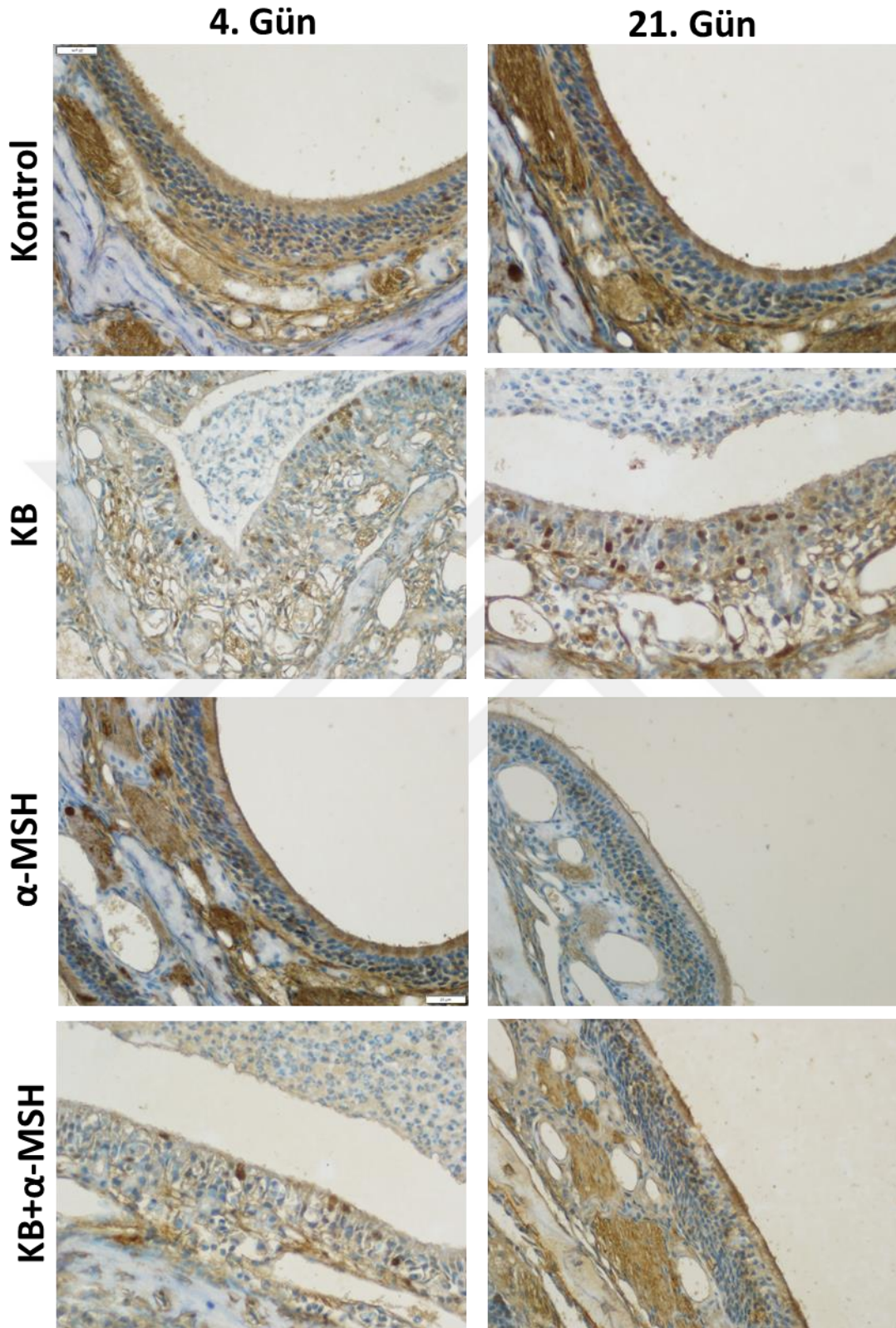
Şekil 4-5: GAP-43+ immunohistokimya görüntüsü.

Olgun nöron belirtici OMP+ immunoreaktivitesi incelendiğinde, 4. günde KB grubunun OMP+ immunoreaktivitesi, kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p < 0.001$). 4. günde KB+ α -MSH grubunun OMP+ immunoreaktivitesinin KB grubuna göre artış eğiliminde olduğu belirlenmiştir. 4. günde KB+ α -MSH grubunun OMP+ immunoreaktivitesinin kontrol grubuna göre düşük olduğu saptanmıştır ($p < 0.001$). 21. günde KB grubunun OMP+ immunoreaktivitesinin kontrol grubuna göre düşük olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). 21. günde KB+ α -MSH grubunun OMP+ immunoreaktivitesinin KB grubuna göre artış eğiliminde olduğu saptanmıştır. 21. günde KB+ α -MSH grubunun OMP+ immunoreaktivitesinin kontrol grubuna göre düşme eğiliminde olduğu belirlenmiştir (Şekil 4-6, Şekil 4-7).



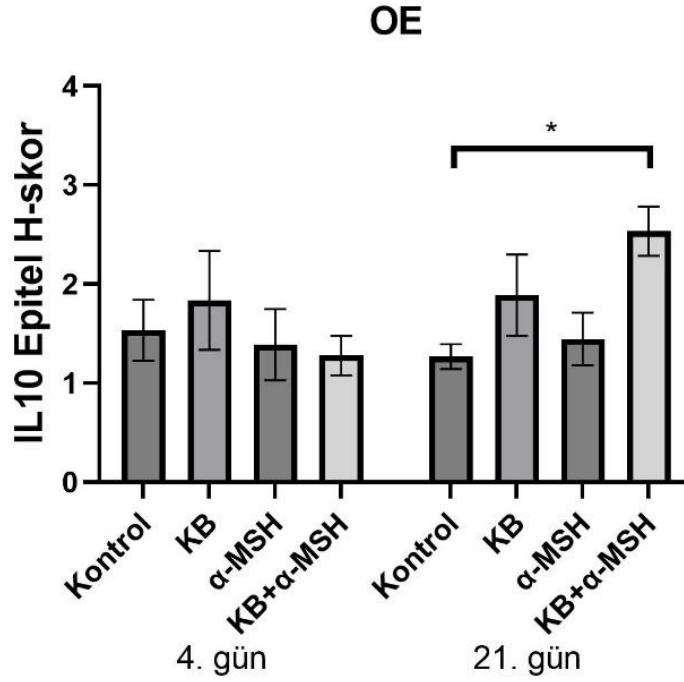
Şekil 4-6: OMP+ Hücre grafiği.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ istatistiksel anlamlılık.



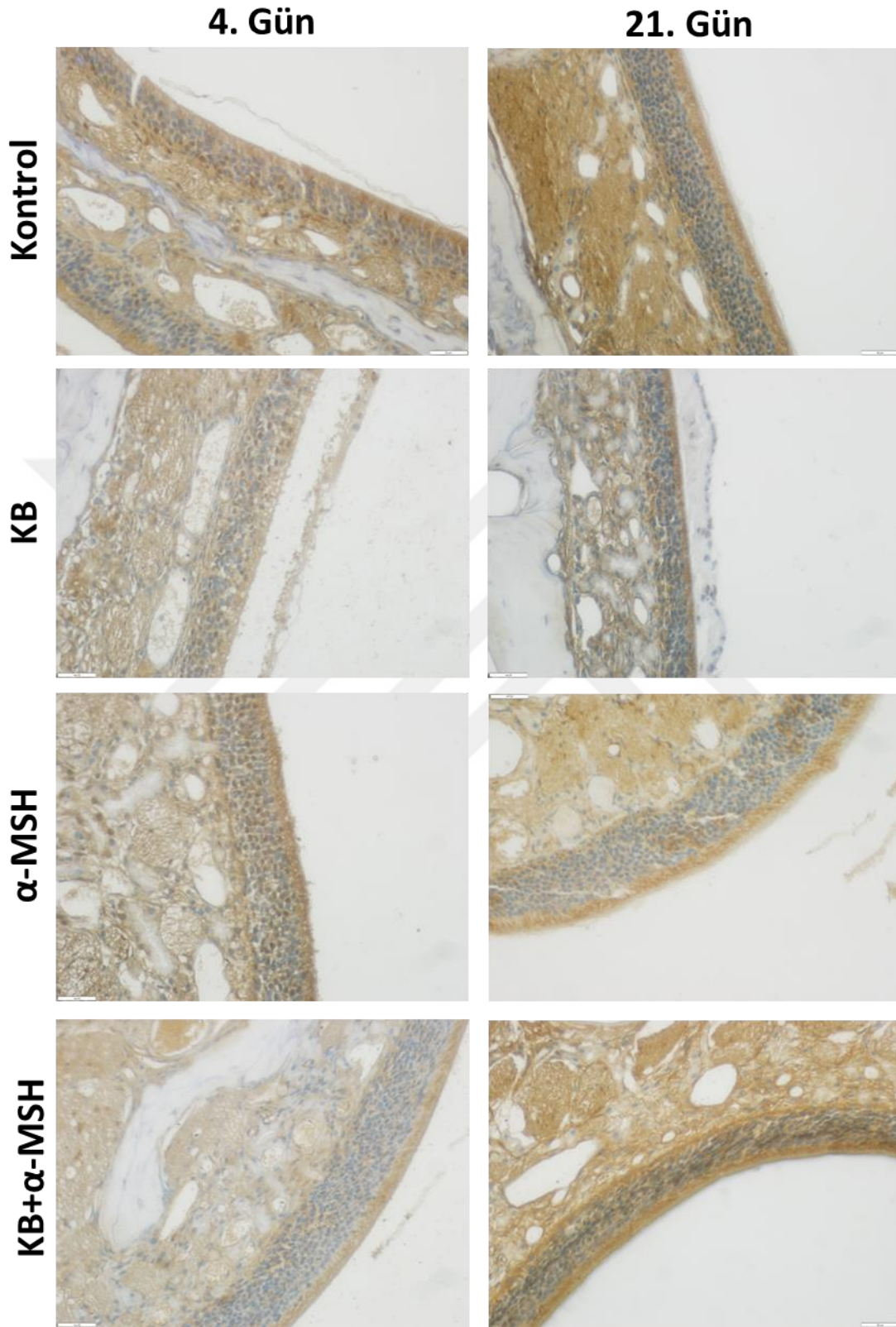
Şekil 4-7: OMP+ immunohistokimya görüntüsü.

Olfaktör epitelde antiinflamatuvar sitokin IL-10+ immunoreaktivitesi incelenmiştir. 4. günde KB grubunun IL-10+ immunoreaktivitesinin kontrol grubuna göre artış eğiliminde olduğu bulunmuştur. 4. günde KB+ α -MSH grubunun IL-10+ immunoreaktivitesinin KB grubuna göre azalma eğiliminde olduğu saptanmıştır. 4. günde KB+ α -MSH grubunun IL-10+ immunoreaktivitesinin kontrol grubuna göre de düşme eğiliminde olduğu bulunmuştur. 21. günde KB grubunun IL-10+ immunoreaktivitesinin kontrol grubuna göre artış eğiliminde olduğu tespit edilmiştir. 21. günde KB+ α -MSH grubunun IL-10+ immunoreaktivitesinin KB grubuna göre yükselme eğiliminde olduğu saptanmıştır. 21. günde KB+ α -MSH grubunun IL-10+ immunoreaktivitesinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$) (Şekil 4-8, Şekil 4-9).



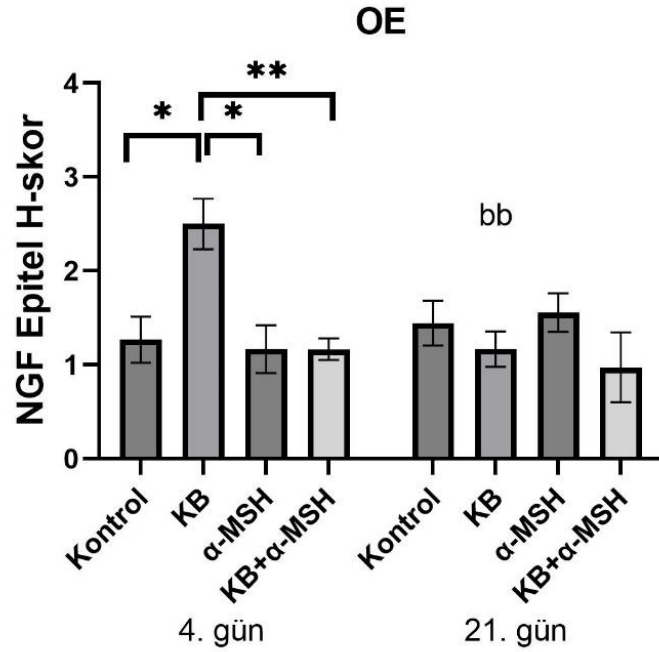
Şekil 4-8: IL-10+ H-skor grafiği.

*** $p < 0.05$, istatistiksel anlamlılık.**



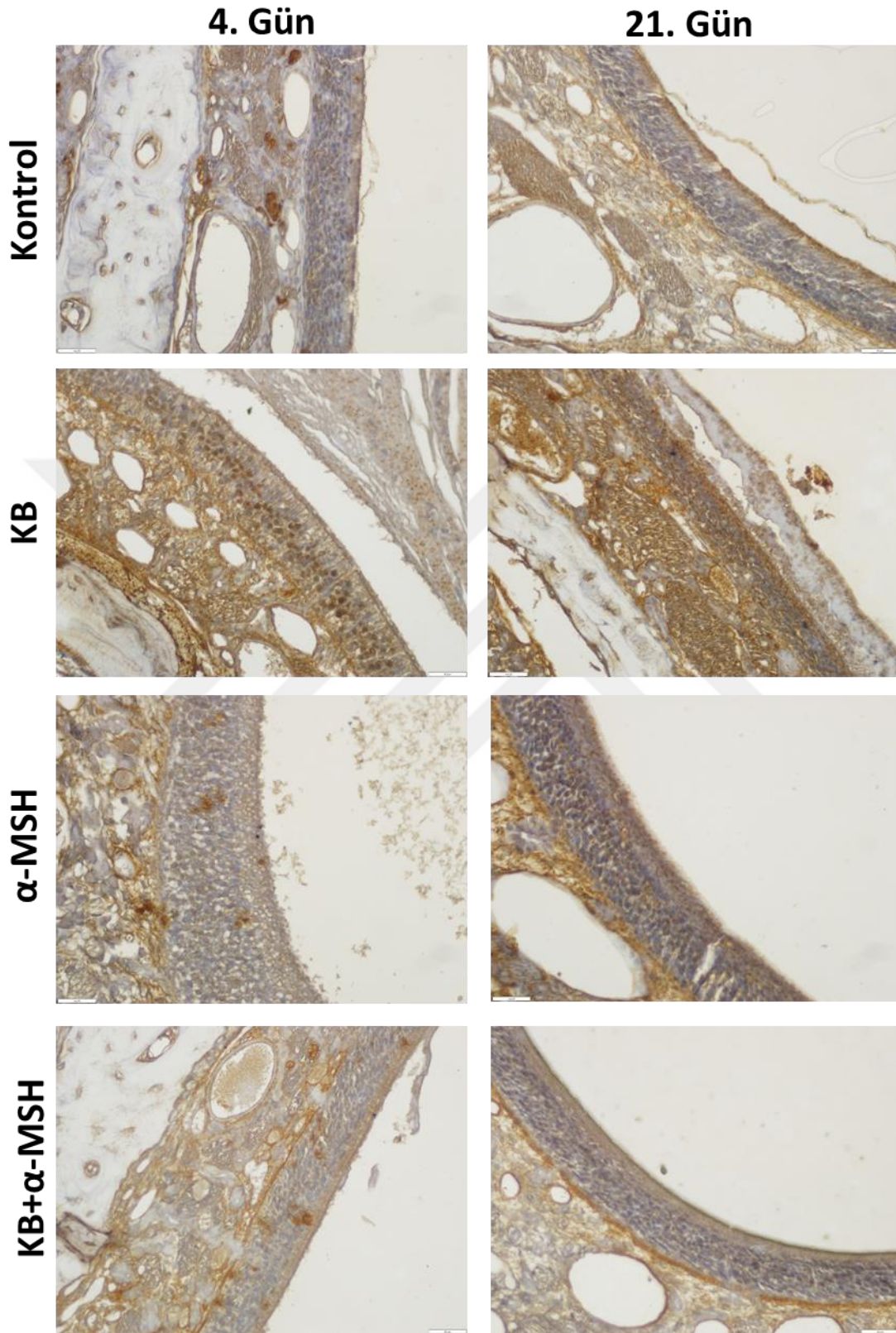
Şekil 4-9: IL-10+ immunohistokimya görüntüsü.

Olfaktör epiteldeki sinir büyüme faktörü NGF+ immunoreaktivitesi incelendiğinde; 4. günde KB grubunun NGF+ immunoreaktivitesinin, kontrol grubuna göre yüksek olduğu bulunmuştur ($p < 0.05$). 4. günde KB+ α -MSH grubunun NGF+ immunoreaktivitesi, KB grubuna göre düşük bulunmuştur ($p < 0.01$). 4. günde KB+ α -MSH grubunun NGF+ immunoreaktivitesi, kontrol grubuna göre değişiklik göstermemiştir. 21. günde KB grubunun NGF+ immunoreaktivitesinin kontrol grubuna göre düşme eğiliminde olduğu bulunmuştur. Ayrıca 21. günde KB grubunun NGF+ immunoreaktivitesinin 4. günde KB grubunun NGF+ immunoreaktivitesinden düşük olduğu belirlenmiştir ($p < 0.01$). 21. günde KB+ α -MSH grubunun NGF+ immunoreaktivitesinin KB grubuna göre azalma eğiliminde olduğu bulunmuştur. 21. günde KB+ α -MSH grubunun NGF+ immunoreaktivitesinin kontrol grubuna göre de düşme eğiliminde olduğu saptanmıştır (Şekil 4-10, Şekil 4-11).



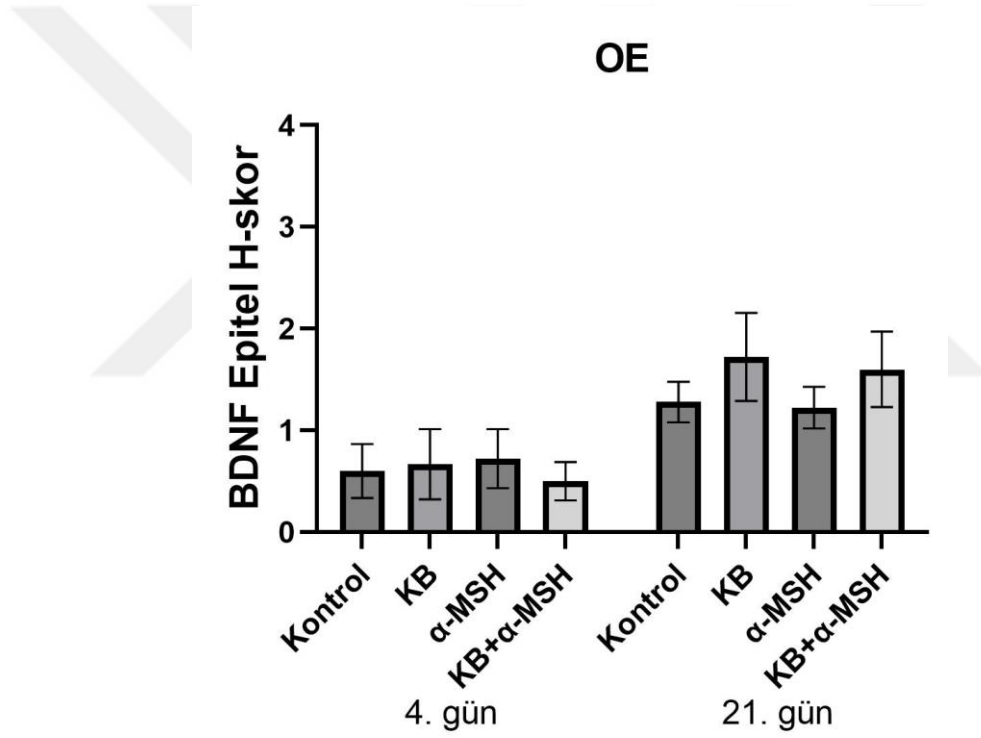
Şekil 4-10: NGF+ H-skor grafiği.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ve ^{bb} $p < 0.01$ istatistiksel anlamlılık.

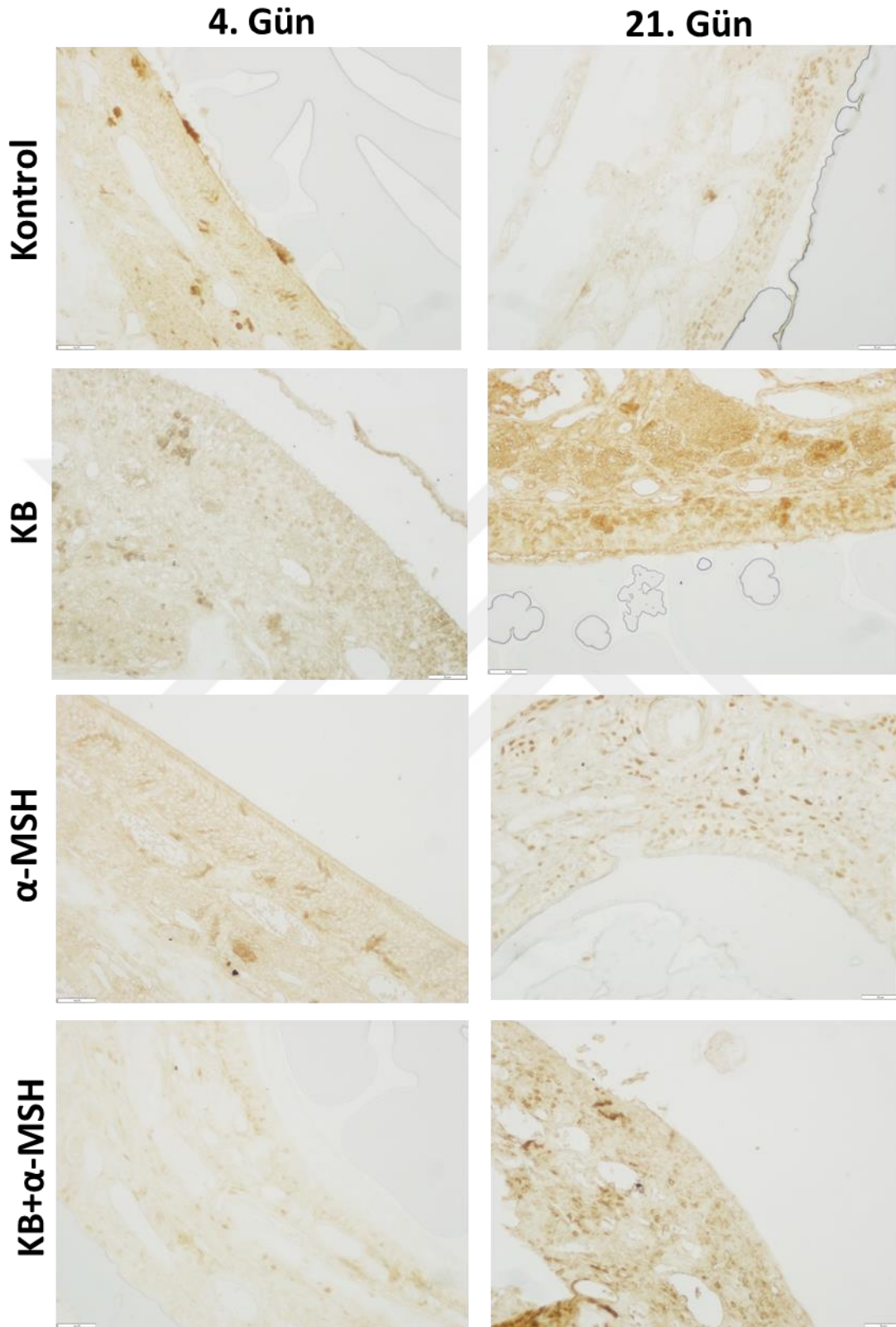


Şekil 4-11: NGF+ immunohistokimya görüntüsü.

Çalışmamızda büyüme faktörlerinden BDNF'nin de olfaktör epiteldeki immunoreaktivitesi araştırılmıştır. 4. günde gruplar arasında anlamlı değişim saptanmamıştır. Ancak 4. günde KB+ α -MSH grubunun BDNF+ immunoreaktivitesinin KB grubuna göre düşme eğiliminde olduğu bulunmuştur. 4. günde KB+ α -MSH grubunun BDNF+ immunoreaktivitesinin kontrol grubuna göre de düşme eğiliminde olduğu tespit edilmiştir. 21. günde KB grubunun BDNF+ immunoreaktivitesinin kontrol grubuna göre artış eğiliminde olduğu bulunmuştur. 21. günde KB+ α -MSH grubunun BDNF+ immunoreaktivitesinin KB grubuna göre düşme eğiliminde olduğu belirlenmiştir. Ancak 21. günde KB+ α -MSH grubunun BDNF+ immunoreaktivitesinin kontrol grubuna göre yükselme eğiliminde olduğu saptanmıştır (Şekil 4-12, Şekil 4-13).



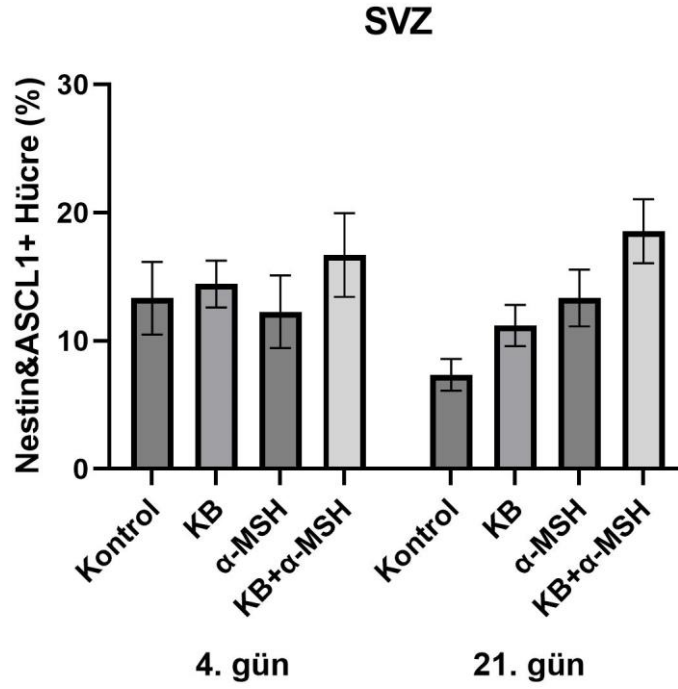
Şekil 4-12: BDNF+ H-skoru grafiği.



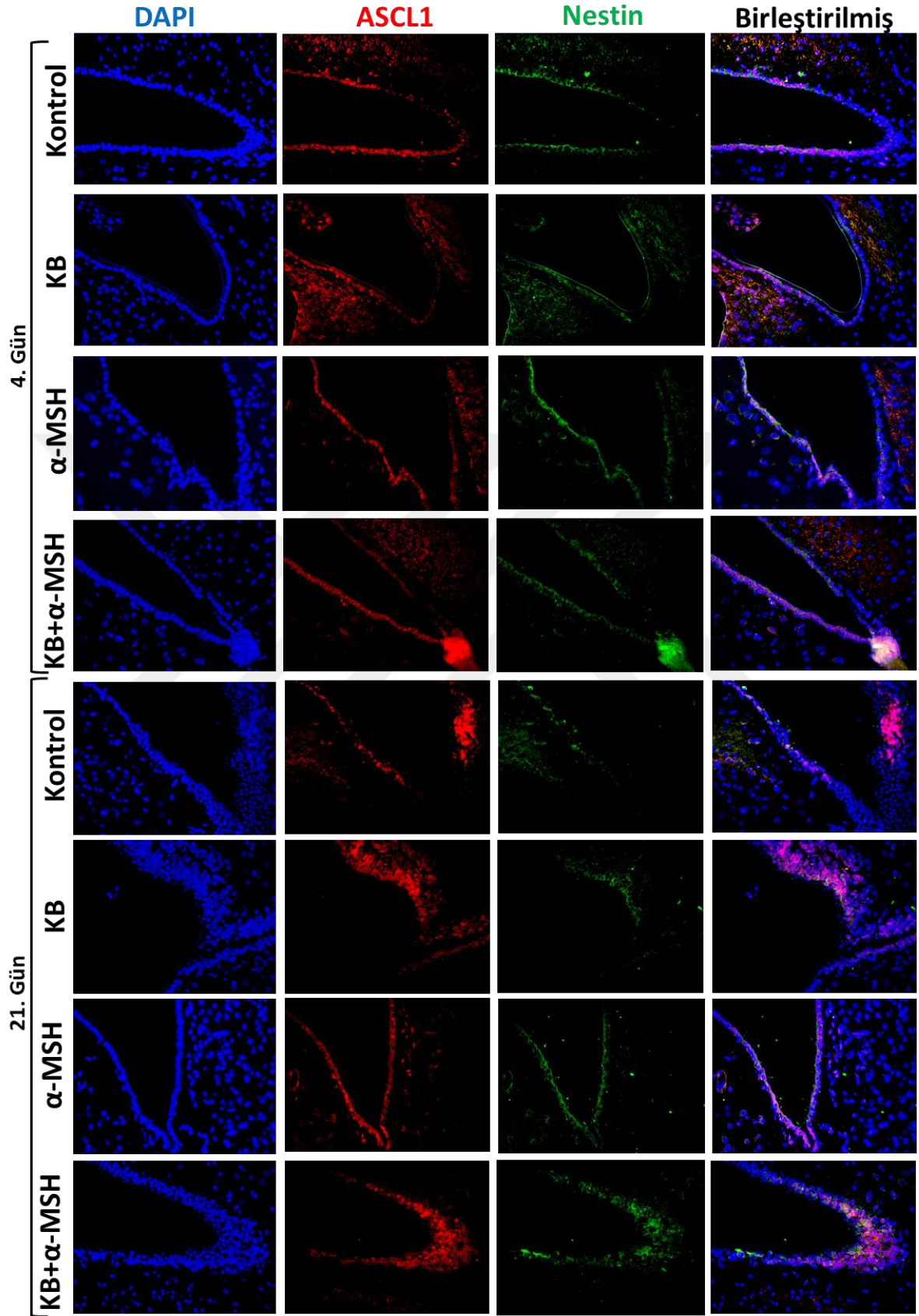
Şekil 4-13: BDNF+ immunohistokimya görüntüsü.

4.1.2. Subventriküler Alan ve Olfaktör Bulbus Bulguları

SVZ'deki kök hücre belirteci Nestin ve ara progenitör hücre göstergesi ASCL1 antikoru çift boyama ile işaretlenmiştir. 4. günde Nestin/ASCL1+ immunoreaktivitesinin KB grubunda kontrol grubuna göre, KB+ α -MSH grubunda KB grubuna göre, KB+ α -MSH grubunda kontrol grubuna göre yükselme eğiliminde olduğu belirlenmiştir. 21. günde de ilgili gruplar arasında benzer bulgular saptanmıştır (Şekil 4-14, Şekil 4-15).

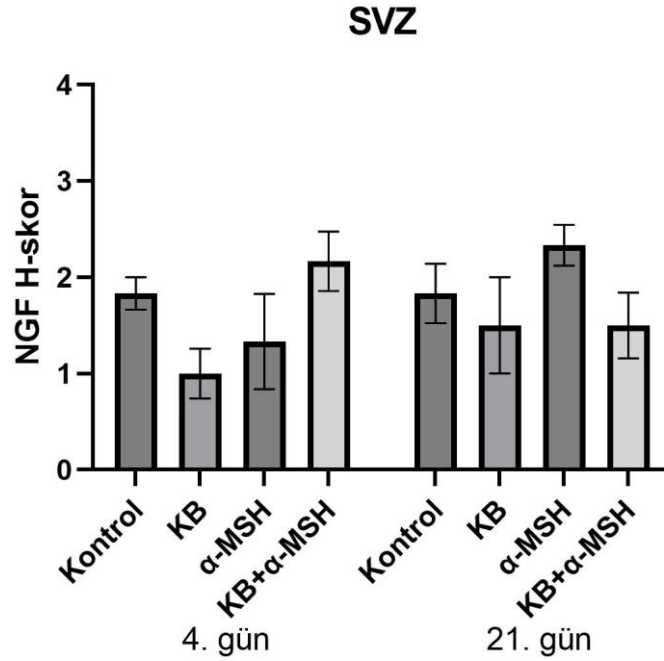


Şekil 4-14: Nestin/ASCL1+ Hücre grafiği.

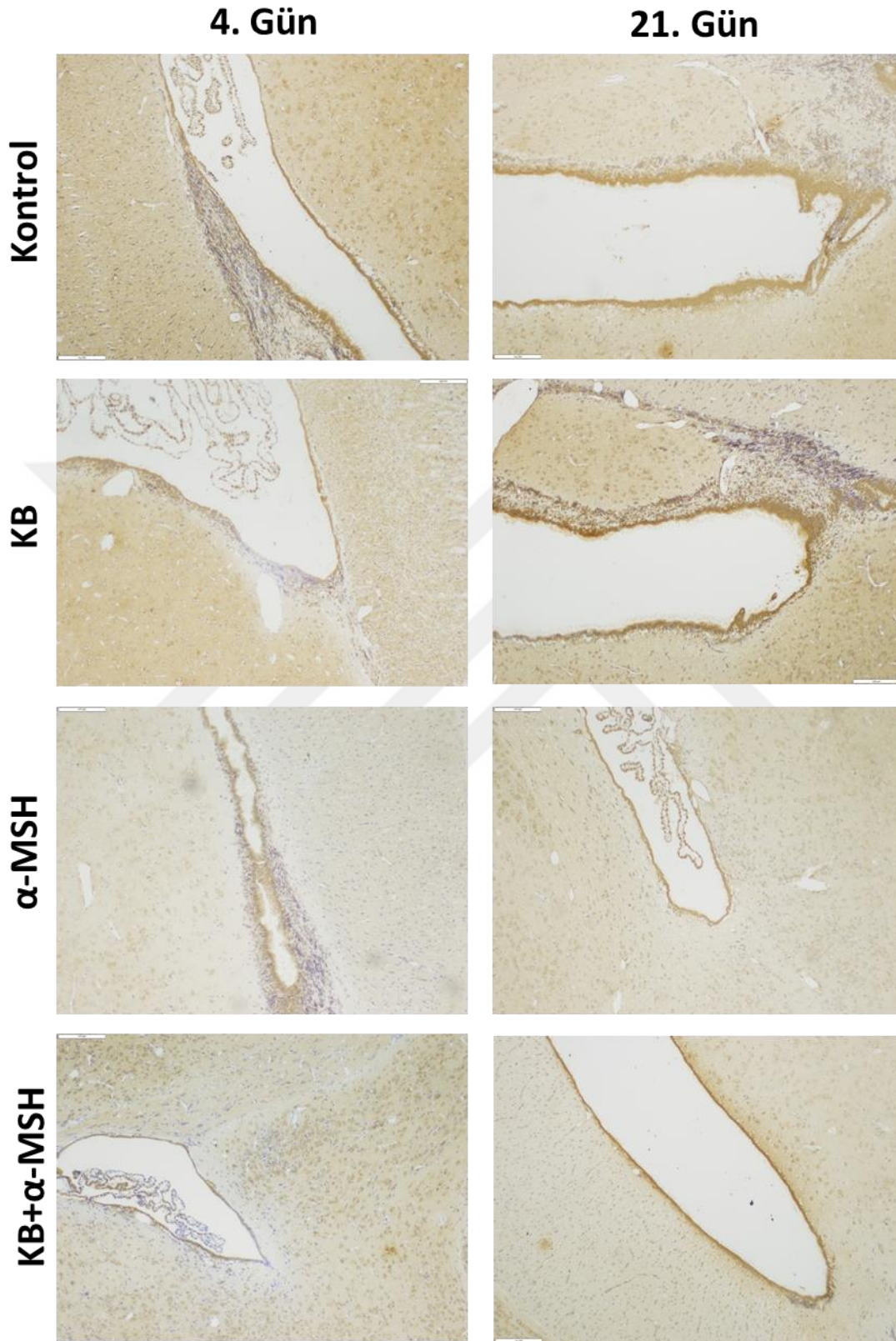


Şekil 4-15: Nestin/ASCL1+ çift boyama immunofloresan görüntüsü.

SVZ’de NGF immunoreaktivitesi incelendiğinde, 4. günde KB grubunun NGF+ immunoreaktivitesinin kontrol grubuna göre düşme eğilimi gösterdiği tespit edilmiştir. 4. günde KB+ α -MSH grubunun NGF+ immunoreaktivitesi KB grubuna göre, KB+ α -MSH grubunun NGF+ immunoreaktivitesinin ise kontrol grubuna göre artma eğiliminde olduğu belirlenmiştir. 21. günde KB grubunun NGF+ immunoreaktivitesinin kontrol grubuna göre düşme eğiliminde olduğu saptanmıştır. 21. günde KB+ α -MSH grubunun NGF+ immunoreaktivitesi, KB grubuna göre değişim göstermemiştir. 21. günde KB+ α -MSH grubunun NGF+ immunoreaktivitesinin ise kontrol grubuna göre azalma eğiliminde olduğu saptanmıştır (Şekil 4-16, Şekil 4-17).

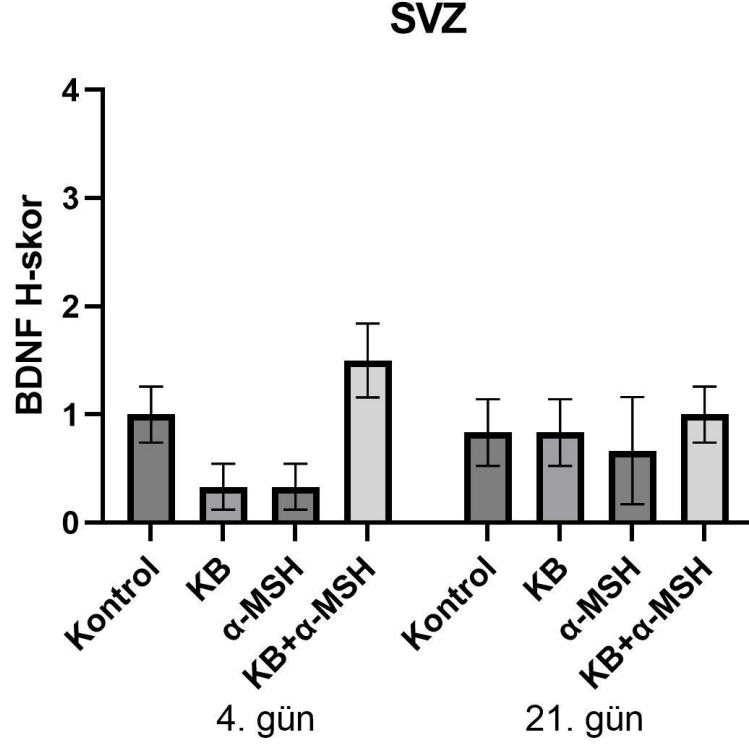


Şekil 4-16: SVZ - NGF+ H-skoru grafiği.

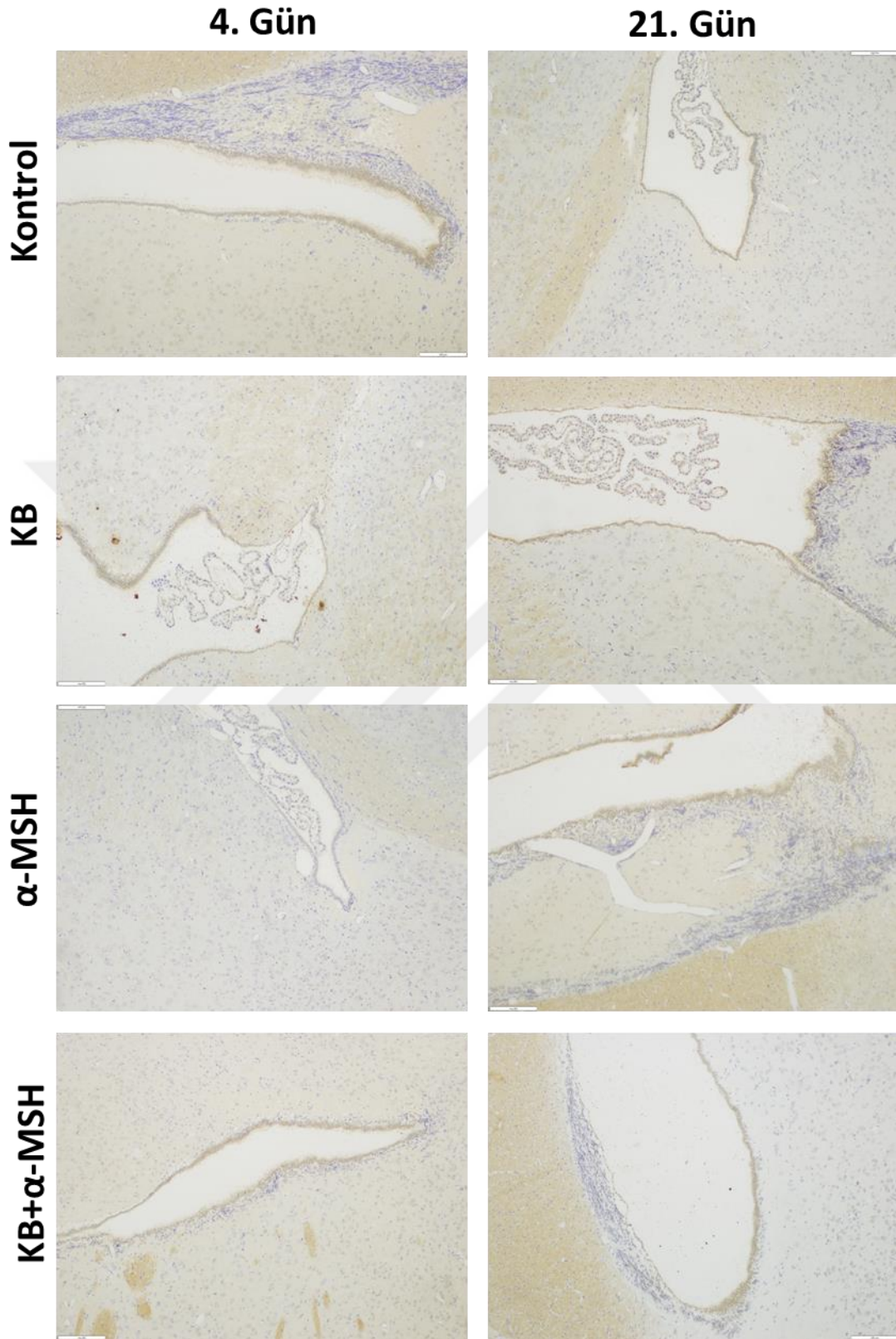


Şekil 4-17: SVZ - NGF+ immunohistokimya görüntüsü.

SVZ’de 4. günde BDNF+ immunoreaktivitesi KB grubunda kontrol grubuna göre düşme eğilimi göstermiştir. 4. günde KB+ α -MSH grubunun BDNF+ immunoreaktivitesi KB grubuna göre, KB+ α -MSH grubunun BDNF+ immunoreaktivitesi ise kontrol grubuna göre artma eğilimi göstermiştir. 21. günde gruplar arasında değişimin olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4-18, Şekil 4-19).

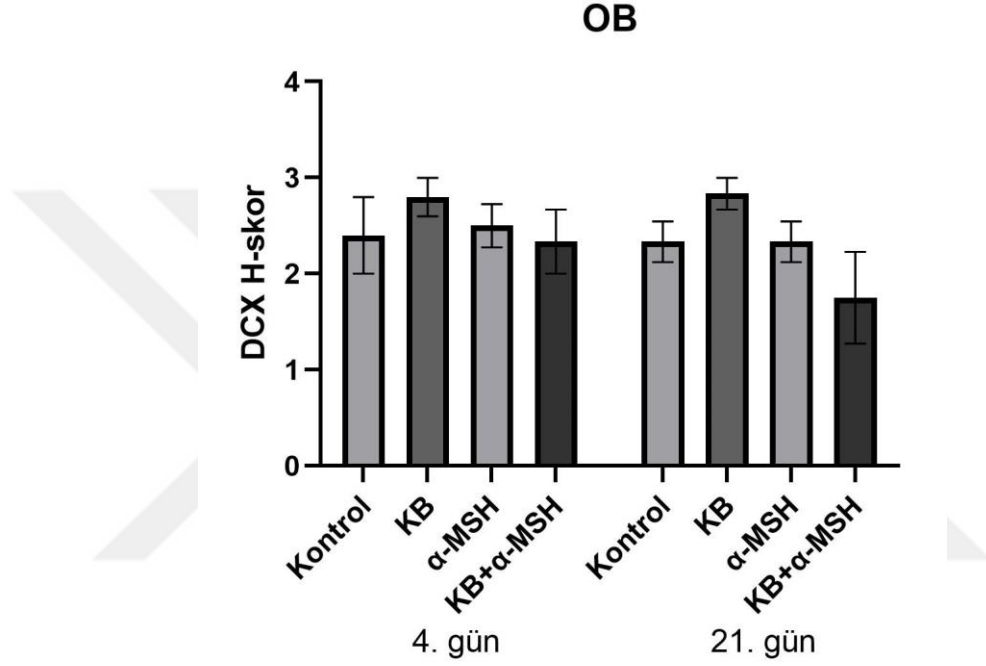


Şekil 4-18: SVZ - BDNF+ H-skoru grafiği.

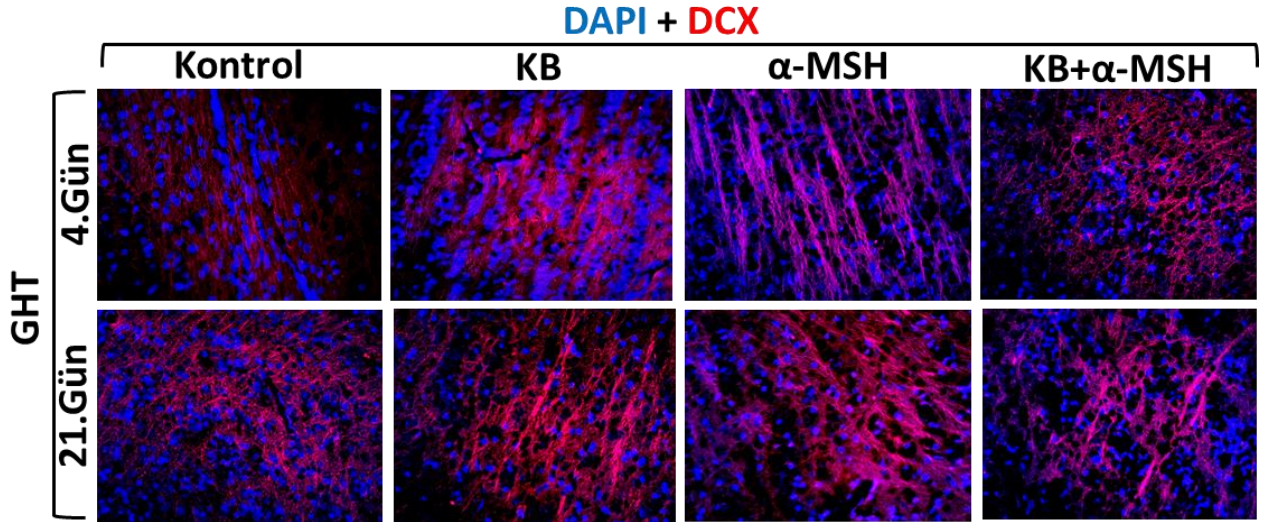


Şekil 4-19: SVZ - BDNF+ immunohistokimya görüntüsü.

Olfaktör bulbusta olgunlaşmamış nöron göstergesi olarak DCX+ immunoreaktivitesi incelenmiştir. 4. günde KB grubunun DCX+ immunoreaktivitesinin kontrol grubuna göre artış eğilimi gösterdiği belirlenmiştir. 4. günde KB+ α -MSH grubunun DCX+ immunoreaktivitesinin KB grubuna göre, KB+ α -MSH grubunun DCX+ immunoreaktivitesinin ise kontrol grubuna göre düşme eğiliminde olduğu saptanmıştır. 21. günde de ilgili gruplar arasında benzer değişimler tespit edilmiştir. (Şekil 4-20, Şekil 4-21).

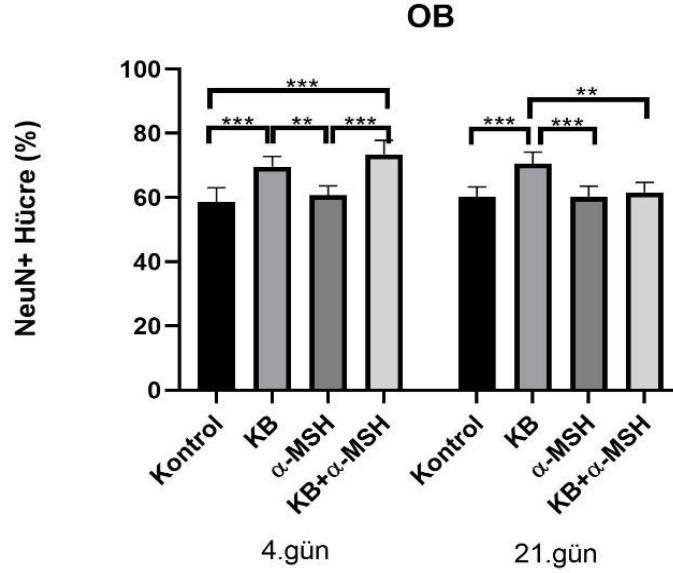


Şekil 4-20: OB - DCX+ H-skoru grafiği.



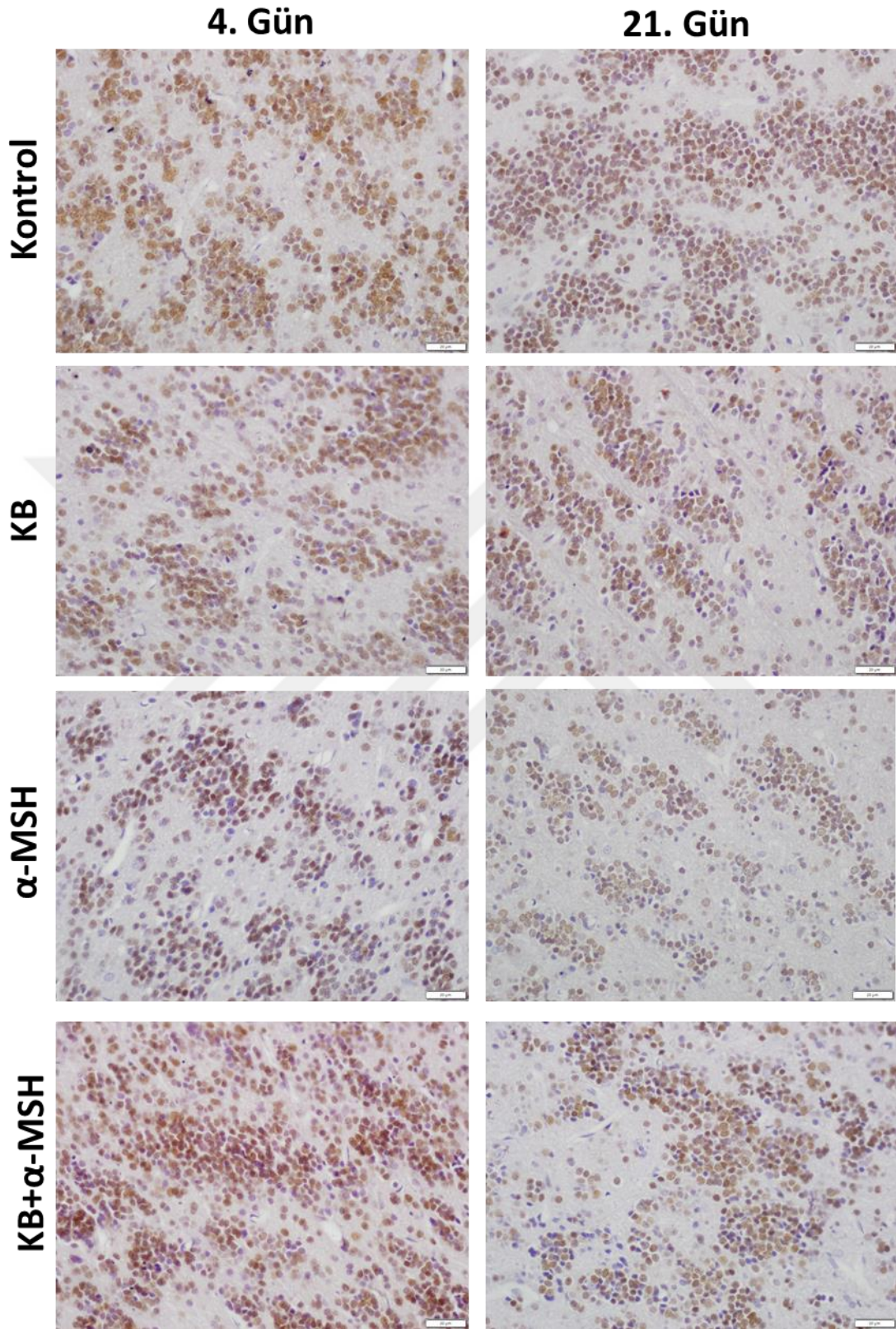
Şekil 4-21: OB - DCX+ immunofloresan görüntüsü.

Olfaktör bulbusta olgun nöron belirteci NeuN+ immunoreaktivitesi yüzdesel olarak incelenmiştir. 4. günde KB grubunun NeuN+ immunoreaktivitesinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu belirlenmiştir ($p < 0.001$). KB+ α -MSH grubunun NeuN+ immunoreaktivitesi KB grubuna göre değişim göstermemiştir. KB+ α -MSH grubunun NeuN+ immunoreaktivitesinin kontrol grubuna göre arttığı saptanmıştır ($p < 0.001$). 21. günde KB grubunun NeuN+ immunoreaktivitesinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu belirlenmiştir ($p < 0.001$). KB+ α -MSH grubunun NeuN+ immunoreaktivitesinin KB grubuna göre düşük olduğu saptanmıştır ($p < 0.01$). KB+ α -MSH grubunun NeuN+ immunoreaktivitesinde, kontrol grubuna göre fark bulunmamıştır (Şekil 4-22, Şekil 4-23).



Şekil 4-22: NeuN+ Hücre grafiği.

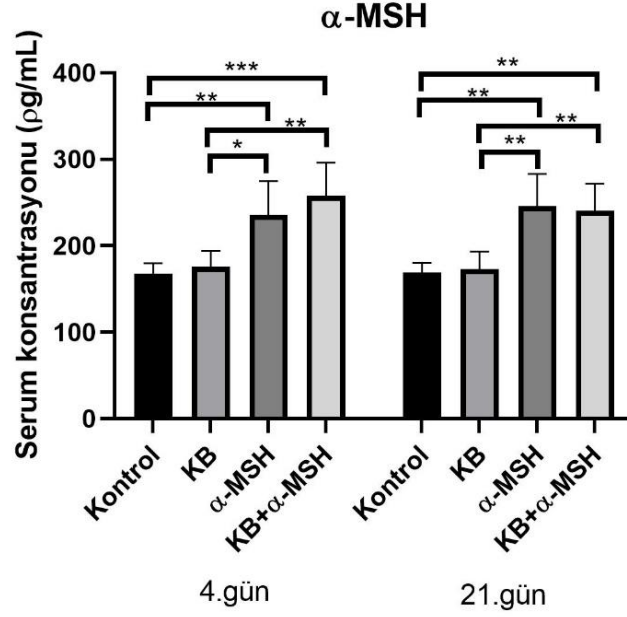
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ istatistiksel anlamlılık.



Şekil 4-23: NeuN+ immunohistokimya görüntüsü.

4.2. BİYOKİMYASAL BULGULAR

α -MSH konsantrasyonları gruplar arasında karşılaştırıldığında; 4. ve 21. günlerde α -MSH grubunda kontrol grubuna göre, KB+ α -MSH grubunda KB grubuna göre, KB+ α -MSH grubunda kontrol grubuna göre yüksek değerler gösterdiği saptanmıştır (4. gün; $p < 0.01$, $p < 0.001$, 21. gün; $p < 0.01$). (Şekil 4-24).



Şekil 4-24: α -MSH serum konsantrasyon grafiği.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ istatistiksel anlamlılık.

4.3. KOKU TESTLERİ BULGULARI

4.3.1. Gömülü Gıda Testi

Gömülü gıda testi gruplar arasında fark ve zamansal değişim açısından değerlendirilmiştir. Deneye başlanmadan önce yapılan T0 testinde gruplar arasında istatistiksel fark bulunmamıştır. Burun içi çinko sülfat/salin uygulamasından sonra gömülü gıda testi tekrarlanmıştır (T1).

T1 testinde; KB (4.gün) grubundaki sıçanların gömülü gıdayı bulma süresi, kontrol (4.gün) grubundaki sıçanlara göre yüksek bulunmuştur ($p < 0.01$). KB+ α -MSH (4.gün) grubunun gömülü gıda testini tamamlama süresi, KB (4.gün) grubuna göre değişiklik

göstermemiştir. KB+ α -MSH (4.gün) grubundaki sıçanlar, kontrol (4.gün) grubundaki sıçanlara göre daha uzun sürede gömülü gıdaya ulaşmıştır ($p < 0.05$). KB (21.gün) grubunun gömülü gıda testini tamamlama süresinin kontrol (21.gün) grubuna göre yüksek olduğu bulunmuştur ($p < 0.001$). KB+ α -MSH (21.gün) grubundaki sıçanların gömülü gıdayı bulma süresinin KB (21.gün) grubundaki sıçanlara göre değişiklik göstermediği belirlenmiştir. KB+ α -MSH (21.gün) grubundaki sıçanların gömülü gıdayı bulma süresinin kontrol (21gün) grubuna göre yüksek olduğu saptanmıştır ($p < 0.01$).

T2 testinde; KB (4.gün) grubunun gömülü gıda testini tamamlama süresinin kontrol (4.gün) grubuna göre yüksek olduğu bulunmuştur ($p < 0.05$). KB+ α -MSH (4.gün) grubunun gömülü gıda testini tamamlama süresi KB (4.gün) grubuna göre azalma eğilimi göstermiştir. KB+ α -MSH (4.gün) grubundaki sıçanların gömülü gıdayı bulma süresi, kontrol (4.gün) grubundaki sıçanların gömülü gıdayı bulma sürelerine yaklaştığı, gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir. KB (21.gün) grubundaki sıçanların gömülü gıdayı bulma sürelerinin kontrol (21.gün) grubuna göre yüksek olduğu ancak istatistiksel olarak anlamlı fark görülmediği belirlenmiştir. KB+ α -MSH (21.gün) grubunun gömülü gıda testini tamamlama süresinin KB (21.gün) grubuna göre azalma eğiliminde olduğu saptanmıştır. KB+ α -MSH (21.gün) grubundaki sıçanların gömülü gıdayı bulma sürelerinin, kontrol (21.gün) grubundaki sıçanlara göre anlamlı değişim göstermediği belirlenmiştir. (Şekil 4-25).

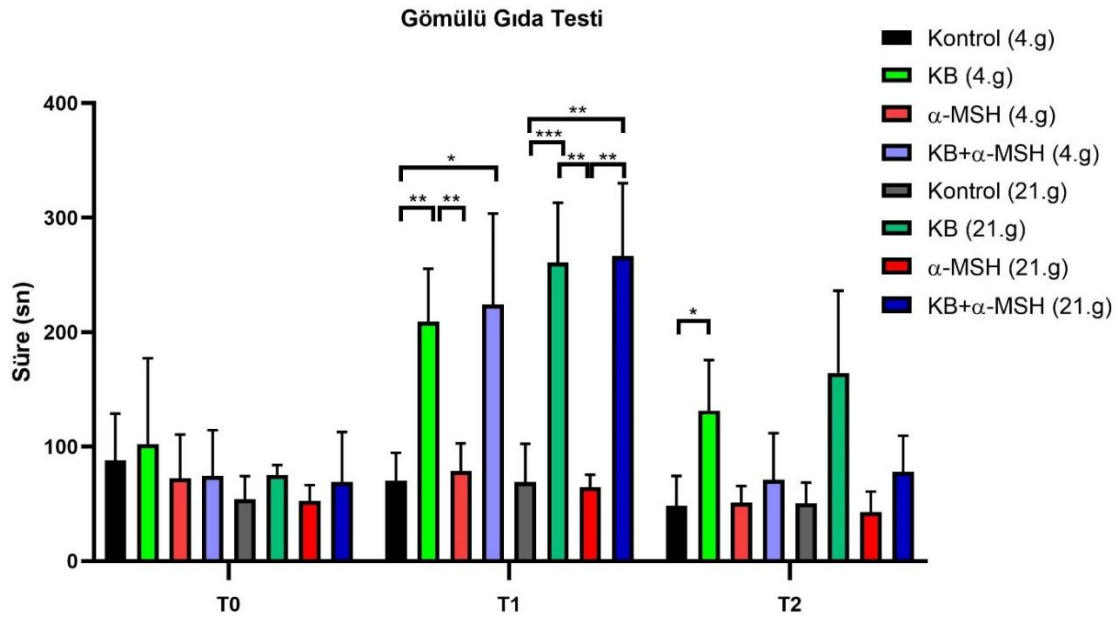
Gömülü gıda testinde, grup içi zamansal değişim de incelenmiştir.

KB (4.gün) grubunda; T1 testi, T0 ve T2 testlerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur (sırasıyla; $p < 0.01$ ve $p < 0.001$).

KB+ α -MSH (4.gün) grubunda; T1 testi, T0 ve T2 testlerine göre anlamlı derecede daha yüksek olduğu saptanmıştır ($p < 0.01$).

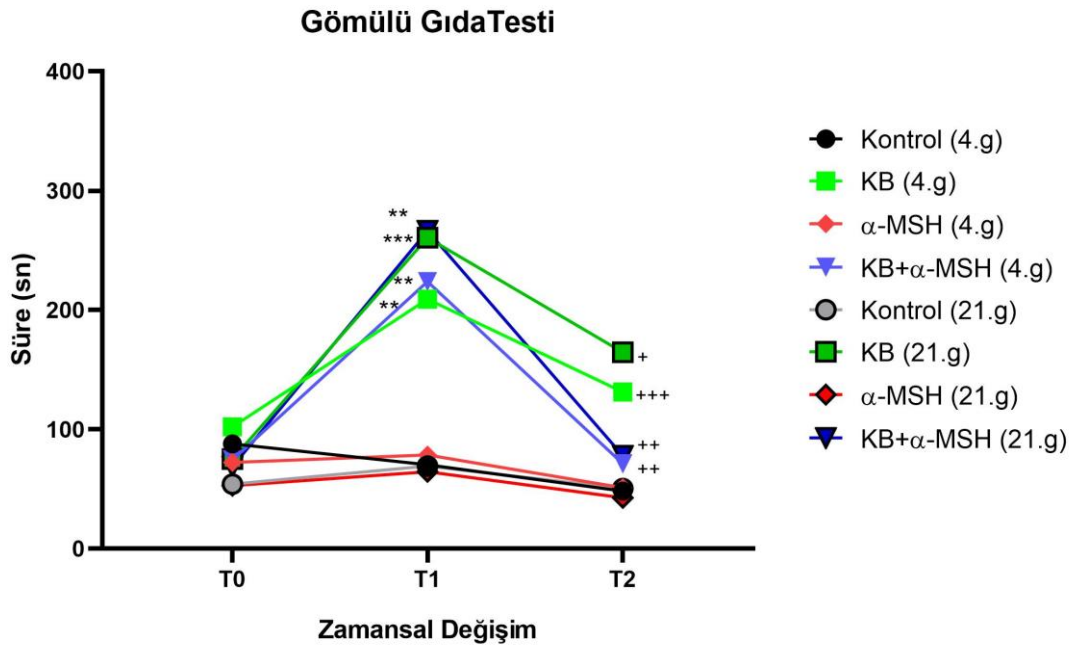
KB (21.gün) grubunda; T1 testi, T0 ve T2 testlerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur (sırasıyla; $p < 0.001$ ve $p < 0.05$).

KB+ α -MSH (21.gün) grubunda; T1 testi, T0 ve T2 testlerine göre anlamlı derecede daha yüksek olduğu saptanmıştır ($p < 0.01$) (Şekil 4-26).



Şekil 4-25: Gömülü Gıda Testi gruplar arası değerlendirme.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ istatistiksel anlamlılık.



Şekil 4-26: Gömülü Gıda Testi zamansal değişim.

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ T0 testine göre istatistiksel anlamlılık; + $p < 0.5$, ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$ T1 testine göre istatistiksel anlamlılık.

4.3.2. Koku Ayırım Testi

Koku ayırım testinde, Ayırım Testi İndeksi (tanıdık koku – yabancı koku) / (tanıdık koku + yabancı koku) * 100 formülü ile hesaplanmıştır. Koku ayırım testinde gruplar arası fark araştırılmıştır.

T0 testinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

T1 testinde; KB (4.gün) grubunun Ayırım Testi İndeksi, kontrol (4.gün) grubuna göre düşük bulunmuştur ($p < 0.05$). KB+ α -MSH (4.gün) grubunun Ayırım Testi İndeksi, KB (4.gün) grubuna göre değişiklik bulunmamıştır. KB+ α -MSH (4.gün) grubunun Ayırım Testi İndeksi, kontrol (4.gün) grubuna göre düşük olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$). KB (21.gün) grubunun Ayırım Testi İndeksi, kontrol (21.gün) grubuna göre düşük olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). KB+ α -MSH (21.gün) grubunun Ayırım Testi İndeksi, KB (21.gün) grubuna göre değişiklik gözlenmemiştir. KB+ α -MSH (21.gün) grubunun Ayırım Testi İndeksi, kontrol (21.gün) grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu bulunmuştur ($p < 0.01$).

T2 testinde; KB (4.gün) grubunun Ayırım Testi İndeksi, kontrol (4.gün) grubuna göre düşük olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). KB+ α -MSH (4.gün) grubunun Ayırım Testi İndeksi, KB (4.gün) grubuna göre değişiklik saptanmamıştır. KB+ α -MSH (4.gün) grubunun Ayırım Testi İndeksi, kontrol (4.gün) grubuna göre düşük olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$). KB (21.gün) grubunun Ayırım Testi İndeksi, kontrol (21.gün) grubuna göre düşme eğiliminde olmasına rağmen anlamlı fark bulunmamıştır. KB+ α -MSH (21gün) grubunun Ayırım Testi İndeksi, KB (21.gün) grubuna göre artış eğilimi göstererek kontrol (21.gün) grubuna yaklaşmıştır. Ayrıca KB+ α -MSH (21.gün) grubunun Ayırım Testi İndeksi, KB+ α -MSH (4.gün) grubuna göre istatistiksel olarak yüksek olduğu bulunmuştur ($p < 0.05$) (Şekil 4-27).

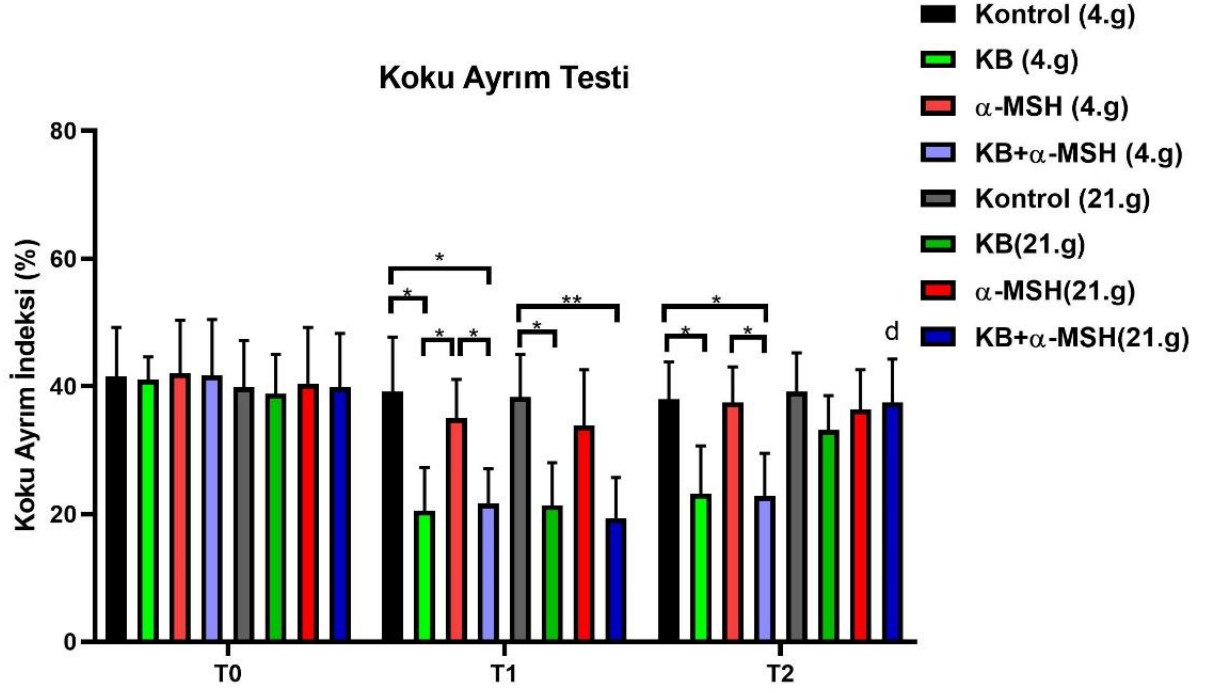
Koku ayırım testinde grup içi zamansal değişim de incelenmiştir.

KB (4.gün) grubunda; T0 ile T1 ve T0 ile T2 testleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.001$).

KB+ α -MSH (4.gün) grubunda; T0 ile T1 ve T0 ile T2 testleri arasında anlamlı derecede fark saptanmıştır ($p < 0.001$).

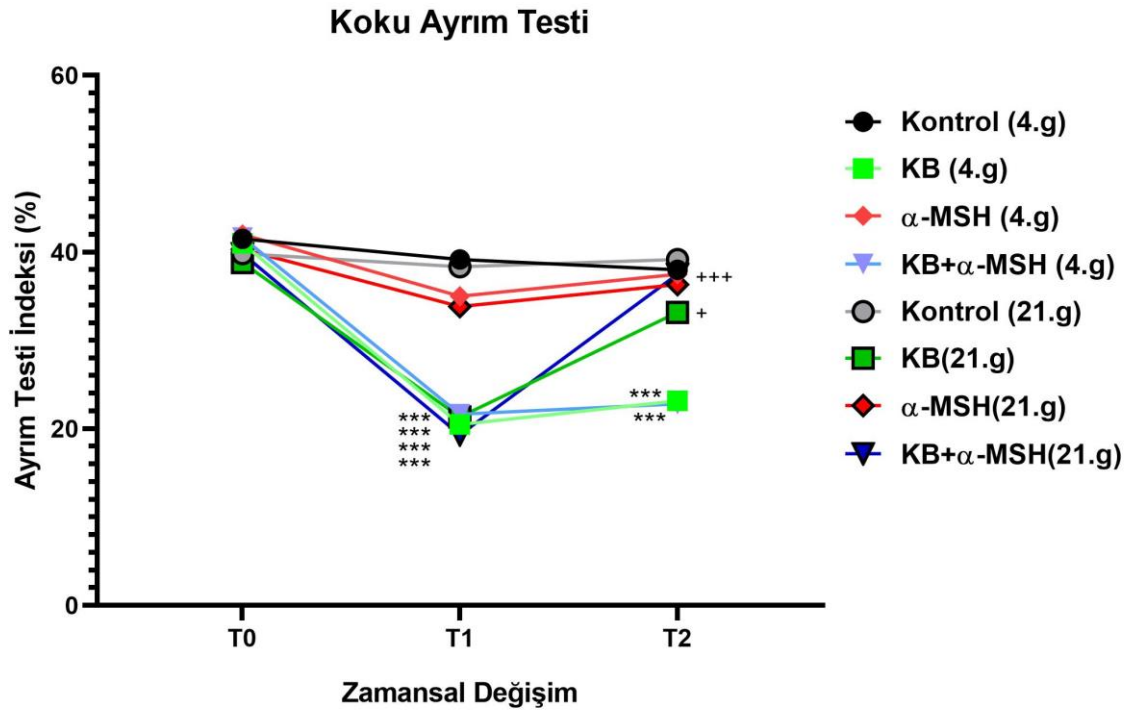
KB (21.gün) grubunda; T0 ile T1 ve T1 ile T2 testleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (sırasıyla; $p < 0.001$ ve $p < 0.05$).

KB+ α -MSH (21.gün) grubunda; T0 ile T1 ve T1 ile T2 testleri arasında anlamlı derecede fark saptanmıştır ($p < 0.001$) (Şekil 4-28).



Şekil 4-27: Koku Ayırım Testi gruplar arası değerlendirme.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ istatistiksel anlamlılık; ^d $p < 0.05$ T2 testinde KB+ α -MSH (4. g) grubuna göre anlamlılık.



Şekil 4-28: Koku Ayrım Testi zamansal değişim.

*** $p < 0.001$ T0 testine göre istatistiksel anlamlılık; + $p < 0.5$, *** $p < 0.001$ T1 testine göre istatistiksel anlamlılık.

5. TARTIŞMA

Koku Bozukluğunda α -MSH Tedavisinin Olfaktör Epiteldeki Etkilerinin Araştırılması

Araştırmamızda koku bozukluğu modeli oluşturmak amacıyla sıçanlara burun içi uyguladığımız çinko sülfat, irritan bir maddedir ve OE'ye hasar vermektedir [110]. Çalışmamızda OE hasarını gösterebilmek amacıyla sıçanlarda OE kalınlığı ölçülmüştür. Çalışmamızda 4. günde KB grubunun OE kalınlığının, kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğu belirlenmiştir. Bu bulgu çinko sülfat uygulanan grupta OE hasarının meydana geldiğini göstermektedir. 4. günde KB ve KB+ α -MSH grupları arasında OE kalınlığı bakımından fark görülmemiştir. OE hasarına bağlı olarak azalan OE kalınlığının normale dönmesinin uzun zaman aldığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır [111,112]. Araştırmamızda da 21. günde KB grubunun OE kalınlığı, kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. 21. günde koku bozukluğu oluşturulan grubun OE kalınlığının 4. güne göre artış eğiliminde olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan koku bozukluğu oluşturulan sıçanlara 21 gün süreyle α -MSH uygulaması OE kalınlığında KB grubuna göre artış eğilimi oluşturmuştur. 21. günde KB+ α -MSH grubunun OE kalınlığının 4. gündeki KB+ α -MSH grubunun OE kalınlığından daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu bulgular OE hasarına bağlı azalan OE kalınlığında, zamana bağlı iyileşme olabileceğini düşündürdüğü gibi, 21 günlük α -MSH tedavisinin OE hasarında iyileştirici etkisinin olduğunu, OE hasarındaki iyileştirici etkisinin 4. günden sonra başlayabileceğini düşündürmektedir. OE'deki GBC ve HBC kök hücrelerinin proliferasyonu ile OE eski haline dönebilmektedir [113]. Hasarın sürece bağlı iyileşmesi ve OE'deki kök hücrelerinin proliferasyonu ile rejenerasyonun sağlandığı bilinmektedir [114]. Periferik koku bozukluklarında sıklıkla inflamasyon gözükmektedir. İnflamasyon, sinir yenilenmesini ve yeni sinir üretimini yavaşlatarak koku bozukluklarının iyileşmesinde engel oluşturabilmektedir. α -MSH'nin beyin hipokampus bölgesinde antiinflamatuvar etkilerini gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır [17,115]. Bu çalışmalar α -MSH'nin koku duyusu üzerinde olumlu etkiler gösterebileceğini düşündürmüştür. Ancak periferik koku bozukluklarında α -MSH'nin etkisinin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ayrıca koku bozukluklarında sinir ve epitel hasarına bağlı olarak olfaktör epitelde nöroenez tetiklenmektedir. Beyinde α -MSH'nin nörogeneze etkisini inceleyen çalışmalar bulunmasına rağmen α -MSH'nin OE nöroenezine etkisini araştıran çalışmaya rastlanmamıştır. Bulgularımız daha sonra açıklanacağı gibi, α -MSH'nin antiinflamatuvar özelliklerinin yanı sıra

nörogenezde rol alan OE kök hücrelerinde de olumlu etkiler sergileyebileceğini göstermiştir. Böylece α -MSH antiinflamatuvar özelliği ile OE'deki hasarı azaltarak ve/veya doğrudan nörogenezi artırarak OE kalınlığında artışa neden olabileceği düşünülebilir.

Araştırmamızda OE'de GBC kök hücre belirteci olarak ASCL1 antikoru kullanılmıştır. GBC'ler de, HBC'ler gibi OE'de bulunan kök hücrelerdir ve OE hücrelerinin yenilenmesinde görev almaktadır [116]. Çalışmamızda 4. günde KB grubunun ASCL1+ immunoreaktivitesinin, kontrol grubuna göre yüksek olduğu saptanmıştır. Bu bulgu hasardan sonra ilk 4 gün içinde kök hücre sayısının arttığını göstermektedir. Schwob ve diğ. (2020), OE hasarından sonra iki gün içinde OE'deki kök hücre proliferasyonunda artış olduğunu bildirmişlerdir [117]. Daha önce de ifade edildiği gibi, çalışmamızda 4. günde KB grubunda OE hasarına bağlı olarak OE kalınlığında anlamlı azalma saptanmıştır. Bulgularımız KB grubunda kök hücre sayısındaki artışın, OE hasarına yanıt olarak geliştiğine işaret etmektedir. Koku bozukluğu oluşturulan sıçanlara α -MSH uygulanması (KB+ α -MSH grubu), kök hücre sayısında değişim oluşturmamıştır.

21. günde KB grubunun ASCL1+ immunoreaktivitesinin, kontrol grubuna göre yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu bulgu, koku bozukluğunun 21. gününde de kök hücre proliferasyonunun devam ettiğini göstermektedir. OE kalınlığının 21. günde kontrol seviyelerine gelmemiş olması da rejenerasyonun devam ettiğini düşündürmektedir. Literatürde de 21. günde kök hücre proliferasyonunun ve rejenerasyonun devam ettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur [118]. Koku bozukluğu oluşturulan sıçanlara 21 gün süreyle α -MSH tedavi uygulanması, KB grubuna göre ASCL1+ immunoreaktivitesinde anlamlı olmasa da artış eğilimi oluşturmuştur. KB+ α -MSH grubunun kontrol grubu ile karşılaştırılmasında ise ASCL1+ immunoreaktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu saptanmıştır. Bu bulgu α -MSH'nin OE'de kök hücre proliferasyonunu desteklediğini göstermektedir. Diğer taraftan sağlıklı sıçanlara α -MSH uygulaması kontrol grubuna göre ASCL1+ immunoreaktivitesinde anlamlı değişime neden olmamıştır. Bu bulgular α -MSH'nin OE'de fizyolojik koşullarda etkili olmadığını, hasar durumunda etkili olabileceğini düşündürmüştür. Beyindeki inflamasyonun hipokampus nörogenezini inhibe ettiği bildirilmiştir [119]. Zhang ve diğ. (2020) α -MSH'nin SVZ'de inflamasyonu azaltarak kök hücre artışına neden olduğunu ileri sürmüşlerdir [120]. Bulgularımız α -MSH'nin OE'de de inflamasyonu azaltarak kök hücre artışına neden olabileceğini ve bu olumlu etkisinin 21 günlük tedavide ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamız en son yapılan güncel literatür

taramalarımıza göre, koku bozukluğunda α -MSH'nin OE nörogenezinde etkili olduğunu gösteren ilk çalışmadır.

Çalışmamızda OE'de olgunlaşmamış nöron belirteci olarak GAP-43 immunoreaktivitesi incelenmiştir. Olgunlaşmamış nöronlar, GBC ve HBC hücrelerinin çoğalmasıyla meydana gelen ve henüz fonksiyonel nöron haline gelmemiş hücrelerdir. Araştırmamızda OE de, 4.günde KB grubunun GAP-43 immunoreaktivitesi kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Bu bulgu, OE hasarının olgunlaşmamış nöron sayısını artırdığını göstermektedir. Bu artış KB grubunda hasara bağlı olarak çoğalan kök hücre sayısı ile ilişkili bulunmuştur. Nitekim OE hasarından sonra kök hücre proliferasyonunun arttığı ve kök hücrelerinin 4 gün içinde olgunlaşmamış nöronlara dönüştüğü belirtilmiştir [50]. 4. günde KB+ α -MSH grubunun GAP-43+ immunoreaktivitesinin KB grubuna göre çok az bir artış eğilimi gösterdiği saptanmıştır.

21. günde KB grubunun GAP-43+ immunoreaktivitesinin kontrol grubundan yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu artış da KB grubunda 21. günde hasarın devam etmesine bağlı olarak çoğalan kök hücre sayısı ile ilişkili bulunmuştur. KB+ α -MSH grubunun GAP-43+ immunoreaktivitesinin KB grubuna göre yükselme eğiliminin 4. güne göre daha belirgin olduğu saptanmıştır. KB+ α -MSH grubunun kontrol grubu ile karşılaştırılmasında ise GAP-43+ immunoreaktivitesinin kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu bulgu α -MSH'nin OE'de kök hücre proliferasyonununa ve/veya kök hücrelerinin olgunlaşmamış nöronlara dönüşümüne etkisiyle ilişkili olabilir. α -MSH'nin nörogeneze etkisi kök hücrelerdeki proliferatif etkisi ile doğrudan ve/veya antiinflamatuvar etkileriyle dolaylı olarak gerçekleşebilir. Konuya açıklık getirebilecek ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

OE'deki olgun nöronları inceleyebilmek amacıyla OMP antikoru kullanılmıştır. OE'deki olgun nöronlar, koku duyusunun algılanıp beyne iletildiği fonksiyonel nöronlardır. 4. günde KB grubunun OMP+ immunoreaktivitesi kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Çinko sülfat OE hasarı oluştururken olgun nöronlara da zarar vermektedir. OE ve olgun nöron hasarı kök hücre proliferasyonuna neden olmaktadır. Hasardan sonraki 4. günde kök hücre ve olgunlaşmamış nöronlar artış gösterirken olgun nöronlar henüz farklılaşmamışlardır. OE hasarından bir hafta sonra olgunlaşmamış nöronların OMP eksprese eden olgun nöronlara dönüştükleri bildirilmiştir [113]. Bu nedenle KB grubunda 4. günde, OE hasarından sonra olgun nöron seviyelerinde azalma beklenen bir bulgudur. Çalışmamızda 4.

günde KB+ α -MSH grubunun OMP+ immunoreaktivitesi, KB grubuna göre artış eğilimi göstermiştir. Bulgularımız koku bozukluğu oluşturulan sıçanlarda 4 günlük α -MSH tedavisinin olgun nöronların zarar görmesini kısmen de olsa engellediğini düşündürmektedir. α -MSH'nin beyinde antiinflamatuvar ve nöroprotektif özellikleri ile nöron sağ kalımını artırdığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır [19,121]. α -MSH tedavisi alan grupta artış eğiliminin anlamlı olmaması α -MSH'nin sistemik yolla uygulanmasından kaynaklanabilir. Bu durumda koku kaybının başladığı andan itibaren burun içi uygulanan α -MSH'nin koku bozukluğunun giderilmesinde önemli bir strateji olabileceğini düşünebiliriz.

Araştırmamızda 21. günde de KB grubunun OMP+ immunoreaktivitesi kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. Bu bulgu koku bozukluğunun 21. gününde olgun nöron sayısının normale dönmediğini göstermektedir. Literatürde koku bozukluğu iyileşmesinde olgun nöron üretiminin ve OE rejenerasyonunun uzun süre devam ettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur [118,122]. Bulgularımız da benzer şekilde OE hasarından sonra olgun nöron sayısının normale dönmesi için 21 günden daha fazla süreye ihtiyaç duyulabileceğini düşündürmektedir. Koku bozukluğu olan sıçanlara α -MSH uygulanması KB grubuna göre olgun nöron sayısında artış eğilimi oluşturmuş ve olgun nöron sayısını kontrol grubu değerlerine yaklaştırmıştır. Bu bulgu koku bozukluğu durumunda α -MSH'nin OE nörogenezinde ve rejenerasyonunda rol aldığını düşündürmektedir. 21. günde KB+ α -MSH grubunda OE'deki kök hücre ve olgunlaşmamış nöron sayısının da kontrol grubundan daha yüksek olması bu düşüncemizi desteklemektedir. İlaveten 4. ve 21. günlerde KB+ α -MSH gruplarında olgun nöron sayısının KB gruplarına göre artış eğilimlerinin, sıçanların koku alma davranışlarına da yansıdığı belirlenmiştir. KB+ α -MSH grubundaki sıçanların KB grubundaki sıçanlara göre gömülü gıda testini daha kısa sürede tamamladıkları tespit edilmiştir. 21. gündeki histolojik ve koku alma davranışı bulgularımız α -MSH'nin koku bozukluğunun giderilmesinde önemli rol oynadığını ileri sürmektedir. α -MSH, olgun nöron oluşumunda ve olgun nöronların fonksiyonel hale gelmesinde etkili olabilir.

IL10, inflamasyonun baskılanmasında görevli antiinflamatuvar bir sitokindir. Çalışmamızda koku bozukluğu oluşturulan grubun OE'sinde hem 4. günde hem de 21. günde IL-10+ immunoreaktivitesinde artış eğilimi gözlenmiştir. Bu bulgu OE'de çinko sülfatın oluşturduğu hasara bağlı inflamasyonun etkisiyle ortaya çıkabilir. IL-10 düzeyinin inflamasyona bağlı artış gösterdiğini bildiren çok sayıda çalışma bulunmaktadır [123,124]. Hosein ve Henkin (2022) koku duyusu bozulan hastaların olfaktör mukozalarında IL-10 seviyelerinin kontrol grubuna göre arttığını bildirmişlerdir [125]. 21. günde KB+ α -MSH

grubundaki IL-10 ekspresyonunun KB grubuna göre artma eğiliminde olduğu, 4. günde ise böyle bir değişim göstermediği saptanmıştır. 21. günde KB+ α -MSH grubunun IL-10+ immunoreaktivitesinin kontrol grubundan yüksek olduğu belirlenmiştir. Bulgularımız α -MSH'nin OE'de IL-10 ekspresyonunu artırabileceğini ancak bu etkisini 4. günden sonra gerçekleştirebileceğini düşündürmüştür. α -MSH'nin, makrofaj, keratinosit ve astrosit gibi birçok hücrede IL-10 sentezini artırdığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır [24,126,127]. Çalışmamız α -MSH'nin, IL-10'u artırıcı etkisiyle OE hasarına bağlı gelişen inflamasyonu azaltabileceğini düşündürmektedir. Böylece 21 günlük α -MSH tedavisi koku bozukluğunda OE'de nörogenezin teşvik edilmesine zemin hazırlayabilir. Zira Kiyota ve diğ. (2012) Alzheimer modelinde, adenovirüs ilişkili IL-10 ekspresyon artışının inflamasyonu azaltarak hipokampusta nörogenezi tetiklediğini göstermişlerdir [128]. 21. günde KB+ α -MSH grubundaki OE kalınlığı, kök hücre sayısı, olgunlaşmamış ve olgun nöron sayısındaki artışlar α -MSH'nin IL-10 seviyesini artırarak antiinflamatuvar etki göstermesinden kaynaklanabilir.

Nörogenezde üretilen nöronların farklılaşması, olgunlaşması ve sağ kalımı için büyüme faktörlerine ihtiyaçları vardır [129]. Bu nedenle araştırmamızda nöron büyüme faktörlerinden NGF ve BDNF immunoreaktiviteleri incelenmiştir. Çalışmamızda 4. günde KB grubundaki sıçanların OE'de NGF ekspresyonunun kontrol grubundaki sıçanlara göre anlamlı olarak yüksek olduğu saptanmıştır. Bu bulgu koku bozukluğu oluşturmak için kullandığımız çinko sülfatın toksik etkisinden kaynaklanabilir. Zira nörotoksik maddelerin neden olduğu inflamasyonun, nöroproteksiyonu tetikleyebileceği ileri sürülmektedir [130]. Diğer taraftan insan ve hayvan çalışmalarında da inflamasyonlu dokularda NGF sentezinde artışın olabileceği ileri sürülmüştür [131]. Çalışmalarda NGF artışının hastalığın seyri ve aktivitesiyle ilişkili olabileceği belirtilmiştir. Çalışmamızda da 4. günde KB grubunda NGF'nin anlamlı yüksek değerler göstermesi çinko sülfatın oluşturduğu hasarın derecesi ile ilişkili olabilir. Çalışmalar IL-1 β , TNF- α ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin ve histaminin NGF ekspresyonunu artırdığını göstermişlerdir [132]. Çalışmamızda 21. günde KB grubunun NGF değerlerinin kontrol grubuna göre artış göstermediği belirlenmiştir. 21. günde KB grubunun NGF+ immunoreaktivitesinin 4. gündeki KB grubuna göre anlamlı şekilde düşük olduğu saptanmıştır. Bu bulgu inflamasyonun ilerleyen günlerde zamana bağlı azalmasından kaynaklanabilir. 4. günde koku bozukluğu oluşturulan sıçanlara α -MSH uygulaması, KB grubuna göre NGF ekspresyonunda anlamlı azalmaya neden olmuştur. OE'de OSN aksonlarını saran OEC'lerden de NGF ve BDNF'nin salgılandığı gösterilmiştir. İn vitro bir çalışmada α -MSH'nin OSN

aksonlarını saran OEC'lerden MCR1 reseptörü aracılığıyla NGF ve BDNF salınımını artırdığı gösterilmiştir [21]. Ancak çalışmamızda 4 gün süreyle α -MSH uygulaması NGF ekspresyonunda anlamlı azalmaya, 21 gün süreyle uygulanması ise azalma eğilimine neden olmuştur. Bulgularımız 4. ve 21. günlerdeki NGF ekspresyon değişikliklerinden α -MSH'nin etkili olmadığını düşündürmektedir. 4. günde KB+ α -MSH grubunda KB grubuna göre NGF ekspresyonundaki anlamlı azalma göstermesi α -MSH'nin antiinflamatuvar etkisini düşündürdüysen de, α -MSH 4. günden sonraki zaman diliminde, IL-10 ekspresyonunda artış oluşturması ve bu zaman diliminde OE'deki olumlu etkiler sergilemesi bu düşünceden uzaklaşmamıza neden olmuştur. Nedenini açıklayamadığımız bu durumu inceleyen ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda OE'de BDNF+ immunoreaktivitesinin hem 4. günde hem de 21. günde gruplar arasında değişim göstermediği belirlenmiştir. Bununla birlikte 21. günde BDNF immunoreaktivitesinin KB grubunda kontrol grubuna göre yükselme eğiliminde olduğu saptanmıştır. Uruganase ve diğ. (2012) metimazol ile koku bozukluğu oluşturulan sıçanlarda OE'deki BDNF ekspresyonunu ölçmüşlerdir [15]. İlgili çalışmada koku bozukluğunda 7. güne kadar BDNF ekspresyonunun arttığı, 7. günden sonra ise azaldığı belirtilmiştir. Jo ve diğ. (2015) yaptığı bir diğer çalışmada da koku bozukluğundan iki hafta sonra BDNF ekspresyonunun arttığı saptanmıştır [133]. Bu bilgiler kapsamında, koku bozukluğunda BDNF ekspresyonuyla ilgili kesin bir zaman dilimi olmadığı anlaşılmıştır. Çalışmamızda koku bozukluğu grubunda NGF immunoreaktivitesinin 4. günde arttığı, BDNF immunoreaktivitesinin ise 21. günde artış eğiliminde olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda hem 4 gün hem de 21 gün süreyle α -MSH uygulamasının BDNF ekspresyonunda artış eğilimi oluşturmamıştır. Daha önce de bahsedildiği gibi Teare ve diğ. (2003) invitro bir çalışmada α -MSH'nin OSN aksonlarını saran OEC'lerden MCR1 reseptörü aracılığıyla BDNF salınımını artırdığını bildirmişlerdir [21]. Ramírez ve diğ. (2015) de MCR4 aktivasyonunun sıçan astrositlerinde ve hipotalamusunda BDNF ekspresyonunu artırdığını ileri sürmüşlerdir [134]. Ancak bulgularımız koku bozukluğunda α -MSH'nin koruyucu etkisinde NGF ve BDNF'nin rol almadığını düşündürmektedir.

Koku Bozukluğunda α -MSH Tedavisinin Subventriküler Bölge ve Olfaktör Bulbustaki Etkilerinin Araştırılması

Çalışmamızda, çinko sülfat uygulaması ile periferik koku bozukluğu oluşturulan sıçanlarda, periferik koku bozukluğunun SVZ'deki nörogenezi etkileyip etkilemediği araştırılmıştır. SVZ'deki nörogenezi tanımlamak için kök hücre göstergesi Nestin ile ara progenitör hücre belirteci ASCL1 çift boyama ile işaretlenmiştir. KB grubundaki sıçanların SVZ'sinde Nestin/ASCL1+ immunoreaktivitesinde hem 4. günde hem de 21. günde kontrol grubuna göre artış eğilimi gözlenmiştir. Çalışmamızda KB grubundaki sıçanların SVZ'sinde kök hücre ve ara progenitör hücrelerin artma eğiliminde olması, periferik koku bozukluğunun SVZ'de nörogenezi tetiklediğini düşündürmektedir. Literatürde, periferik koku bozukluğunda SVZ'deki nörogenezi etkileyen farklı sonuçlar bulunmaktadır. Çinko sülfat ile OE hasarı oluşturulan deney hayvanlarında SVZ'de nörogenezin azaldığı bildirilmiştir [135]. Aynı koku alma bozukluğu modelini kullanan başka çalışmalarda ise SVZ'de nörogenezin arttığı gösterilmiştir [122,136]. Başka bir çalışmada ise periferik koku bozukluğu oluşturulan knockout farelerde SVZ'de nörogenezin etkilenmediği gösterilmiştir [51]. Wang ve diğ. (2015) periferik koku bozukluğunda SVZ'de nörogenez indüksiyonunun duysal girdilerin azalmasına bağlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir [122]. Araştırmamızda da SVZ'de nörogenezin indüklenmesinin duysal girdilerin azalmasına bağlı olabileceğini gösteren bulgular saptanmıştır. OE'de hem 4. günde hem de 21. günde, koku duyusunun algılanıp beyne iletilmesinden sorumlu olgun nöron sayısının, KB grubunda kontrol grubuna göre düşük olduğu gözlenmiştir. Ayrıca çalışmamızın bir diğer bulgusu olan gömülü gıda testinde koku bozukluğu oluşturulan grupların kokuyu tespit etme sürelerinin kontrol grubuna göre fazla olduğu saptanmıştır. Koku bilgisinin iletilmesinde görevli duysal olfaktör nöronların azalması ve gömülü gıda testinin uzun sürmesi koku bozukluğu oluşturulan gruplarda duysal girdinin azaldığını göstermektedir. Böylece SVZ'de duysal girdinin azalmasına bağlı olarak, koku bozukluğu oluşturulan gruplarda kontrol gruplarına göre nörogenez indüklenebilir. Araştırmamızda hem 4. hem de 21. günlerde KB+ α -MSH gruplarında, KB gruplarına göre SVZ nörogenezinde artış eğilimi olduğu saptanmıştır. α -MSH'nin duysal girdilerdeki olumlu etkisine rağmen KB+ α -MSH gruplarında SVZ nörogenezinde artış eğiliminin olması α -MSH'nin doğrudan SVZ'deki nörogenezi etkileyebileceğini düşündürmüştür. SVZ'deki NGF ve BDNF ile ilgili histolojik bulgularımız, periferik koku bozukluğunda tetiklenen SVZ nörogenezinde NGF ve BDNF'nin etkili olmadığını göstermektedir. Çalışmamızda KB

grubundaki sıçanların SVZ'sinde NGF ve BDNF ekspresyonunun kontrol grubuna göre artış göstermediği belirlenmiştir. Bu bulgu koku bozukluğunda SVZ'deki nörogenez artışının (Nestin/ASCL1 immunoreaktivitesindeki artışın) NGF ve BDNF'den kaynaklanmadığını ileri sürmektedir. Koku bozukluğu oluşturulan sıçanlara 4 günlük α -MSH tedavi uygulaması, KB grubuna göre hem NGF hem de BDNF ekspresyonunda artış eğilimi oluştururken, 21. günde bu artış eğiliminin devam etmediği saptanmıştır. Bulgularımız 4 günlük α -MSH tedavisinin, NGF ve BDNF artışı ile SVZ nörogenezini desteklediğini, ilerleyen günlerde α -MSH'nin SVZ nörogenezindeki olumlu etkilerinin NGF ve BDNF'den bağımsız gerçekleşebileceğini düşündürmektedir. Çalışmamız koku bozukluğunda α -MSH'nin hem OE'deki hem de SVZ'deki kök hücrelerin proliferasyonu etkileyerek nörogenezi artırabileceğine işaret etmektedir.

SVZ'de nörogenez ile üretilen olgunlaşmamış nöronlar (nöroblastlar), RMS boyunca göç ederek OB'ye ulaşmaktadır [137]. Çalışmamızda OB'de, 4. ve 21. günde KB grubundaki olgunlaşmamış nöron belirteci DCX+ immunoreaktivitesi kontrol grubuna göre artma eğilimi göstermiştir. KB grubunun 4. ve 21. günlerde OB'deki olgunlaşmamış nöron artış eğilimi, 4. ve 21. günlerde artış eğilimi gösteren SVZ nörogenezinden kaynaklanabilir. Zira SVZ'de nörogenez ile oluşan yeni nöroblastlar göç ederek OB'ye ulaşmaktadır. Nöroblastların SVZ'den OB'ye göçünü etkileyebilecek NGF ve BDNF gibi çeşitli faktörlerden söz edilmektedir. Ancak daha önce de belirtildiği gibi, bulgularımız koku bozukluğunda SVZ'deki nörogenez artışının, NGF ve BDNF'den kaynaklanmadığını ileri sürmektedir. Bu durumda nöroblastların SVZ'den OB'ye göçünde NGF ve BDNF'nin etkili olmadığını düşünebiliriz. KB+ α -MSH grubunda OB'deki olgunlaşmamış nöron sayısı 4. ve 21. günlerde KB gruplarına göre düşme eğilimi göstermiştir. 4 ve 21 gün süreyle α -MSH tedavisi SVZ'de kök hücre sayısında artış eğilimi gösterirken OB'deki olgunlaşmamış nöron sayısının azalma eğilimi göstermesi ilginç bulunmuştur. Bulgularımız α -MSH'nin RMS'de etkili olmadığını düşündürmektedir. Konu ile ilgili ileri araştırmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

OB'ye göç eden nöroblastlar bu bölgede olgun ara nöronlara dönüşmektedir. OB'deki olgun ara nöronlar koku duyusunun ayırt edilmesinde rol oynayan hücrelerdir [138]. Araştırmamızda OB'deki olgun nöron göstergesi olarak NeuN+ immunoreaktivitesi incelenmiştir. 4. ve 21. günlerde KB gruplarının NeuN+ immunoreaktivitesi kontrol gruplarına göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Bu bulgu KB grubunda, SVZ'deki kök hücre ve OB'deki nöroblast sayısındaki artış eğiliminden kaynaklanabilir. Periferik koku bozukluğunda

duysal girdilerin azalmasına bağılı olarak SVZ’de nörogenezin tetiklendiğı ileri sürölmüştür. Bu durumda SVZ’de indüklenen nörogenez kök hücre ve ara progenitör hücre artışına neden olarak OB’ye göç eden nöroblast sayında artışa neden olabilir. Nitekim çalışmamızda da koku bozukluğunda SVZ’de kök hücre ve ara progenitör hücre sayısında artış eğilimi gözlenmiştir. Çalışmamızda KB grubunda kontrol grubuna göre, OB’de 4. günde olgun nöron sayısında artış saptanması ilginç bulunmuştur. Zira SVZ’de nörogenezin indüklenmesi ve OB’ye göç eden nöroblastların olgunlaşmasının periferik koku bozukluğu oluşturulduktan sonra 7-14 gün içinde gerçekleştiğı ileri sürölmüştür [117]. Farklı bir çalışmada ise 7. günde OB’de artan olgun nöronların SVZ nörogenezinden kaynaklanmadığı, daha önce SVZ’den OB’ye geçen nöroblastların olgunlaşma sürecindeki sağ kalımla ilişkili olabileceğı bildirilmiştir [122]. Çalışmamızda da KB grubunda 4.günde OB’de olgun nöron sayısındaki artışın SVZ’deki nörogenezden kaynaklanmadığı düşünölmüştür. Periferik koku bozukluğunda duysal girdilerin azalması bir yandan SVZ’de nörogenezi ve OB’ye göçü stimüle ederken, diğertaraftan OB’ye etki ederek daha önce göç etmiş nöroblastların ve olgun nöronların apoptozunu engelleyerek olgun nöron sağ kalımında artış oluşturabilir. OB’de 21. günde KB grubunda kontrol grubuna göre olgun nöron sayısındaki artış, SVZ’deki nörogenez ve OB’deki sağ kalımdan kaynaklanabilir. Bu bulgu koku ayırım testi ile uyumlu bulunmuş, 21. günde, KB grubunun koku ayırt edebilme indeksinin kontrol grubuna yaklaştığı saptanmıştır. Konuya açıklık getirebilmek için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda 4. günde KB+ α -MSH grubundaki olgun nöron sayısının KB grubuna göre hafif artış eğilimi gösterdiği, bu artış eğilimi ile KB+ α -MSH grubundaki olgun nöron sayısının kontrol grubundaki olgun nöron sayısını anlamlı olarak aştığı belirlenmiştir. 21. günde ise KB+ α -MSH grubundaki olgun nöron sayısının KB grubuna göre anlamlı azalma gösterdiği saptanmıştır. 4. günde KB+ α -MSH grubundaki olgun nöron sayısının kontrol grubundaki olgun nöron sayısından yüksek bulunması, α -MSH’nin antiapoptotik özelliğinden kaynaklanabilir. Nitekim α -MSH’nin hipotalamik nöronlarda ve astrositlerde Melanokortin 4 reseptörleri aracılığı ile apoptozu önlediğı bildirilmiştir [139]. Benzer etkiyi OB’deki olgun nöronlarda da gösterebilir. 21. günde KB+ α -MSH grubunda olgun nöron sayısının anlamlı azalma göstererek kontrol değerlere ulaşması, α -MSH’nin OE’deki olumlu etkilerinden kaynaklanabilir. α -MSH’nin OE’deki olumlu etkilerine bağılı duysal girdi artışı daha önce ifade edilen etki ile OB’deki nöron sağ kalımını azaltabilir. KB+ α -MSH grubunun koku ayırım testleri incelendiğinde, 4. günde duysal girdinin azalması koku ayırt etmeyi engellerken, 21. günde

KB+ α -MSH grubunda KB grubuna göre daha yüksek koku ayırım indeksi bulunarak kontrol grubuna yakın sonuçlar saptanmıştır.

Gömülü gıda testi kemirgenlerde koku duyusunu ölçmek için sıkça kullanılan bir testtir. Araştırmamızda sıçanlara deneye başlamadan önce (T0), çinko sülfat/salin uyguladıktan sonra (T1) ve ötenazi yapılmadan önce (T2) üç kez gömülü gıda testi uygulanmıştır. Testler gruplar arasında fark ve zamansal değişim açısından değerlendirilmiştir. T0 testinde gruplar arasında gömülü gıdayı bulma süresinde fark görülmemesi çalışmaya dahil edilen sıçanların başlangıçta koku duyuları arasında fark olmadığını göstermiştir. T1 testinde; sıçanların yarısına burun içi çinko sülfat uygulanırken diğer yarısına burun içi salin uygulanmıştır. Burun içi çinko sülfat uygulanan sıçanların gömülü gıdayı bulma süresi, burun içi salin uygulanan sıçanlara göre daha yüksek bulunmuştur. Bu bulgu burun içi uygulanan çinko sülfatın, OE hasarı oluşturarak etkin bir şekilde koku bozukluğu oluşturduğunu göstermektedir. T1 testi uygulandıktan sonra sıçanlar; Kontrol (4.gün), KB (4.gün), α -MSH (4.gün), KB+ α -MSH (4.gün), Kontrol (21.gün), KB (21.gün), α -MSH (21.gün) ve KB+ α -MSH (21.gün) gruplarına ayrılarak α -MSH/salin uygulanmıştır. Uygulamalardan 3 ve 20 gün sonra (ötenazilerden bir gün önce) T2 testi uygulanmıştır. T2 testinde, KB gruplarının gömülü gıdayı bulma süresinin kontrol gruplarından daha yüksek olduğu saptanmıştır. 21. günde koku bozukluğunda süreye bağlı kısmi düzelme olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar KB grubundaki histolojik bulguları destekler niteliktedir. Literatürde çinko sülfat ile koku bozukluğu modeli oluşturulan sıçanların gömülü gıda testini daha uzun sürede tamamladığını bildiren çok sayıda çalışma bulunmaktadır [140]. Çinko sülfat koku moleküllerinin algılandığı olfaktör duyu nöronlarını da içeren OE'yi hasarlamaktadır. Olfaktör reseptörlere sahip olgun olfaktör duyu nöronlarının azalması, kokunun algılanması için daha yoğun koku konsantrasyona ihtiyaç duymaktadır. Koku eşliğinin yükselmesi anlamına gelen bu durumda, sıçanların gömülü gıdayı bulması için daha fazla vakit harcaması gerekmektedir.

4. ve 21. günlerdeki KB+ α -MSH gruplarındaki sıçanların KB gruplarındaki sıçanlara göre daha kısa sürede gömülü gıda testini tamamladıkları ve gömülü gıdayı bulma sürelerinin kontrol gruplarındaki sıçanlara yaklaştığı belirlenmiştir. α -MSH uygulanan koku bozukluğu grubunun histolojik bulguları 4. günde KB grubuna göre belirgin farklar oluşturmamasına rağmen gömülü gıda testinde daha iyi sonuçlar almıştır. KB+ α -MSH grubunun kokuyu

algılayan olfaktör reseptörlere sahip olgun nöron sayılarının KB grubuna göre artış eğiliminde olması KB+ α -MSH grubunun gömülü gıda testini daha kısa sürede bitirmesinin nedeni olabilir. 21. gündeki KB+ α -MSH grubunun OE kalınlığı, kök hücre, olgunlaşmamış ve olgun nöron immunoreaktiviteleri gibi histolojik bulgularının KB grubuna göre daha olumlu olduğu saptanmıştır. Koku bozukluğunda 21 günlük α -MSH tedavisi, KB grubuna göre OE rejenerasyonuna paralel olarak koku testinde de daha iyi sonuçların alınmasına yol açmıştır.

Koku ayırım testi, sıçanların iki farklı kokuyu ayırt etme yeteneğini ölçmektedir. Koku ayırım testinde, sıçanların kendi kokularının sindiği talaş (tanıdık koku) ile temiz kokan talaşta (tanıdık olmayan koku) geçirdikleri süre ölçülmüştür. Testler gruplar arasındaki fark ve zamansal değişime göre değerlendirilmiştir. T0 testinde gruplar arasında fark görülmemiştir. Bu sonuç gömülü gıda testinde olduğu gibi sıçanların başlangıçtaki koku duyuları arasında fark olmadığını göstermektedir. T1 testinde; çinko sülfat uygulanan sıçanların koku ayırım indeksinin salin uygulanan sıçanlara göre daha düşük olduğu saptanmıştır. Çalışmalar çinko sülfat uygulanan sıçanların kokuyu ayırt edemediklerini göstermektedir [141]. Periferik koku bozukluğunun oluşturulması duysal girdiyi azaltarak koku ayırt etmeyi zorlaştırabilir. T2 testinde; 4. günde KB grubunda kontrol grubuna göre koku ayırt etme indeksinin daha düşük olduğu, KB+ α -MSH grubunun koku ayırt etme indeksinde değişiklik oluşturmadığı belirlenmiştir. KB ve KB+ α -MSH gruplarının T1 ve T2 arasındaki zamansal değişimi incelendiğinde koku ayırım indeksinin 4. günde az bir değişim gösterdiği belirlenmiştir. Bulgularımız koku ayırt etme yeteneğinin 4. günde çok az düzeldiğini göstermektedir. 21. günde KB grubunun süreye bağlı olarak koku ayırt etme indeksi kontrol grubuna yaklaştığı tespit edilmiştir. KB+ α -MSH grubunun koku ayırt etme yeteneğinin KB grubuna göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu bulgu 21. gündeki KB+ α -MSH grubunun histolojik bulgularını desteklemektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak araştırmamızda koku bozukluğu modeli oluşturmak için burun içi uyguladığımız çinko sülfat OE' de hasar oluşturarak hem 4. günde hem de 21. günde OE kalınlığında kontrol gruplarına göre anlamlı azalmalar oluşturmuştur. 21. günde koku bozukluğu oluşturulan grubun OE kalınlığı 4. güne göre artış eğilimi göstermiştir. Bu bulgu OE hasarında zamana bağlı düzelmenin olabileceğini düşündürmüştür. 21 günlük α -MSH tedavisinin OE hasarında iyileştirici etki gösterdiği belirlenmiştir.

α -MSH'nin, OE'de 4. günden sonraki herhangi bir zaman diliminde IL-10 ekspresyonunu artırarak antiinflamatuvar etki gösterdiği saptanmıştır. Böylece α -MSH antiinflamatuvar özelliği ile OE'de kök hücre, olgunlaşmamış nöron ve olgun nöron artışına neden olarak OE nörogenezini olumlu etkileyebilir. α -MSH'nin olumlu etkileri NGF ve BDNF'den bağımsız gelişebilir.

α -MSH'nin OE nörogenezine etkisi direkt ve/veya antiinflamatuvar etkileriyle dolaylı olarak gerçekleşebilir.

α -MSH SVZ'deki nörogenezi de etkileyebilir. α -MSH tedavisi ilk günlerde NGF ve BDNF artışı ile SVZ nörogenezini desteklerken, ilerleyen günlerde α -MSH'nin SVZ nörogenezindeki olumlu etkileri NGF ve BDNF'den bağımsız gerçekleşebilir.

KB+ α -MSH grubunda OB'deki olgunlaşmamış nöron sayısı 4. ve 21. günlerde KB gruplarına göre düşme eğilimi göstermiştir. α -MSH tedavisi SVZ'de kök hücre sayısında artış eğilimi gösterirken OB'deki olgunlaşmamış nöron sayısında azalma eğilimi göstermesi ilginç bulunmuştur. Bulgularımız α -MSH'nin RMS'de etkili olmadığını düşündürmektedir.

KB+ α -MSH grubunda, 21. günde OB'de olgun nöron sayısının KB grubuna göre anlamlı azalma gösterdiği, bu azalma ile KB+ α -MSH grubundaki olgun nöron sayısının kontrol değerlere ulaştığı saptanmıştır. Bu bulgu ile α -MSH'nin OE'deki olumlu etkilerine bağlı duysal girdi artışı ile OB'deki nöron sağ kalımını azaltabileceği düşünülmüştür.

Periferik koku bozukluğunda, α -MSH tedavisinin olumlu etkileri histolojik bulgular, gömülü gıda testi ve koku ayırım testleri ile desteklenmiştir.

Periferik koku bozukluğunda α -MSH'nin OE ve SVZ nörogenezindeki etkilerini araştıran ileri düzeyde çalışmalara ihtiyaç vardır.



KAYNAKLAR

- [1] Stevenson, R.J., 2010, An Initial Evaluation of the Functions of Human Olfaction, *Chemical Senses*, 35 (1), 3–20.
- [2] Noback, C.R., Ruggiero, D.A., Strominger, N.L., and Demarest, R.J., 2005, The Human Nervous System: Structure and Function, Springer Science & Business Media, .
- [3] Van Regemortel, V., Hummel, T., Rosenzweig, F., Mouraux, A., Rombaux, P., and Huart, C., 2020, Mechanisms Linking Olfactory Impairment and Risk of Mortality, *Frontiers in Neuroscience*, 14.
- [4] Pinto, J.M., Wroblewski, K.E., Kern, D.W., Schumm, L.P., and McClintock, M.K., 2014, Olfactory Dysfunction Predicts 5-Year Mortality in Older Adults, *PLoS ONE*. 9 (10), e107541.
- [5] Marin, C., Vilas, D., Langdon, C., Alobid, I., López-Chacón, M., Haehner, A., et al., 2018, Olfactory Dysfunction in Neurodegenerative Diseases, *Current Allergy and Asthma Reports*, 18 (8), 42.
- [6] Chang, E.H., Adorjan, I., Mundim, M.V., Sun, B., Dizon, M.L.V., and Szele, F.G., 2016, Traumatic Brain Injury Activation of the Adult Subventricular Zone Neurogenic Niche, *Frontiers in Neuroscience*, 10.
- [7] Athanassi, A., Dorado Doncel, R., Bath, K.G., and Mandairon, N., 2021, Relationship between depression and olfactory sensory function: a review, *Chemical Senses*, 46 bjab044.
- [8] Scangas, G.A. and Bleier, B.S., 2017, Anosmia: Differential Diagnosis, Evaluation, and Management, *American Journal of Rhinology & Allergy*, 31 (1), e3–e7.
- [9] Beites, C.L., Kawauchi, S., Crocker, C.E., and Calof, A.L., 2005, Identification and molecular regulation of neural stem cells in the olfactory epithelium, *Experimental Cell Research*, 306 (2), 309–316.
- [10] Carter, L.A., MacDonald, J.L., and Roskams, A.J., 2004, Olfactory Horizontal Basal Cells Demonstrate a Conserved Multipotent Progenitor Phenotype, *Journal of Neuroscience*, 24 (25), 5670–5683.
- [11] Wu, A., Yu, B., and Komiyama, T., 2020, Plasticity in olfactory bulb circuits, *Current Opinion in Neurobiology*, 64 17–23.
- [12] Kim, J., Choi, Y., Ahn, M., Jung, K., and Shin, T., 2018, Olfactory Dysfunction in Autoimmune Central Nervous System Neuroinflammation, *Molecular Neurobiology*, 55 (11), 8499–8508.
- [13] Othman, B.A., Maulud, S.Q., Jalal, P.J., Abdulkareem, S.M., Ahmed, J.Q., Dhawan, M., et al., 2022, Olfactory dysfunction as a post-infectious symptom of SARS-CoV-2 infection, *Annals of Medicine and Surgery*, 75 103352.
- [14] Shin, T., Kim, J., Ahn, M., and Moon, C., 2019, Olfactory Dysfunction in CNS Neuroimmunological Disorders: a Review, *Molecular Neurobiology*, 56 (5), 3714–3721.
- [15] Uranagase, A., Katsunuma, S., Doi, K., and Nibu, K.-I., 2012, BDNF expression in olfactory bulb and epithelium during regeneration of olfactory epithelium, *Neuroscience Letters*, 516 (1), 45–49.
- [16] Yalcinkaya, E., Basaran, M.M., Erdem, H., Kocyigit, M., Altundag, A., and Hummel, T., 2019, Olfactory dysfunction in spondyloarthritis, *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 276 (4), 1241–1245.

- [17] Flores-Bastías, O., Adriasola-Carrasco, A., and Karahanian, E., 2020, Activation of Melanocortin-4 Receptor Inhibits Both Neuroinflammation Induced by Early Exposure to Ethanol and Subsequent Voluntary Alcohol Intake in Adulthood in Animal Models: Is BDNF the Key Mediator?, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14 5.
- [18] Zheng, Y., McPherson, K., Reid, P., and Smith, P.F., 2015, The anti-inflammatory selective melanocortin receptor subtype 4 agonist, RO27-3225, fails to prevent acoustic trauma-induced tinnitus in rats, *European Journal of Pharmacology*, 761 206–210.
- [19] Savos, A.V., Gee, J.M., Zierath, D., and Becker, K.J., 2011, α -MSH: A Potential Neuroprotective and Immunomodulatory Agent for the Treatment of Stroke, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 31 (2), 606–613.
- [20] Sultan, B., May, L.A., and Lane, A.P., 2011, The role of TNF- α in inflammatory olfactory loss, *The Laryngoscope*, 121 (11), 2481–2486.
- [21] Teare, K.A., Pearson, R.G., Shakeshe, K.M., and Haycock, J.W., 2003, α -MSH inhibits inflammatory signalling in olfactory ensheathing cells. 6.
- [22] Zhou, Y., Duan, Q., and Yang, D., 2023, In vitro human cell-based models to study airway remodeling in asthma, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 159 114218.
- [23] Lee, S.-N., Ryu, J.-H., Joo, J.-H., Choi, Y.-H., Lee, H.-J., Kim, Y.-J., et al., 2011, α -Melanocyte-Stimulating Hormone Inhibits Tumor Necrosis Factor α -Stimulated MUC5AC Expression in Human Nasal Epithelial Cells, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 44 (5), 716–724.
- [24] Kleiner, S., Rüdrieh, U., Gehring, M., Loser, K., Eiz-Vesper, B., Noubissi Nzeteu, G.A., et al., 2021, Human basophils release the anti-inflammatory cytokine IL-10 following stimulation with α -melanocyte-stimulating hormone, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 147 (4), 1521-1523.e3.
- [25] Kleiner, S., Braunstahl, G.-J., Rüdrieh, U., Gehring, M., Eiz-Vesper, B., Luger, T.A., et al., 2016, Regulation of melanocortin 1 receptor in allergic rhinitis *in vitro* and *in vivo*. *Clinical & Experimental Allergy*, 46 (8), 1066–1074.
- [26] Marin, C., Langdon, C., Alobid, I., and Mullol, J., 2020, Olfactory Dysfunction in Traumatic Brain Injury: the Role of Neurogenesis, *Current Allergy and Asthma Reports*, 20 (10), 55.
- [27] Marin, C., Langdon, C., Alobid, I., Fuentes, M., Bonastre, M., and Mullol, J., 2019, Recovery of Olfactory Function After Excitotoxic Lesion of the Olfactory Bulbs Is Associated with Increases in Bulbar SIRT1 and SIRT4 Expressions, *Molecular Neurobiology*, 56 (8), 5643–5653.
- [28] Kohman, R.A. and Rhodes, J.S., 2013, Neurogenesis, inflammation and behavior, *Brain, Behavior, and Immunity*, 27 22–32.
- [29] Chen, H.-C., Ma, Y.-Z., Cao, J.-X., Zhang, Y.-S., Zhang, L., Gao, L.-P., et al., 2022, Synergistic effects of hIAPP and A β 1–42 impaired the olfactory function associated with the decline of adult neurogenesis in SVZ, *Neuropeptides*, 96 102268.
- [30] Tepavčević, V., Lazarini, F., Alfaro-Cervello, C., Kerninon, C., Yoshikawa, K., Garcia-Verdugo, J.M., et al., 2011, Inflammation-induced subventricular zone dysfunction leads to olfactory deficits in a targeted mouse model of multiple sclerosis, *Journal of Clinical Investigation*, 121 (12), 4722–4734.
- [31] Xiong, X.-Y., Liu, L., and Yang, Q.-W., 2016, Functions and mechanisms of microglia/macrophages in neuroinflammation and neurogenesis after stroke, *Progress in Neurobiology*, 142 23–44.
- [32] Paul, A., Chaker, Z., and Doetsch, F., 2017, Hypothalamic regulation of regionally distinct adult neural stem cells and neurogenesis, *Science*, 356 (6345), 1383–1386.

- [33] Obernier, K. and Alvarez-Buylla, A., 2019, Neural stem cells: origin, heterogeneity and regulation in the adult mammalian brain, *Development*, 146 (4), dev156059.
- [34] Munger, S.D., Leinders-Zufall, T., and Zufall, F., 2009, Subsystem Organization of the Mammalian Sense of Smell, *Annual Review of Physiology*, 71 (Volume 71, 2009), 115–140.
- [35] Monti-Bloch, L., Jennings-White, C., and Berliner, D.L., 1998, The Human Vomeronasal System: A Review, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 855 (1), 373–389.
- [36] Leinders-Zufall, T. and Ma, M., 2009, Olfactory Epithelium. in: L.R. Squire (Ed.), *Encyclopedia of Neuroscience*, Academic Press, Oxfordpp. 113–118.
- [37] Smith, T.D. and Bhatnagar, K.P., 2019, Chapter 2 - Anatomy of the olfactory system, in: R.L. Doty (Ed.), *Handbook of Clinical Neurology*, Elsevier, pp. 17–28.
- [38] Vilensky, J.A., 2014, The neglected cranial nerve: Nervus terminalis (cranial nerve N), *Clinical Anatomy*, 27 (1), 46–53.
- [39] Mackay-Sim, A. and Royet, J.-P., The Olfactory System,
- [40] Dennis, J.C., Aono, S., Vodyanoy, V.J., and Morrison, E.E., 2015, Development, Morphology, and Functional Anatomy of the Olfactory Epithelium, in: *Handbook of Olfaction and Gustation*, John Wiley & Sons, Ltd, pp. 93–108.
- [41] Pelosi, P., Iovinella, I., Felicioli, A., and Dani, F.R., 2014, Soluble proteins of chemical communication: an overview across arthropods, *Frontiers in Physiology*, 5.
- [42] Hanchate, N.K., Kondoh, K., Lu, Z., Kuang, D., Ye, X., Qiu, X., et al., 2015, Single-cell transcriptomics reveals receptor transformations during olfactory neurogenesis, *Science*, 350 (6265), 1251–1255.
- [43] Pietra, G., Dibattista, M., Menini, A., Reisert, J., and Boccaccio, A., 2016, The Ca²⁺-activated Cl[−] channel TMEM16B regulates action potential firing and axonal targeting in olfactory sensory neurons, *Journal of General Physiology*, 148 (4), 293–311.
- [44] Silva, N.A., Cooke, M.J., Tam, R.Y., Sousa, N., Salgado, A.J., Reis, R.L., et al., 2012, The effects of peptide modified gellan gum and olfactory ensheathing glia cells on neural stem/progenitor cell fate, *Biomaterials*, 33 (27), 6345–6354.
- [45] Huard, J.M.T., Youngentob, S.L., Goldstein, B.J., Luskin, M.B., and Schwob, J.E., 1998, Adult olfactory epithelium contains multipotent progenitors that give rise to neurons and non-neural cells, *Journal of Comparative Neurology*, 400 (4), 469–486.
- [46] Holbrook, E.H., Szumowski, K.E.M., and Schwob, J.E., 1995, An immunochemical, ultrastructural, and developmental characterization of the horizontal basal cells of rat olfactory epithelium, *The Journal of Comparative Neurology*, 363 (1), 129–146.
- [47] Weng, P.-L., Vinjamuri, M., and Ovitt, C.E., 2016, Ascl3 transcription factor marks a distinct progenitor lineage for non-neuronal support cells in the olfactory epithelium, *Scientific Reports*, 6 (1), 38199.
- [48] Leung, C.T., Coulombe, P.A., and Reed, R.R., 2007, Contribution of olfactory neural stem cells to tissue maintenance and regeneration, *Nature Neuroscience*, 10 (6), 720–726.
- [49] Caggiano, M., Kauer, J.S., and Hunter, D.D., 1994, Globose basal cells are neuronal progenitors in the olfactory epithelium: A lineage analysis using a replication-incompetent retrovirus, *Neuron*, 13 (2), 339–352.
- [50] Schwob, J.E., Youngentob, S.L., and Mezza, R.C., 1995, Reconstitution of the rat olfactory epithelium after methyl bromide-induced lesion, *Journal of Comparative Neurology*, 359 (1), 15–37.

- [51] Petreanu, L. and Alvarez-Buylla, A., 2002, Maturation and Death of Adult-Born Olfactory Bulb Granule Neurons: Role of Olfaction, *Journal of Neuroscience*, 22 (14), 6106–6113.
- [52] Imamura, F., Ito, A., and LaFever, B.J., 2020, Subpopulations of Projection Neurons in the Olfactory Bulb, *Frontiers in Neural Circuits*, 14.
- [53] Kosaka, T. and Kosaka, K., 2009, Olfactory Bulb Anatomy. in: L.R. Squire (Ed.), *Encyclopedia of Neuroscience*, Academic Press, Oxfordpp. 59–69.
- [54] Brill, M.S., Ninkovic, J., Winpenny, E., Hodge, R.D., Ozen, I., Yang, R., et al., 2009, Adult generation of glutamatergic olfactory bulb interneurons, *Nature Neuroscience*, 12 (12), 1524–1533.
- [55] Miyamichi, K., Amat, F., Moussavi, F., Wang, C., Wickersham, I., Wall, N.R., et al., 2011, Cortical representations of olfactory input by trans-synaptic tracing, *Nature*, 472 (7342), 191–196.
- [56] Chaker, Z., Codega, P., and Doetsch, F., 2016, A mosaic world: puzzles revealed by adult neural stem cell heterogeneity, *WIREs Developmental Biology*, 5 (6), 640–658.
- [57] Masurkar, A.V. and Chen, W.R., 2009, Olfactory Bulb Physiology. in: L.R. Squire (Ed.), *Encyclopedia of Neuroscience*, Academic Press, Oxfordpp. 77–86.
- [58] Price, J.L., 2009, Olfactory Higher Centers Anatomy. in: L.R. Squire (Ed.), *Encyclopedia of Neuroscience*, Academic Press, Oxfordpp. 129–136.
- [59] Liu, P., Gao, C., Wu, J., Wu, T., Zhang, Y., Liu, C., et al., 2023, Negative valence encoding in the lateral entorhinal cortex during aversive olfactory learning, *Cell Reports*, 42 (10), 113204.
- [60] Bothwell, A.R., Resnick, S.M., Ferrucci, L., and Tian, Q., 2023, Associations of olfactory function with brain structural and functional outcomes, A systematic review, *Ageing Research Reviews*. 92 102095.
- [61] Brunert, D., Medinaceli Quintela, R., and Rothermel, M., 2023, The anterior olfactory nucleus revisited – An emerging role for neuropathological conditions?, *Progress in Neurobiology*, 228 102486.
- [62] Persson, B.M., Ambrozova, V., Duncan, S., Wood, E.R., O'Connor, A.R., and Ainge, J.A., 2022, Lateral entorhinal cortex lesions impair odor-context associative memory in male rats, *Journal of Neuroscience Research*, 100 (4), 1030–1046.
- [63] Jurkowski, M.P., Bettio, L., K. Woo, E., Patten, A., Yau, S.-Y., and Gil-Mohapel, J., 2020, Beyond the Hippocampus and the SVZ: Adult Neurogenesis Throughout the Brain, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14.
- [64] Mirzadeh, Z., Merkle, F.T., Soriano-Navarro, M., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A., 2008, Neural Stem Cells Confer Unique Pinwheel Architecture to the Ventricular Surface in Neurogenic Regions of the Adult Brain, *Cell Stem Cell*, 3 (3), 265–278.
- [65] Johansson, C.B., Momba, S., Clarke, D.L., Risling, M., Lendahl, U., and Frisén, J., 1999, Identification of a Neural Stem Cell in the Adult Mammalian Central Nervous System, *Cell*, 96 (1), 25–34.
- [66] Lehtinen, M.K., Zappaterra, M.W., Chen, X., Yang, Y.J., Hill, A.D., Lun, M., et al., 2011, The Cerebrospinal Fluid Provides a Proliferative Niche for Neural Progenitor Cells, *Neuron*, 69 (5), 893–905.
- [67] Mercier, F., Kitasako, J.T., and Hatton, G.I., 2002, Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: Fractones and the fibroblast/macrophage network, *Journal of Comparative Neurology*, 451 (2), 170–188.
- [68] Kaneko, N., Sawada, M., and Sawamoto, K., 2017, Mechanisms of neuronal migration in the adult brain, *Journal of Neurochemistry*, 141 (6), 835–847.

- [69] Yagita, Y., Sakurai, T., Tanaka, H., Kitagawa, K., Colman, D.R., and Shan, W., 2009, N-cadherin mediates interaction between precursor cells in the subventricular zone and regulates further differentiation, *Journal of Neuroscience Research*, 87 (15), 3331–3342.
- [70] Shinohara, R., Thumkeo, D., Kamijo, H., Kaneko, N., Sawamoto, K., Watanabe, K., et al., 2012, A role for mDia, a Rho-regulated actin nucleator, in tangential migration of interneuron precursors, *Nature Neuroscience*, 15 (3), 373–380.
- [71] Dityatev, A., Seidenbecher, C.I., and Schachner, M., 2010, Compartmentalization from the outside: the extracellular matrix and functional microdomains in the brain, *Trends in Neurosciences*, 33 (11), 503–512.
- [72] Kaneko, N., Marin, O., Koike, M., Hirota, Y., Uchiyama, Y., Wu, J.Y., et al., 2010, New Neurons Clear the Path of Astrocytic Processes for Their Rapid Migration in the Adult Brain, *Neuron*, 67 (2), 213–223.
- [73] Kirschenbaum, B., Doetsch, F., Lois, C., and Alvarez-Buylla, A., 1999, Adult Subventricular Zone Neuronal Precursors Continue to Proliferate and Migrate in the Absence of the Olfactory Bulb, *The Journal of Neuroscience*, 19 (6), 2171–2180.
- [74] Iversen, K., Beaubien, F., Prince, J.E.A., and Cloutier, J.-F., 2020, Chapter 7 - Axon guidance: Slit–Robo signaling. in: J. Rubenstein, P. Rakic, B. Chen, K.Y. Kwan, A. Kolodkin, E. Anton (Eds.), *Cellular Migration and Formation of Axons and Dendrites* (Second Edition), Academic Press, pp. 147–173.
- [75] Yan, Y.-P., Sailor, K.A., Lang, B.T., Park, S.-W., Vemuganti, R., and Dempsey, R.J., 2007), Monocyte Chemoattractant Protein-1 Plays a Critical Role in Neuroblast Migration after Focal Cerebral Ischemia, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 27 (6), 1213–1224.
- [76] Ng, K.L., Li, J.-D., Cheng, M.Y., Leslie, F.M., Lee, A.G., and Zhou, Q.-Y., 2005, Dependence of Olfactory Bulb Neurogenesis on Prokineticin 2 Signaling, *Science*, 308 (5730), 1923–1927.
- [77] Li, W.L., Chu, M.W., Wu, A., Suzuki, Y., Imayoshi, I., and Komiyama, T., 2018, Adult-born neurons facilitate olfactory bulb pattern separation during task engagement, *ELife*, 7 e33006.
- [78] Saghatelian, A., de Chevigny, A., Schachner, M., and Lledo, P.-M., 2004, Tenascin-R mediates activity-dependent recruitment of neuroblasts in the adult mouse forebrain, *Nature Neuroscience*, 7 (4), 347–356.
- [79] Rothermel, M. and Wachowiak, M., 2014, Functional imaging of cortical feedback projections to the olfactory bulb, *Frontiers in Neural Circuits*, 8.
- [80] Coupe, B. and Bouret, S.G., 2013, Development of the Hypothalamic Melanocortin System, *Frontiers in Endocrinology*, 4.
- [81] Catania, A., Airaghi, L., Colombo, G., and Lipton, J.M., 2000, α -Melanocyte-stimulating Hormone in Normal Human Physiology and Disease States, *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 11 (8), 304–308.
- [82] Siljee-Wong, J.E., 2011, Melanocortin MC4 receptor expression sites and local function, *European Journal of Pharmacology*, 660 (1), 234–240.
- [83] Xia, Y., Wikberg, J.E.S., and Chhajlani, V., 1995, Expression of melanocortin 1 receptor in periaqueductal gray matter, *NeuroReport*, 6 (16), 2193.
- [84] Star, R.A., Rajora, N., Huang, J., Stock, R.C., Catania, A., and Lipton, J.M., 1995, Evidence of autocrine modulation of macrophage nitric oxide synthase by alpha-melanocyte-stimulating hormone, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92 (17), 8016–8020.

- [85] Slominski, A., Ermak, G., and Mihm, M., 1996, ACTH receptor, CYP11A1, CYP17 and CYP21A2 genes are expressed in skin, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 81 (7), 2746–2749.
- [86] Boston, B.A., 1999, The Role of Melanocortins in Adipocyte Function, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 885 (1), 75–84.
- [87] Gantz, I., Konda, Y., Tashiro, T., Shimoto, Y., Miwa, H., Munzert, G., et al., 1993, Molecular cloning of a novel melanocortin receptor, *Journal of Biological Chemistry*, 268 (11), 8246–8250.
- [88] Getting, S.J. and Perretti, M., 2000, MC3-R as a novel target for anti-inflammatory therapy, *Drug News & Perspectives*, 13 (1), 19–27.
- [89] Yeo, G.S.H., Farooqi, I.S., Aminian, S., Halsall, D.J., Stanhope, R.G., and O’Rahilly, S., 1998, A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity, *Nature Genetics*, 20 (2), 111–112.
- [90] Giuliani, D., Ottani, A., Neri, L., Zaffe, D., Grieco, P., Jochem, J., et al., 2017, Multiple beneficial effects of melanocortin MC4 receptor agonists in experimental neurodegenerative disorders: Therapeutic perspectives, *Progress in Neurobiology*, 148 40–56.
- [91] Martin, W.J. and MacIntyre, D.E., 2004, Melanocortin Receptors and Erectile Function, *European Urology*, 45 (6), 706–713.
- [92] Chen, W., Kelly, M.A., Opitz-Araya, X., Thomas, R.E., Low, M.J., and Cone, R.D., 1997, Exocrine Gland Dysfunction in MC5-R-Deficient Mice: Evidence for Coordinated Regulation of Exocrine Gland Function by Melanocortin Peptides, *Cell*, 91 (6), 789–798.
- [93] Taylor, A. and Namba, K., 2001, In vitro induction of CD25+ CD4+ regulatory T cells by the neuropeptide alpha-melanocyte stimulating hormone (α -MSH), *Immunology & Cell Biology*, 79 (4), 358–367.
- [94] Schiöth, H.B., Kuusinen, A., Muceniece, R., Szardenings, M., Keinänen, K., and Wikberg, J.E.S., 1996, Expression of Functional Melanocortin 1 Receptors in Insect Cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 221 (3), 807–814.
- [95] Goit, R.K., Taylor, A.W., and Lo, A.C.Y., 2022, The central melanocortin system as a treatment target for obesity and diabetes: A brief overview, *European Journal of Pharmacology*, 924 174956.
- [96] Clément, K., Akker, E. van den, Argente, J., Bahm, A., Chung, W.K., Connors, H., et al., 2020, Efficacy and safety of setmelanotide, an MC4R agonist, in individuals with severe obesity due to LEPR or POMC deficiency: single-arm, open-label, multicentre, phase 3 trials, *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 8 (12), 960–970.
- [97] Brzoska, T., Luger, T.A., Maaser, C., Abels, C., and Bohm, M., 2008, α -Melanocyte-Stimulating Hormone and Related Tripeptides: Biochemistry, Antiinflammatory and Protective Effects in Vitro and in Vivo, and Future Perspectives for the Treatment of Immune-Mediated Inflammatory Diseases, 22.
- [98] Lipton, J.M., Ceriani, G., Macaluso, A., McCOY, D., Carnes, K., Biltz, J., et al., 1994, Antiinflammatory Effects of the Neuropeptide α -MSH in Acute, Chronic, and Systemic Inflammation, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 741 (1), 137–148.
- [99] Glyn, J.R. and Lipton, J.M., 1981, Hypothermic and antipyretic effects of centrally administered ACTH (1–24) and α -melanotropin, *Peptides*, 2 (2), 177–187.
- [100] Forslin Aronsson, Å., Spulber, S., Popescu, L.M., Winblad, B., Post, C., Oprica, M., et al., 2006, α -Melanocyte-stimulating hormone is neuroprotective in rat global cerebral ischemia, *Neuropeptides*, 40 (1), 65–75.
- [101] Giuliani, D., Neri, L., Canalini, F., Calevro, A., Ottani, A., Vandini, E., et al., 2015, NDP- α -MSH induces intense neurogenesis and cognitive recovery in Alzheimer

- transgenic mice through activation of melanocortin MC4 receptors, *Molecular and Cellular Neuroscience*, 67 13–21.
- [102] Giuliani, D., Bitto, A., Galantucci, M., Zaffe, D., Ottani, A., Irrera, N., et al., 2014, Melanocortins protect against progression of Alzheimer's disease in triple-transgenic mice by targeting multiple pathophysiological pathways, *Neurobiology of Aging*, 35 (3), 537–547.
- [103] van Denderen, J.C.M., van Wieringen, G.W., Hillen, B., and Bleys, R.L.A.W., 2001, Zinc sulphate-induced anosmia decreases the nerve fibre density in the anterior cerebral artery of the rat, *Autonomic Neuroscience*, 94 (1–2), 102–108.
- [104] Yang, Z., Ming, G., and Song, H., 2011, Postnatal Neurogenesis in the Human Forebrain: From Two Migratory Streams to Dribbles, *Cell Stem Cell*, 9 (5), 385–386.
- [105] An, Y., Guan, X., Ni, Y., Zhao, Y., Chen, Z., Chen, Y., et al., 2020, Reversible olfactory dysfunction impaired learning and memory with impaired hippocampal synaptic plasticity and increased corticosterone release in mice, *Neurochemistry International*, 138 104774.
- [106] Masini, C.V., Garcia, R.J., Sasse, S.K., Nyhuis, T.J., Day, H.E.W., and Campeau, S., 2010, Accessory and main olfactory systems influences on predator odor-induced behavioral and endocrine stress responses in rats, *Behavioural Brain Research*, 207 (1), 70–77.
- [107] Carr, W.J., Yee, L., Gable, D., and Marasco, E., 1976, Olfactory recognition of conspecifics by domestic Norway rats, *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 90 821–828.
- [108] Castro, A.A., Ghisoni, K., Latini, A., Quevedo, J., Tasca, C.I., and Prediger, R.D.S., 2012, Lithium and valproate prevent olfactory discrimination and short-term memory impairments in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) rat model of Parkinson's disease, *Behavioural Brain Research*, 229 (1), 208–215.
- [109] Schindelin, J., Rueden, C.T., Hiner, M.C., and Eliceiri, K.W., 2015, The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis, *Molecular Reproduction and Development*, 82 (7–8), 518–529.
- [110] Alberts, J.R. and Galef, B.G., 1971, Acute anosmia in the rat: A behavioral test of a peripherally-induced olfactory deficit, *Physiology & Behavior*, 6 (5), 619–621.
- [111] Burd, G.D., 1993, Morphological study of the effects of intranasal zinc sulfate irrigation on the mouse olfactory epithelium and olfactory bulb, *Microscopy Research and Technique*, 24 (3), 195–213.
- [112] Noda, T., Shiga, H., Yamada, K., Harita, M., Nakamura, Y., Ishikura, T., et al., 2019, Effects of Tokishakuyakusan on Regeneration of Murine Olfactory Neurons In Vivo and In Vitro, *Chemical Senses*, 44 (5), 327–338.
- [113] Schwob, J.E., Jang, W., Holbrook, E.H., Lin, B., Herrick, D.B., Peterson, J.N., et al., 2017, Stem and progenitor cells of the mammalian olfactory epithelium: Taking poietic license: Stem and progenitor cells of the Mammalian OE, *Journal of Comparative Neurology*, 525 (4), 1034–1054.
- [114] Williams, S.K., Gilbey, T., and Barnett, S.C., 2004, Immunohistochemical Studies of the Cellular Changes in the Peripheral Olfactory System After Zinc Sulfate Nasal Irrigation, *Neurochemical Research*, 29 (5), 891–901.
- [115] Gonzalez, P.V., Schiöth, H.B., Lasaga, M., and Scimonelli, T.N., 2009, Memory impairment induced by IL-1 β is reversed by α -MSH through central melanocortin-4 receptors, *Brain, Behavior, and Immunity*, 23 (6), 817–822.

- [116] Jang, W., Kim, K.P., and Schwob, J.E., 2007, Nonintegrin laminin receptor precursor protein is expressed on olfactory stem and progenitor cells, *Journal of Comparative Neurology*, 502 (3), 367–381.
- [117] Schwob, J.E., Costanzo, R.M., and Youngentob, S.L., 2020, 3.28 - Regeneration of the Olfactory Epithelium. in: B. Fritzsch (Ed.), *The Senses: A Comprehensive Reference* (Second Edition), Elsevier, Oxfordpp. 565–590.
- [118] Ducray, A., Bondier, J.-R., Michel, G., Bon, K., Propper, A., and Kastner, A., 2002, Recovery following peripheral destruction of olfactory neurons in young and adult mice, *European Journal of Neuroscience*, 15 (12), 1907–1917.
- [119] Voloboueva, L.A. and Giffard, R.G., 2011, Inflammation, Mitochondria and the Inhibition of Adult Neurogenesis, *Journal of Neuroscience Research*, 89 (12), 1989–1996.
- [120] Zhang, Y., Wang, J., Zhang, D., Lu, Z., and Man, J., 2020, Effects of RO27-3225 on neurogenesis, PDGFR β ⁺ cells and neuroinflammation after cerebral infarction, *International Immunopharmacology*, 81 106281.
- [121] Ma, K. and McLaurin, J., 2017, α -Melanocyte Stimulating Hormone as a Potential Therapy for Alzheimer's Disease, *Current Alzheimer Research*, 14 (1), 18–29.
- [122] Wang, W., Lu, S., Li, T., Pan, Y.-W., Zou, J., Abel, G.M., et al., 2015, Inducible Activation of ERK5 MAP Kinase Enhances Adult Neurogenesis in the Olfactory Bulb and Improves Olfactory Function, *Journal of Neuroscience*, 35 (20), 7833–7849.
- [123] Perez-Asensio, F.J., Perpiñá, U., Planas, A.M., and Pozas, E., 2013, Interleukin-10 regulates progenitor differentiation and modulates neurogenesis in adult brain, *Journal of Cell Science*, 126 (18), 4208–4219.
- [124] Gonçalves, R.C., Carvalho, C.C., Michels, M., Abatti, M.R., Manfredini, A., Silva, M.C., et al., 2022, Detailed Characterization of Brain Dysfunction in a Long-Term Rodent Model of Critical Illness, *Neurochemical Research*, 47 (3), 613–621.
- [125] Hosein, W. and Henkin, R.I., 2022, Therapeutic diminution of Interleukin-10 with intranasal theophylline administration in hyposmic patients, *American Journal of Otolaryngology*, 43 (2), 103375.
- [126] Redondo, P., García-Foncillas, J., Okroujnov, I., and Bandrés, E., 1998, α -MSH regulates interleukin-10 expression by human keratinocytes, *Archives of Dermatological Research*, 290 (8), 425–428.
- [127] Lipton, J.M., Zhao, H., Ichiyama, T., Barsh, G.S., and Catania, A., 1999, Mechanisms of Antiinflammatory Action of α -MSH Peptides: In Vivo and in Vitro Evidence, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 885 (1), 173–182.
- [128] Kiyota, T., Ingraham, K.L., Swan, R.J., Jacobsen, M.T., Andrews, S.J., and Ikezu, T., 2012, AAV serotype 2/1-mediated gene delivery of anti-inflammatory interleukin-10 enhances neurogenesis and cognitive function in APP+PS1 mice, *Gene Therapy*, 19 (7), 724–733.
- [129] Beecher, K., St John, J., and Chehrehasa, F., 2018, Factors that modulate olfactory dysfunction, *Neural Regeneration Research*, 13 (7), 1151.
- [130] Tabakman, R., Lecht, S., Sephanova, S., Arien-Zakay, H., and Lazarovici, P., 2004, Interactions between the cells of the immune and nervous system: neurotrophins as neuroprotection mediators in CNS injury. in: *Progress in Brain Research*, Elsevier, pp. 385–401.
- [131] Minnone, G., De Benedetti, F., and Bracci-Laudiero, L., 2017, NGF and Its Receptors in the Regulation of Inflammatory Response, *International Journal of Molecular Sciences*, 18 (5), 1028.

- [132] Bracci-Laudiero, L., Aloe, L., Caroleo, M.C., Buanne, P., Costa, N., Starace, G., et al., 2005, Endogenous NGF regulates CGRP expression in human monocytes, and affects HLA-DR and CD86 expression and IL-10 production, *Blood*, 106 (10), 3507–3514.
- [133] Jo, H., Jung, M., Seo, D.J., and Park, D.J., 2015, The effect of rat bone marrow derived mesenchymal stem cells transplantation for restoration of olfactory disorder, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 467 (2), 395–399.
- [134] Ramírez, D., Saba, J., Carniglia, L., Durand, D., Lasaga, M., and Caruso, C., 2015, Melanocortin 4 receptor activates ERK-cFos pathway to increase brain-derived neurotrophic factor expression in rat astrocytes and hypothalamus, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 411 28–37.
- [135] Xu, Z., Gao, Y., and Xu, F., 2013, Deficits of peripheral olfactory inputs reduce cell proliferation in the adult subventricular and subgranular zones, *Neuroscience Letters*, 541 269–274.
- [136] Takahashi, K., Tsuji, M., Nakagawasai, O., Katsuyama, S., Hong, L., Miyagawa, K., et al., 2023, Donepezil prevents olfactory dysfunction and α -synuclein aggregation in the olfactory bulb by enhancing autophagy in zinc sulfate-treated mice, *Behavioural Brain Research*, 438 114175.
- [137] Chen, R., Lin, C., You, Y., and Liu, F., 2012, Characterization of immature and mature 5-hydroxytryptamine 3A receptor-expressing cells within the adult SVZ–RMS–OB system, *Neuroscience*, 227 180–190.
- [138] Alonso, M., Viollet, C., Gabellec, M.-M., Meas-Yedid, V., Olivo-Marin, J.-C., and Lledo, P.-M., 2006, Olfactory Discrimination Learning Increases the Survival of Adult-Born Neurons in the Olfactory Bulb, *Journal of Neuroscience*, 26 (41), 10508–10513.
- [139] Chai, B., Li, J.-Y., Zhang, W., Newman, E., Ammori, J., and Mulholland, M.W., 2006, Melanocortin-4 receptor-mediated inhibition of apoptosis in immortalized hypothalamic neurons via mitogen-activated protein kinase, *Peptides*, 27 (11), 2846–2857.
- [140] Dhungel, S., Masaoka, M., Rai, D., Kondo, Y., and Sakuma, Y., 2011, Both olfactory epithelial and vomeronasal inputs are essential for activation of the medial amygdala and preoptic neurons of male rats, *Neuroscience*, 199 225–234.
- [141] Kauer, S.D., Allmond, J.T., Belnap, S.C., and Brumley, M.R., 2016, Maternal behavior influences development of a reflexive action pattern in the newborn rat, *Developmental Psychobiology*, 58 (8), 1043–1054.