

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KETOJENİK DİYETİN YAŞLI SIÇANLARDA AQUAPORİN-4
(AQP4) ARACILI GLİMFATİK SİSTEM ÜZERİNDEKİ
ETKİSİNDE BAĞIRSAK MİKROBİYOTASININ ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI**

RABİA ILGIN

ORCID: 0000-0002-9759-7485

100/2000 YÖK DOKTORA BURSUSU

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

İZMİR

HAZİRAN 2023

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2018970002

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KETOJENİK DİYETİN YAŞLI SIÇANLARDA AQUAPORİN-4
(AQP4) ARACILI GLİMFATİK SİSTEM ÜZERİNDEKİ
ETKİSİNDE BAĞIRSAK MİKROBİYOTASININ ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI**

RABİA ILGIN
ORCID: 0000-0002-2348-7427
100/2000 YÖK DOKTORA BURS
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ferda Ulviye HOŞGÖRLER

ORCID: 0000-0001-6846-5312

2. Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nazan Uysal HARZADIN

ORCID: 0000-0002-2348-7427

**Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından TDK-2022-2753 proje numarası ile desteklenmiştir.**

İZMİR
HAZİRAN 2023

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

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum **“Ketojenik Diyetin Yaşlı Sıçanlarda Aquaporin-4 (AQP4) Aracılı Glimfatik Sistem Üzerindeki Etkisinde Bağırsak Mikrobiyotasının Rolünün Araştırılması”** başlıklı Doktora tezim için elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğim değerlendirme ve sonuçları bilimsel ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Rabia ILGIN

İmza:

İÇİNDEKİLER

TABLolar DİZİNİ.....	i
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ii
KISALTMALAR.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vii
1 GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
1.1 Problemin Tanımı ve Önemi.....	7
1.2 Araştırmanın Amacı	9
1.3 Araştırmanın Hipotezleri.....	9
2 GENEL BİLGİLER.....	10
2.1 Yaşlanan Beyin ve Nörodejeneratif Hastalıklar	10
2.2 Beynin Sıvı Kompartmanları.....	11
2.2.1 Beyin Omurilik Sıvısı (BOS).....	11
2.2.1.1 BOS Üretimi ve Dolaşımı.....	11
2.2.2 Beyin İnterstisyel Sıvısı (ISF).....	13
2.3 Beyin Damarları ve Perivasküler Boşluk.....	14
2.4 Astrositler ve Astrositik Son Ayaklar.....	15
2.5 Glimfatik Sistem.....	16
2.5.1 Glimfatik Sistem Anatomisi.....	17
2.5.2 Aquaporin-4 (AQP4) su kanalları.....	18

2.5.2.1 Hipokampus ve AQP4.....	19
2.5.2.2 Serebellum ve AQP4.....	19
2.5.3 Glimfatik Sistemi Etkileyen Faktörler.....	20
2.5.3.1 Yaşlanma.....	20
2.5.3.2 Uyku, Vücut Postürü, Egzersiz ve Diyet.....	21
2.6. Ketojenik Diyet.....	22
2.6.1 Tarihçesi.....	22
2.6.2 Keton Oluşumu ve Ketojenik Diyetin Etki Mekanizması.....	23
2.6.3 Ketojenik Diyetin Nöroprotektif Etkileri.....	25
2.6.3.1 Ketojenik Diyetin Aβ Plakları Üzerindeki Etkileri.....	25
2.7 Beyin Bağırsak Aksı.....	26
2.7.1 Bağırsak Mikrobiyota Değişimleri ve Normal Yaşlanma Süreçleri.....	27
2.7.2 Bağırsak Disbiyosiz ve Kognitif Disfonksiyon.....	28
2.7.3 Antibiyotik Kullanımı ve Kognitif Fonksiyon.....	28
3 GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1 Araştırmanın tipi	29
3.2 Araştırmanın yeri ve zamanı	29
3.3 Araştırmanın evreni ve örnekleme	30
3.4 Çalışma materyali	30
3.5 Araştırmanın değişkenleri.....	31
3.6 Veri toplama araçları.....	31
3.6.1 Çalışma Grupları.....	31
3.6.2 Ketojenik diyet uygulaması	32
3.6.3 Antibiyotik uygulaması.....	33

3.6.4 Morris su tankı testi	33
3.6.5 Anksiyete Benzeri Davranışların Değerlendirilmesi.....	34
3.6.5.1 Açık alan testi	34
3.6.5.2 Yükseltilmiş artı labirent testi	35
3.6.6 Sakrifikasyon, serum ve doku örneklerinin toplanması.....	35
3.6.6.1 Doku homojenatlarının ve serumun hazırlanması.....	35
3.6.7 Biyokimyasal analizler.....	36
3.6.7.1 Kan Keton (β -Hidroksibütirat) ve Glukozu ölçümü	36
3.6.7.2 Kan lipid profili, Alanin Aminotransferaz (ALT), Aspartat Aminotransferaz (AST), ürik asit ölçümü.....	36
3.6.7.3 Amiloid Beta- 42 (A β 42) ölçümü.....	36
3.6.7.4 Aquaporin-4 (AQP4) ölçümü	38
3.6.7.5 BCA protein analizi.....	40
3.6.8 İntrasisternal yolla izleyici (tracer) maddenin beyin içine infüzyonunun yapılması.....	41
3.6.9. Beyin kesitlerinin hazırlanması.....	42
3.6.9.1 İzleyici floresan maddenin beyine nüfuzu, DAPI ile boyanması ve floresan mikroskopla görüntülenmesi.....	43
3.6.9.2 Glial Fibril Asidik Protein (GFAP) ve Aquaporin-4 (AQP4)'ün immunofloresan boyanması ve görüntülenmesi.....	43
3.7 Verilerin değerlendirilmesi.....	45
3.8 Araştırmanın sınırlılıkları	45
3.9 Etik Kurul Onayı.....	46
4 BULGULAR.....	46

4.1 Vücut Ağırlığı ve Ortalama Günlük Alınan Enerji Miktarı ve Gaita Renk Değişimi.....	46
4.2 Davranış Deneylerinin Bulguları.....	47
4.2.1. Morris Su Tankı Bulguları.....	47
4.2.2 Açık Alan Testi Bulguları.....	49
4.2.3 Yükseltilmiş Artı Labirent Testi Bulguları.....	51
4.3 Biyokimyasal Analiz Sonuçları.....	52
4.3.1 Kan BHB, Glukoz, Lipit Profili, AST, ALT ve Ürik Asit Seviyeleri.....	52
4.3.2 Diyet Gruplarında Hipokampus, Serebellum AQP4 Su Kanalı ve A β ₁₋₄₂ Protein Seviyeleri ve Serum A β ₁₋₄₂ Protein Seviyeleri.....	54
4.3.3 Antibiyotik Gruplarında Hipokampus, Serebellumda AQP4 Su Kanalı ve A β ₁₋₄₂ Protein Seviyeleri ve Serum A β ₁₋₄₂ Protein Seviyeleri.....	55
4.4 İmmunofloresan Boyama Sonuçları.....	56
4.4.1 Diyet Gruplarında Hipokampus ve Serebellumda AQP4 Su Kanalı ve Glial Fibriler Asidik Proteinin (GFAP) İmmunofloresan Yoğunluğu.....	56
4.4.2 Antibiyotik Gruplarında Hipokampus ve Serebellumda AQP4 Su Kanalı ve Glial Fibriler Asidik Proteinin (GFAP) İmmunofloresan Yoğunluğu.....	59
4.5 İzleyici (Tracer) Floresan Maddenin Beyin Korteksine Penetrasyonu.....	62
5 TARTIŞMA.....	65
6 SONUÇ VE ÖNERİLER.....	73
7 KAYNAKLAR.....	75
8 EKLER.....	102
EK-1 Etik Kurul Onayı	103
EK-2 Özgeçmiş	104

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo-1: Normal plazma ve BOS içeriği.....	12
Tablo-2: Araştırma planı ve takvimi.....	29
Tablo-3: Ketojenik diyet (KD) ve standard diyet (SD) besin taşlarının enerji yüzdeleri.....	32
Tablo-4: Diyet grupları için biyokimyasal ölçümler.....	53
Tablo-5: Antibiyotik grupları için biyokimyasal ölçümler.....	54
Tablo-6: Tez çalışmasında kullanılan sarf malzemeler.....	64



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil- 1: Beyin omurilik sıvısı (BOS) dolaşımı.....	13
Şekil-2: AQP4'ün asrtosit son ayağında yerleşimi.....	17
Şekil-3: Yaşlı ve gençte glimfatik sistem fonksiyonu.....	24
Şekil- 4: Haftalık vücut ağırlığı değişimi.....	46
Şekil- 5: Ortalama alınan kalori miktarı ve günlük tüketilen yem miktarı değişimi...	47
Şekil- 6: Diyet ve antibiyotik tedavisi sonrası gaita renk değişimi.....	47
Şekil-7: Morris su tankı testinde dört günlük platformu bulma süreleri.....	48
Şekil- 8: Morris su tankı probe testi. Beşinci gün platformun olduğu hedef kadranda ve karşı kadranda geçirilen zaman.....	49
Şekil- 9: Açık Alan Testi Bulguları.....	50
Şekil- 10: Yükseltilmiş artı labirent test bulguları.....	51
Şekil-11: Diyet gruplarında AQP4 ve Aβ1-42 seviyeleri.....	55
Şekil-12: Antibiyotik gruplarında AQP4 ve Aβ1-42 seviyeleri.....	56
Şekil- 13: Diyet gruplarında hipokampus ve serebellumda ortalama GFAP floresan yoğunluğu (40X lazer taramalı konfokal mikroskop görüntüsü) Bar 20µm.....	57
Şekil- 14: Diyet gruplarında hipokampus ve serebellumda ortalama AQP4 floresan yoğunluğu (40X lazer taramalı konfokal mikroskop görüntüsü) Bar 20µm.....	58
Şekil-15: Antibiyotik gruplarında hipokampus ve serebellumda ortalama GFAP floresan yoğunluğu (40X lazer taramalı konfokal mikroskop görüntüsü) Bar 20µm.....	60
Şekil-16: Antibiyotik gruplarında hipokampus ve serebellumda ortalama AQP4 floresan yoğunluğu (40X lazer taramalı konfokal mikroskop görüntüsü) Bar 20µm.....	61
Şekil-17: FITC-500 tracer maddenin beyine penetrasyonu (10x motorize floresan mikroskop görüntüsü) Bar 200 pixel (DAPI: mavi FITC-500: yeşil).....	63

SİMGELER VE KISALTMALAR

A β : amiloid beta

AH: Alzheimer hastalığı

ALT: Alanin Aminotrasferaz enzimi

AST: Aspartat Aminotransferaz enzimi

AQP4: Astrositik aquaporin-4

BHB: Beta hidroksi bütirat

BOS: Beyin omurilik sıvısı

EVOO: Extra virgin olive oil (Erken hasta sızma zeytinyağı)

GFAP: Glial fibril asidik protein

HDL: Yüksek yoğunluklu lipoprotein

ISF: İnterstitial fluid (İnterstisyel Sıvı)

LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein

LTD: Long term depression (Uzun süreli depresyon)

LTP: Long term potentiation(Uzun süreli güçlendirme)

KBB: Kan beyin bariyeri

KD: Ketojenik Diyet

KZY: Kısa zincirli yağ asidi

MSS: Merkezi sinir sistemi

NDH: Nörodejeneratif hastalıklar

SKA: Serebral kan akışı

PH: Parkinson hastalığı

TBH: Travmatik beyin hasarı

TG: Trigliserit

TK: Total kolesterol

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamda, bilgisini ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim başta emekli olan danışman hocam Prof. Dr. Nazan Uysal HARZADIN'a ve içtenlikle bana yardım eden danışman hocam Doç. Dr. Ferda Ulviye HOŞGÖRLER'e,

Çalışmamın başından sonuna kadar her zaman yanımda olan, yetersiz kaldığımı hissettiğimde bilgisiyle aydınlatan, fikir veren, beni araştırmaya ve çalışmaya teşvik eden değerli hocam Prof. Dr. Mehmet ATEŞ'e,

Biyokimyasal araştırmalarımızı yapan ve her zaman yardımımıza koşan sevgili hocam Doç. Dr. Servet KIZILDAĞ'a, tecrübesiyle bana yardım eden Dr. Sevim KANDİŞ'e,

Hayvan deneylerimde yardımına gelen Dr. Güner ÇALIŞ'a ve Fizyoloji'deki abimiz Ferhan ORAL'a teşekkürü bir borç bilirim.

Aynı zamanda tezime maddi ve manevi destek veren TUAY ANADOLU YATIRIM Genel Müdürü Eczacı Atilla TOTOŞ Bey'e teşekkür ederim.

Bu süreçte maddi ve manevi olarak her zaman yanımda olan canım arkadaşım Nazlı ARSLAN'a, stresimi azaltan ve sevincimi paylaşan ve beni her koşulda destekleyen canım annem ve babam ve canım kardeşlerime çok teşekkür ederim. Sizi çok seviyorum.

Son olarak canım dedem sonunda doktoramı bitiriyorum beni gördüğünü bilerek mutluyum ve seni çok seviyorum.

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2022-2753 proje numarası ile desteklenmiştir.

**KETOJENİK DİYETİN, YAŞLI SIÇANLARDA AQUAPORİN-4 (AQP4)
ARACILI GLİMFATİK SİSTEM ÜZERİNDEKİ ETKİSİNDE BAĞIRSAK
MİKROBİYOTASININ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

Rabia ILGIN

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

100/2000 YÖK Doktora Bursu

Fizyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Yaşlanma, nörodejeneratif hastalıkların (NDH) gelişiminde en önemli risk faktörlerinden biridir. Ketojenik diyet (KD) yüksek yağlı, orta miktarda protein ve düşük karbonhidrat içerikli diyet tipidir ve NDH'ye neden olan A β gibi toksik proteinleri azalttığı bilinmektedir ancak mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu çalışmanın amacı, zeytinyağlı KD'nin yaşlı sıçanlarda AQP4 aracılı glimfatik sistem, öğrenme-bellek, davranış, A β ₁₋₄₂ ve kan lipidleri üzerindeki etkilerini ve bağırsak mikrobiyotasının bu etkideki rolünü araştırmaktır.

Sprague-Dawley erkek sıçanlar 5 gruba ayrıldı. Genç-standart-diyet (G-Kontrol), yaşlı-standart-diyet (Kontrol), yaşlı-ketojenik-diyet (KD), yaşlı-antibiyotik-standart-diyet (AB) ve yaşlı-antibiyotik-ketojenik-diyet (KDAB), (n=45). Sıçanlara 10-hafta boyunca *ad libitum* zeytinyağlı-KD ve standart-diyet uygulandı. Son hafta geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi (ampisilin (1 g/l), neomisin (1 g/l), metronidazol (1 g/l) ve vankomisin (0,5 g/l), 1 litre içme suyu) 7-gün uygulandı. Öğrenme-bellek (Morris su tankı) ve anksiyete-lokomotor aktivite (açık alan (OFT) ve yükseltilmiş-artı-labirent (EPM) testleri) davranışları değerlendirildikten sonra kan ve beyin dokuları alındı.

Morris su tankında, Kontrol'e göre KD'de ve AB'ye göre KDAB'de platformu bulma süresi göre azaldı. KDAB'nin karşı kadrana geçirdiği süre AB'ye göre azaldı. Açık alan testinde, kenarda geçirilen süre KDAB'de AB'ye göre azaldı, KD ve Kontrol arasında anlamlı fark yoktu. Yükseltilmiş-artı labirentte, KDAB'nin AB'ye göre açık

kollarda geçirdiği süre artarken kapalı kollarda geçirdiği süre azaldı. KD ve Kontrol arasında fark yoktu.

KD ve KDAB'de β -hidroksi bütirat (BHB) seviyeleri Kontrol ve AB'ye göre arttı. KD'de LDL ve total kolesterol düzeyleri Kontrol'e göre arttı. FITC-dextran 500'ün beyin korteksinden geçişi yaşlılarda gençlere göre azaldı ancak KD bu geçirgenliğini arttırdı. KD'de serebellum AQP4 seviyeleri ve ekspresyonu azaldı, GFAP ekspresyonu ise hipokampüste Kontrol'e göre azaldı. KDAB'de hipokampus ve serebellumda AQP4 ve GFAP ekspresyonu azaldı AB'ye göre azaldı. Kontrol'e göre KD'de hipokampus ve serebellumda $A\beta_{1-42}$ seviyeleri azaldı. AB'ye göre KDAB'de serum $A\beta_{1-42}$ seviyeleri azaldı.

Kısacası, KD glimfatik fonksiyonu artırarak yaşlılarda kognitif fonksiyonu iyileştirdi. KD, bağırsak disbiyozu iyileştirerek bu sistem üzerinde etkilerini arttırdı. KD'nin ve bağırsak mikrobiyotasının bu sistem üzerindeki etki mekanizmaların anlaşılması için daha fazla araştırma yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Ketojenik diyet, zeytinyağı, yaşlılık, AQP4-aracılı glimfatik sistem, bağırsak mikrobiyotası, kognitif fonksiyon

Tezin sayfa adedi: 102

Danışman: Doç. Dr. Ferda Ulviye HOŞGÖRLER

2. Danışmanı: Prof. Dr. Nazan Uysal HARZADIN

**INVESTIGATION OF THE ROLE OF GUT MICROBIOTA IN THE
EFFECT OF A KETOGENIC DIET ON THE AQUAPORIN-4 (AQP4)
MEDIATED GLYMPHATIC SYSTEM IN ELDERLY RATS**

Doctoral Thesis

Rabia ILGIN

DOKUZ EYLUL UNIVERSITY HEALTH SCIENCE INSTITUTE

100/2000 YOK Doctoral Scholarship

Department Of Physiology

ABSTRACT

Aging is one of the most important risk factors for the development of neurodegenerative diseases (NDDs). Ketogenic diet (KD) is a high-fat, moderate protein and low-carb diet-type, and it is known to reduce toxic proteins such as A β that cause NDDs, but its mechanism has not been fully elucidated. The aim of this study was to investigate the effects of KD with olive oil on AQP4-mediated glymphatic system, learning-memory, behavior, A β 1-42 and blood lipids in aged rats, and the role of gut microbiota in this effect.

Sprague-Dawley male rats were divided into 5 groups. Young-standard-diet (G-Kontrol), old-standard-diet (Kontrol), old-ketogenic-diet (KD), old-antibiotic-standard-diet (AB) and old-antibiotic-ketogenic-diet (KDAB) groups, (n=45). Rats were given KD with KD and standard-diet *ad libitum* for 10-weeks. In the last week, broad-spectrum antibiotic treatment (ampicillin(1 g/l), neomycin-sulfate(1 g/l), metronidazole(1 g/l) and vancomycin(0.5 g/l), 1 liter of drinking water) was administrated during 7 days. After evaluating learning-memory (Morris water tank) and anxiety-locomotor activity (open field test (OFT) and elevated plus maze test (EPM)) behaviors, blood and brain tissues were collected.

In the Morris water maze, the time to find the platform decreased in KD compared to Kontrol, it decreased in KDAB compared to AB. The time spent in the opposite quadrant in KDAB decreased compared to AB. In OFT, the time spent in periphery decreased in KDAB compared to AB however there was no significant difference between KD and Kontrol. In EPM, time spent in open arms in KDAB

increased while time spent in closed arms decreased compared to AB and there was no difference between KD and Control.

Beta-hydroxy butyrate (BHB) levels increased in KD and KDAB compared to Control and AB. LDL and total-cholesterol levels increased in KD compared to Control. The permeability of FITC-dextran 500 into the cerebral cortex decreased in the aged rats compared to young rats however KD increased this permeability. AQP4 levels and its expression decreased in cerebellum in KD, and GFAP expression decreased in hippocampus in KD compared to Kontrol. AQP4 and GFAP expression decreased in hippocampus and cerebellum in KDAB compared to AB. $A\beta_{1-42}$ levels decreased in hippocampus and cerebellum in KD compared to Kontrol. $A\beta_{1-42}$ levels decreased in plasma in KDAB compared to AB.

In conclusion, KD improved cognitive function in aged via increasing glymphatic function. KD enhanced its effects on this system by improving intestinal dysbiosis. Further research is needed to understand the mechanisms of action of KD and the gut microbiota on this system.

Keywords: Ketogenic diet, olive oil, aging, AQP4-mediated glymphatic system, gut microbiota, antibiotic, cognitive function

Page number: 102

Advisor: Associate Prof. Ferda Ulviye HOSGORLER

2. Advisor: Prof. Dr. Nazan Uysal HARZADIN

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Beyin ve omurilikten oluşan merkezi sinir sisteminin (MSS), herhangi bir bilinen lenfatik sistem bulunmamaktadır (1). Nörofizyolojik işlevler sırasında sinir dokusunda biriken potansiyel toksik moleküllerin uzaklaştırılması son derece önemlidir (2). 2012 yılında Iliff ve arkadaşları, MSS’de lenfatik sistemin yerine bu fonksiyonu gerçekleştiren alternatif bir yolun varlığı beyin görüntüleme (fonksiyonel MRI) yöntemleri ile tanımlanmış ve bu sisteme glimfatik sistem adı verilmiştir (3). Bu sistem, bir serebral lenfatik sistem olarak çalışır ve esas olarak beyin omurilik sıvısı (BOS)-interstisyel sıvı (ISF) değişiminin olduğu perivasküler yol aracılığıyla nöronal ekstraselüler atık proteinlerin beyinden temizlenmesi sağlar (4). BOS, beyin parankimine geçerek beyindeki ISF ile karışır. BOS, ISF’den ekstraselüler proteinleri alarak, beynin ihtiyaç fazlası olan maddelerden temizlenmesine aracılık eder. Subaraknoid BOS’un büyük çoğunluğunun beyin parankimine geçtiği gösterilmiştir. Floresan maddeler kullanılarak yapılan two-foton görüntüleme tekniği ile BOS’un, beyin parankimine penetran arterleri çevreleyen perivasküler aralıklar boyunca girdiği ve daha sonra paravenöz aralığa geçtiği görülmüştür. Beyin ISF’deki çözünen maddelerin, paravenöz aralıktaki BOS’a geçerek temizlendiği gösterilmiştir (4). BOS aracılığıyla temizlenen bu ekstraselüler proteinler, astrositik aquaporin 4 (AQP4) su kanalının kolaylaştırdığı bir yolla paravenöz aralığa geçiş yapmaktadır. Paravenöz aralığa geçen BOS’daki ekstraselüler proteinler; kan dolaşımı, subaraknoid aralık veya drene olan ven duvarlarını takiben servikal lenfatiklere ulaşarak beyinden uzaklaştırılır (3).

Aquaporin alt grubuna ait olan AQP4, MSS’deki suya seçici geçirgendir ve suyun homeostatik dengede kalmasına yardım eder (5). ISF’de çözünen proteinler, atık ürünler ve fazla ekstraselüler sıvının atılımı, astrositik AQP4 kanalının aracılığıyla gerçekleştirilir (6). AQP4’ün yapısında yer alan porlar seçici olarak suyun geçişine izin verirken; sudan daha büyük moleküllerin geçişini zorlaştırır (7). AQP4, beyinde en çok bulunan moleküllerden biri olup, kan beyin bariyerindeki (KBB) astrosit membranlarında yaygın olarak bulunur (8). Ayrıca fare beyninde yapılan immunohistokimyasal çalışmalarda en düşük AQP4 ekspresyonun kortekste ardından hipokampus ve inferior kolliküllerde; en yüksek ekspresyonun ise serebellum ve

omurilikte olduğu gösterilmiştir (8). Ayrıca, astrositik AQP4 su kanalının lokalizasyonu perivasküler son ayaklarda da yoğun bir şekilde bulunmaktadır. Perivasküler astrositik son ayaklar sahip olduğu AQP4 su kanalı aracılığıyla, paravenöz BOS ile beyin interstisyumu arasında seçici bir geçirgenlik sağlamaktadır. Bu şekilde su ve düşük ağırlıklı moleküller iki kompartman arasında geçiş yapabilirken; yüksek ağırlıklı moleküller geçiş yapamazlar (9). Astrositik AQP4 su kanalının perivasküler aralıklardaki BOS ile beyin interstisyumu arasında düşük dirençli yollar oluşturarak sıvı hareketliliğini sağladığı düşünülmektedir. Böylece beyin parankiminde biriken ISF’de çözünen maddelerde ortamdan uzaklaştırılmaktadır (10). Nörodejeneratif hastalıklarla (NDH) ilişkili A β , α -sinüklein ve tau gibi proteinler, beyin hücrelerini çevreleyen interstisyel aralıkta bulunurlar. Periferik dokudaki lenf damarları, fazlalık olan interstisyel proteinleri genel dolaşım aracılığıyla karaciğere parçalanmaları için ulaştırır (11-14).

İnterstisyel ortamdaki atık proteinlerin temizlenmesindeki bozulma ile karakterize olan glimfatik disfonksiyon, doğal beyin yaşlanması ve Alzheimer (AH), travmatik beyin hasarı (TBH), iskemik ve hemorajik inme gibi MSS hastalıklarının temel nedenlerinden biridir (3, 15, 16). Glimfatik sistem fonksiyonu yaşla birlikte azalmaktadır (17). İlerleyen yaşla ilişkili NDH’lerin oluşumu sırasında AQP4 su kanal proteinlerinin olası rollerini gösteren çeşitli araştırmalar bildirilmiştir. AQP4 knock out farelerde glimfatik disfonksiyonun A β plak oluşumunun hızlandığını ve APP/PS1 Alzheimer modeli farelerde ise kognitif fonksiyon bozulmasına neden olduğu gösterilmiştir (18). Astrositik AQP4 knockdown hayvanlarda, BOS akışının yavaşladığı ve interstisyel çözünen maddelerin beyin parankiminden temizlenmesinde %70’lik bir düşüş yaşandığı görülmüştür (3). Bu çalışmalarla beyindeki ekstraselüler maddelerin temizlenmesinde astrositik AQP4 su kanalının önemli bir fonksiyona sahip olduğunu ortaya koymuştur.

Beyin için toksik olan veya ihtiyaç fazlası bazı ekstraselüler proteinlerin birikimi beyin parankimindeki paravenöz yol sayesinde önlenmektedir (3). Glimfatik fonksiyonun azalması, beynin nörotoksik maddelerin birikimine daha duyarlı olmasına neden olmaktadır. Bu nedenle, ilerleyen yaşla birlikte fonksiyonu azalan glimfatik sistemin gözlemlenmesi önemlidir. Çünkü NDH’ler için en yüksek risk faktörü

yaşlılıktır (17). Yaşlılıkta glimfatik sistemin bozulması yanlış katlanmış ve hiperfosforile olmuş proteinlerin birikimine neden olabilir. Böylece beyni bir nörodejeneratif patolojisi gelişimine veya kognitif fonksiyon bozukluğunun artmasına daha duyarlı hale getirir (3). Bunun yanı sıra uyanık evreden uykuya geçiş sırasında glimfatik aktivite artışının beyin laktat seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (19). Anestezi edilmiş farelerde glimfatik aktivitenin inhibisyonu veya AQP4 delesyonu, asetozolamid tedavisi, sisterna magna puncture ve baş pozisyonundaki değişiklikler, beyinde laktat seviyelerinin artmasına neden olduğu rapor edilmiştir (19). Bu glimfatik yolağın beyni temizlemesinin haricinde beyinde glukoz gibi besinlerin dağılımı ve teröpatik ajanların iletimi için önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir (4). Glimfatik sistem, sadece çözünebilir proteinlerin ve metabolitlerin beyinden atılmasında değil büyüme faktörleri, nöromodülatörler, glukoz, lipitler ve amino asitlerin de beyin çevresindeki dağılımında önemli bir rol oynamaktadır (4).

Yapılan çalışmalarda A β peptidin, AH başlamadan önce kan dolaşımında, BOS'ta, beyin parankimasında ve vasküler yapılarda biriktiği gösterilmiştir (20, 21). Nörovasküler yolaklarda bu proteinlerin aşırı birikmesi BOS'un azalmasına, KBB'nin ve vasküleritenin bozulmasına neden olmaktadır (21). Beynin nörovasküler fonksiyonu öğrenme ve hafıza gibi kognitif süreçlerde kritik bir rol oynamaktadır. Kognitif fonksiyonlardaki azalmanın nörovaskülerizasyondaki bozulmayla ilişkili olduğu gösterilmiştir (22).

Son on yılda, bağırsak mikrobiyotasının sadece beyin gelişimi ve fonksiyonunda değil aynı zamanda yaşlanan beyin ve AH, PH ve MS gibi NDH'lerin patofizyolojisinde de rol oynadığı düşünülmektedir (23). Özellikle yaşlanmanın sonucu olarak mikrobiyal çeşitlilik azalmaktadır. Bağırsak mikrobiyotası ve MSS arasında hormonal, nöronal (parasempatik yolak ve omurilik, immun (sitokinler) ve metabolik (kısa zincirli yağ asitleri (KZYA) serbestlemesi) gibi birçok yol aracılığıyla karşılıklı bir iletişim vardır (24). Bağırsak mikrobiyotasından serbestlenen bileşikler lokal olarak enterik sinir sistemini etkileyebilir ve kan yolu ya da vagus siniri ile beyine ulaşır.

Bağırsak mikrobiyotasını oluşturan bakteriler hasarlı bağırsak bariyerindeki immün aktiviteden sorumludurlar. Bu aktivite inflamasyon yanıt oluşmasına neden

olur ve bunun sonucunda KBB bozulur. KBB'nin bozulması nöral hasara ve dejenerasyona neden olur (24). KBB fonksiyonunun ve serebral kan akışının azalması, beyinden A β plaklar ve nörotoksik maddelerin temizlenmesi zorlaştırır ve beyinde birikmesine neden olur (25). Bağırsak mikrobiyotasının ve nörovasküler bütünlüğünü korumak amacıyla uygulanan tedavi yöntemleri NDH'lerin engellenmesi için çok önemli olabilir.

Ketojenik diyet (KD), çok düşük karbonhidratlı, yüksek yağlı ve orta miktarda protein içeren beslenme çeşididir. KD, glukoz metabolizmasından enerji için substrat olarak asetoasetat ve β -hidroksi bütirat gibi keton cisimcikleri veren yağ asitleri metabolizmasına doğru sistematik bir kaymaya neden olur (26). 24 saatten daha uzun sürede yetişkin beyni bazal metabolizmanın yaklaşık %20'sini 100-120 gr glukoz oksidasyonu ile sağlar (27). KD, büyüme ve gelişme için yeterli proteini sağlar ancak metabolik gereksinimler için kullanılan karbonhidrat yeterli değildir. Böylece, beyin temel enerji kaynağı olarak glukoz yerine keton cisimciklerini kullanmak zorunda kalır (28). KD epilepsi, PH ve otizm gibi birçok nörolojik hastalıkta etkili bir tedavi yöntemi olarak kullanılmaktadır. Ayrıca AH, TBH ve iskemik inmede beyin fonksiyonunu koruduğuna dair birçok prelinik çalışma yapılmıştır. Alzheimer modeli olan APP/V7171 transgenik farelerde KD'nin mitokondriyal fonksiyonu düzelttiği, oksidatif stresi ve A β birikimini azalttığı gösterilmiştir (29). Ayrıca diğer Alzheimer modeli APP/PS1 ve Tg4510 farelerde KD'nin motor ve kognitif fonksiyonlarını arttırdığı ve A β birikimini azalttığı rapor edilmiştir (30, 31).

KD, bağırsak mikrobiyotasını değiştirerek nörovasküler gelişime katkı sağlamaktadır. Yapılan bir çalışmada KD'nin kısa zincirli yağ asidi (KZYA) ürettiği bilinen *A. muciniphila* ve *Lactobacillus* gibi bakterilerin önemli derecede arttığı gösterilmiştir (31, 32). KZYA, KBB'de eksprese olan monokarboksilat transporterler tarafından taşınır, KZYA'ların yokluğu ise KBB'nin geçirgenliğinin artmasına neden olur (33). Diğer bir çalışmada KD, glukoz transporter-1 eksikliği sendromunda *Desulfovibrio* bakteri miktarını azaltmış. *Desulfovibrio* bağırsak bariyerine bozduğu bilinen hidrojen sülfidi üreten bakteri üyelerindendir (34). Sonuç olarak, *Desulfovibrio* miktarındaki azalma KBB'ni ve nörovaskülerizasyonu korumaktadır. *A. muciniphila* ve *Lactobacillus* ve *Desulfovibrio* miktarlarındaki değişiklikler nörovaskülerizasyon

da ve burdan yola çıkarak glimfatik sistem üzerinde de olası pozitif etkiler oluşturabilir. Yine yapılan bir çalışmada, KD'nin iskemik inmeli fare modelinde bölgesel SKA'sını arttırdığı gösterilmiştir. Otizm modeli fare çalışmalarında ise KD'nin bağırsak mikrobiyotasını değiştirerek potansiyel olarak nörolojik semptomları azaltmıştır (22).

Erken hasat sızma zeytinyağı (EVOO) ve fenolik bileşikler, AH gibi bazı NDH'lerin önlenmesi ve tedavisi için umut vericidir. İnsanlar üzerinde yapılan araştırmalar, EVOO açısından zengin bir Akdeniz diyetinin AH riskini önemli ölçüde azaltabileceğini göstermiştir (35). AH fare modellerinde EVOO ve EVOO fenolik içeriklerinin ağızdan verilmesi Aβ birikimini ve tau nöropatolojilerini azalttığı ve bellek ve kognisyonu iyileştirdiği gösterilmiştir (36). Zeytinyağı içerdiği fenolik bileşikler sayesinde hem yararlı bakterilerin çoğalmasını uyaran prebiyotik özelliğine hem de patojenik bakterilerin çoğalmasını baskılayan antibakteriyel özelliğine sahiptir. Ağız yoluyla alınan fenolik bileşiklerin yaklaşık olarak %90-95'i ince bağırsakta sindirilmeden kolona ulaşır ve burada biyoaktif sekonder yapılara katabolize edilirler. İlgili ana fenolik bileşiklerin metabolitleri yerleşik mikrobiyota tarafından taşınır ve bağırsak mikrobiyota kompozisyonunu değiştirebilir (37). Martinez ve arkadaşları, Swiss Webster farelerine uygulanan EVOO ve rafine edilmiş zeytinyağı tedavisi sonrasında *Desulfovibrionaceae* türünün seviyesinde azalma olduğunu göstermiştir. Bunun gibi patojenik bakteri türlerine karşı antibakteriyel etkilerinin EVOO'daki fenolik içeriklerin neden olduğu bildirilmiştir (38). Bu sonucu destekleyen başka bir çalışmada, C57BL6/J farelerde gavaj ile uygulanan hidroksitirozolün (50 mg/kg/gün), yüksek yağlı diyetle indüklenen bağırsak mikrobiyota disbiyozundan koruduğu ve *Proteobacteria* ve *Ferribacteria* gibi patojenik bakterilerin seviyelerini azalttığını ve bunun yanı sıra bakteriyel çeşitliliği tekrar arttırdığı ve plazmadaki lipopolisakkarit bağlayıcı proteini azaltarak bağırsak bariyer bütünlüğünü koruduğunu bildirmişlerdir (39).

EVOO'nun mukozal bağışıklık, kardiyometabolik ve kognitif fonksiyon üzerindeki pozitif etkileri bağırsak mikrobiyotası ile ilişkili olabilir. Farelerin EVOO tüketimi sonrasında *Bacteroides* cinsinin miktarı yükselmiş ve plazma trigliserit seviyeleri ile aralarında negatif korelasyon saptanmıştır (40). Bununla birlikte,

Lachnospiraceae miktarı EVOO tüketimi ile artmış ve insanlardaki plazma HDL kolesterol ile aralarında pozitif korelasyon saptanmıştır (40). İnsan ve hayvan çalışmalarında, probiyotik formda kullanılan EVOO'nun *Lactobacillus* miktarını arttırdığı ve plazma total kolesterol seviyelerini azalttığı görülmüştür (41). Bakteriler tarafından üretilen KZYA'lar EVOO tüketimi ile artar ve kan glukozu homeostazı üzerindeki töröpatik etkilerini ortaya çıkarır. Alzheimer hastalarında *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* bakterileri genellikle azalır ve EVOO bağırsak mikrobiyotasında bu bakteri popülasyonunu arttırarak kognitif fonksiyonu iyileştirir (42). Ayrıca, EVOO patojen etkileşim hipotezinde AH için bir risk faktörü olarak kabul edilen bazı patojenik bakteri türlerine karşı antibakteriyel aktivitesi sayesinde kognitif fonksiyonlar üzerinde koruyucu etkiye sahip olabilir. Bu hipotez, A β 'nin başlangıçta antimikrobiyal bir peptit olarak işlev gördüğünü ve patojenik bakterilerin popülasyonunu kontrol ettiğini öne sürmektedir (43). Ancak, mikrobiyal patojenlerin neden olduğu kronik enfeksiyon; uzun süreli inflamasyonun artması, mikrogial yaşlanma, mikrobiyal film oluşumu, A β birikimi ve plak oluşumunun neden olduğu sporadik AH'nin gelişimini tetikleyebilir (44). KZYA'lar, bağırsaktaki sıkı bağlantı protein ekspresyonunun arttırarak bağırsakta inflamasyonun azalmasını ve bağırsak bariyerinin bütünlüğünü korunmasını sağlar (45).

Yaşlanma ve A β , tau ve α -sinuklein gibi nörotoksik proteinlerin beyin parankiminde birikmesi, NDH'lerin gelişiminde en önemli risk faktörlerinden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Günümüzde artan beslenme çeşitlerinden biri olan KD'nin ve EVOO'nun birçok NDH'nin tedavisinde belirgin pozitif etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. EVOO ve KD'nin beyinde biriken A β protein seviyelerini azaltması nedeniyle bu atık moleküllerin temizlenmesinde rol alan glimfatik sistem arasında olası bir ilişki olabilir. Yağ kaynağının EVOO olduğu KD'nin yaşlanma ile fonksiyonu azalan glimfatik sistemi oluşturan AQP4 su kanalı üzerinde etkilerinin anlaşılması önemli olacaktır. Ayrıca KD'nin bağırsak mikrobiyotasını değiştirerek KBB geçirgenliği etkilediği bilinmekte ancak glimfatik sistemle ilişkisi bilinmemektedir. KD'nin AH gibi NDH'lerde etkilenen beyin bölgesi hipokampüste biriken A β protein miktarını azalttığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda A β gibi atık proteinlerin beyinden temizlenmesine AQP4 aracılı glimfatik sistemin rol oynadığı rapor edilmiştir. Ancak literatürde KD'nin glimfatik

sistem üzerinde etkilerine dair az çalışma bulunmamaktadır. AQP4 beyinde en çok bulunan moleküllerden biri olup, kan beyin bariyerindeki (KBB) astrosit membranlarında yaygın olarak bulunur. KD'nin bağırsak mikrobiyotasını değiştirerek KBB fonksiyonu üzerinde pozitif etkilere sahip olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Buradan yola çıkarak bağırsak mikrobiyotası ve AQP4 su kanalı arasında bir ilişki söz konusu olabilir. Ancak doğrudan bağırsak mikrobiyotasının AQP4 ile ilişkisini gösteren çalışma bulunmamaktadır.

Bu tezin amacı, EVOO'nun yağ kaynağı olduğu KD'nin ilerleyen yaşla birlikte fonksiyonu azalan glimfatik sistemin kognisyonla ilişkili beyin bölgeleri hipokampus ve serebellumda AQP4 su kanalı ekspresyonu ve seviyeleri üzerindeki etkilerini araştırmaktır. Ayrıca, KD'nin glimfatik sistem üzerindeki etkisinde antibiyotik tedavisiyle değişen bağırsak mikrobiyotasının olası rolünün araştırılmasıdır.

1.1 Problemin Tanımı ve Önemi

Son yüzyılda sağlık ve teknoloji alanındaki gelişmeler sayesinde insan ömrü uzamıştır. Ancak ömrün uzaması dünya popülasyonun giderek yaşlanmasına ve bunun beraberinde birçok NDH'nin ortaya çıkmasına neden olmuştur. AH ve PH gibi yaşlanma ile ilişkili NDH'lerde, ekstraselüler proteinlerin yanlış katlanması ve aşırı birikerek normal fizyolojik rollerini kaybedip nörotoksik özellik kazanması sonucunda meydana gelmektedir. Nörofizyolojik işlevler sırasında biriken, potansiyel toksik moleküllerin, sinir dokusundan uzaklaştırılması gerekmektedir. Beyinde lenfatik dolaşım olmadığı için, beyin parankiminde biriken ekstraselüler proteinleri temizleyen alternatif bir mekanizmaya ihtiyaç vardır (3).

Beyin omurilik sıvısı (BOS), beyin parankimine geçerek beyin interstisyel sıvısı (ISF) ile karışır. BOS, ISF'den ekstraselüler proteinleri alarak, beynin ihtiyaç fazlası olan maddelerden temizlenmesine aracılık eder. Ekstraselüler proteinler, AQP4 su kanalının kolaylaştırdığı bir yolla paravenöz aralığa geçiş yapar (3). Buraya geçen ekstraselüler proteinler; kan dolaşımı, subaraknoid aralık veya ven duvarlarını takip ederek ortamdaki uzaklaştırılır (3). Bu sisteme glimfatik sistem adı verilir. AQP4 beyinde en çok bulunan moleküllerden biri olup, kan beyin bariyerindeki (KBB) astrosit membranlarında ve BOS bariyerinde yaygın olarak bulunur. Ayrıca fare

beyninde yapılan immunohistokimyasal çalışmalarda en düşük AQP4 ekspresyonun kortekste ardından hipokampus ve inferior kolliküllerde; en yüksek ekspresyonun ise serebellum ve omurilikte olduğu gösterilmiştir (8). ISF’de çözünen proteinler, atık ürünler ve fazla ekstraselüler sıvının atılımı, astrositik AQP4 kanalı aracılığıyla gerçekleştirilir.

AH’de AQP4’ün sinaptik plastisiteyi etkilediği ve A β temizliğine aracılık ettiği, eksikliğinin ise öğrenme ve hafızayı bozduğu rapor edilmiştir . AH başlamadan önce A β peptidi kan dolaşımında, BOS’ta, beyin parankimasında ve vasküler yapılarda birikmektedir. NDH’lerin oluşum süreçlerinde proteinlerinin olası rollerini gösteren çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Ölüm sonrası yapılan mikroskopik incelemeler AH’de, A β içeren senil plaklar ile fosforile tau içeren nörofibriler yumakların beyinde biriktiğini ortaya koymuştur (46). Yapılan klinik çalışmalarda AH’de beyin iyon ve su homeostazisinin önemli ölçüde bozulduğu tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada ise AH’de, beyinde AQP4 kanalının gen ekspresyonunun önemli derecede azaldığı bulunmuştur. Bu nedenle nörovasküler yollarda, BOS’un azalmasına, KBB’nin ve vasküleritenin bozulmasına neden olur (24). Beynin nörovasküler fonksiyonu öğrenme ve hafıza gibi kognitif süreçlerde kritik bir rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda, kognitif fonksiyonlardaki azalmanın nörovaskülerizasyondaki bozulmayla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar; bağırsak mikrobiyotasının beyin vasküler bütünlüğünü belirlemede önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Germ-free farelerde yapılan bir araştırmada, *Clostridium tyrobutyricum* gibi mikroorganizmalar tarafından üretilen kısa zincirli bir yağ asidi (KZYA) olan bütirat eksikliğinin KBB geçirgenliğini arttırdığı gösterilmiştir (47). Benzer şekilde, asetat ve propiyonat gibi KZYA’ları üreten bir bakteri olan *Akkermansia muciniphila* eksikliğinin ise KBB’nin ve bağırsakların sıkı bağlantılarına zarar verdiği gösterilmiştir (48). KBB fonksiyonunun ve SKA’nın azalması, beyinden A β plaklar ve nörotoksik maddelerin temizlenmesi zorlaştırır ve beyinde birikmesine neden olur (25). Bu sebeple, bağırsak mikrobiyotasını ve beyin nörovasküler bütünlüğünü korumak NDH’lerin engellenmesi için tedavi yöntemleri oluşturulmasında büyük önem taşımaktadır.

Ketojenik diyet (KD) çok düşük karbonhidratlı, yüksek yağlı ve orta miktarda protein içeren beslenme çeşididir. Bu beslenme ile temel enerji kaynağı olarak glukoz

yerine keton cisimcikleri kullanılmaktadır. EVOO ve KD'nin AH modeli farelerin beyinlerinde A β seviyelerini azalttığı ve kognitif fonksiyonlar üzerinde pozitif etkileri olduğu birçok yayında rapor edilmiştir. Yapılan son araştırmalarda KD'nin, nörovasküler fonksiyonu iyileştirmesi ve sağlıklı bir bağırsak mikrobiyotasının sürdürülmesi ile çeşitli nörolojik hastalıklara karşı koruyucu etkileri olabileceği gösterilmiştir. Ancak, KD'nin NDH'lerde yararlı etkileri bilinse de sağlıklı koşullarda etkisi tam olarak bilinmemektedir. Bunun yanı sıra literatürde EVOO ve KD'nin sağlıklı yaşlılarda nörovaskülerizasyon ve astrositik AQP4 ile ilişkili glimfatik sistem üzerinde etkilerine dair çalışma bulunmamaktadır.

1.2 Araştırmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı, zeytinyağlı KD uygulamasının ve antibiyotikle oluşturulan bağırsak disbiyozun yaşlı sıçanlarda özellikle kognitif fonksiyonlarla ilişkili beyin bölgelerinde (hipokampus ve serebellum) A β 42 protein ve AQP4 seviyelerini ve GFAP ve AQP4 floresan yoğunluğunu değerlendirerek bağırsak mikrobiyotasının zeytinyağlı KD'nin glimfatik sistemdeki etkisinde olası rolünü araştırmaktır.

1.3. Araştırma Hipotezleri

H₀: Zeytinyağlı ketojenik diyet uygulamasının sağlıklı yaşlı sıçanlarda AQP4-aracılı glimfatik sistem, kognitif fonksiyonla ilişkili beyin bölgelerinde (hipokampus, serebellum) AQP4 ve GFAP ekspresyonu ve seviyeleri, hipokampus, serebellum ve serum A β 42 protein seviyeleri, kognitif fonksiyonlar ve davranış üzerindeki etkisinde bağırsak mikrobiyotasının rolü yoktur.

H₁: Zeytinyağlı ketojenik diyet uygulamasının sağlıklı yaşlı sıçanlarda AQP4-aracılı glimfatik sistem, kognitif fonksiyonla ilişkili beyin bölgelerinde (hipokampus, serebellum) AQP4 ve GFAP ekspresyonu ve seviyeleri, hipokampus, serebellum ve serum A β 42 protein seviyeleri, kognitif fonksiyonlar ve davranış üzerindeki etkisinde bağırsak mikrobiyotasının rolü vardır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Yaşlanan Beyin ve Nörodejeneratif Hastalıklar (NDH)

Yaşlılık, insan hayatının en önemli bir süreçlerinden birisidir ve fiziksel bozulmalarla birlikte artan hastalıklar ve ölüm riskleri ile ilişkilidir. Yaşlanma, farklı hızlarda ve farklı türlerde gerçekleşebilir. Bireyler arasında ve türler içinde farklılıklar gösterir. Yaşlanmanın nörodejeneratif hastalıklar (NDH) üzerindeki etkisi de önemli bir araştırma konusudur. Yaşlanma süreci, nörodejeneratif hastalıkların başlangıcında ve ilerlemesinde önemli bir rol oynar (49). Bu nedenle, yaşlanmanın temel mekanizmalarını ve bunların NDH'lerin tedavisindeki rolünü anlamak ve buna göre tedavi yöntemleri geliştirmek son derece önemlidir. NDH, yaşlı popülasyonda yaygın olarak bulunmaktadır ve beyin yaşlanmasının nörodejenerasyon ile hızlandığı görülmektedir (49). Genetik ve çevresel faktörlerinin, NDH'lerin ilerlemesini belirlediği düşünülmektedir. Bu nedenle, NDH'leri hızlandırılmış yaşlanma olarak görmek mümkündür.

En yaygın NDH olan Alzheimer (AH) ve Parkinson hastalığı (PH) ağırlıklı olarak yaşlı bireylerde görülmektedir ve bu hastalıkların oluşma riski yaşla birlikte artmaktadır (50). Beyin yaşlanmasındaki ilerleme, yaşlanmayla ilişkili fizyolojik ve patolojik süreçler arasındaki ilişkilerin tam olarak tanımlanmasına katkıda bulunur. Yaşlanma sürecinde somatik hücreler çeşitli stresler tarafından indüklenerek yaşlanır. Yaşlanan hücreler bölünemez fakat tipik bir fenotip kazanır ve inflamasyonu tetikleyen kimyasallar salgılar. Beyinde astrositler veya mikroglia gibi glial hücreler ve nöronlar bu kimyasallardan etkilenir (50, 51). Dendritik dallanma azalır, bu da beyin yaşlanmasıyla ilişkili sinaptik plastisite ve kognitif fonksiyonlarda azalmaya neden olur. Yaşlanma ayrıca beyinde bireken atık proteinleri temizleyen glimfatik sistemi de etkiler. NDH, fizyolojik proteinlerin patolojik konformasyonlarından kaynaklanan proteinopatilerdir. Normalde glimfatik yolakla ile temizlenen bu proteinler, glimfatik sistemin bozulmasıyla beyinde birikir ve ardından nöronların ölümüne neden olur .

2.2 Beynin Sıvı Kompartmanları

2.2.1 Beyin Omurilik Sıvısı (BOS)

Beyin omurilik sıvısı (BOS), beyin ventriküllerinde, kraniyal ve subaraknoid boşluklarda bulunan berrak ve renksiz bir sıvıdır. BOS'un temel görevi beyin için hidromekanik koruma sağlamaktır ve bununla birlikte elektrolit dengesini düzenleyerek ve katabolik ürünleri uzaklaştırarak beyin interstisyel sıvı (ISF) homeostazının korunmasına yardımcı olur. Yetişkinlerde BOS hacmi yaklaşık olarak 150 ml'dir; serebral ventriküllerde 30 ml, kraniyal subaraknoid boşlukta 50 ml ve spinal subaraknoid boşlukta 75 ml. Bir günde salgılanan BOS miktarı 400-600 ml'dir ve bu nedenle toplam BOS günde 3 kez devir yapar ve bu devir sayısı yaşlanmayla birlikte azalır (52).

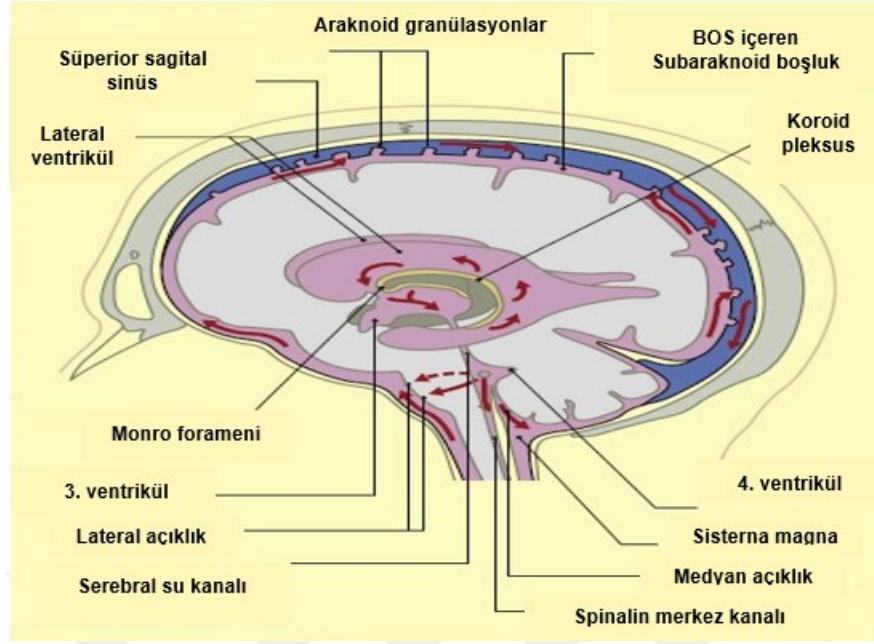
2.2.1.1 BOS Üretimi ve Dolaşımı

BOS'un çoğunluğu (%75), lateral ventriküllerin koroid pleksusları ve az miktarda da üçüncü ve dördüncü ventriküllerin pleksusları tarafından üretilir. Pleksuslar, ventriküllere uzanan meningeal çıkıntılardan oluşur ve epitel yüzeyleri ise ependimal hücrelerle devam eder. Ayrıca, sadece glukoz ve amino asitler gibi basit moleküllerin beyne ulaşmasına izin veren seçici taşıma mekanizmalarına sahiptir (KBB'nin önemli bir bileşenidir). BOS'un geri kalanı ise bariyer boyunca serebral kapiller damarlardan salgılanır.

BOS üretimi iki aşamada gerçekleşir. Koroidal interstisyel boşluklar içindeki koroidal kan damarlarından plazmanın pasif filtrasyonunu intersitisyumdan ventrikül lümenine ve Na/K adenozin trifosfataz (ATPaz) ve karbonik anhidraz ile aktif transport takip eder. Sonuç olarak, BOS'un içeriği plazmadan farklıdır (Tablo 1).

Tablo 1: Normal plazma ve BOS içeriği (52)		
Bileşenler (mmol/litre)	Plazma	BOS
Sodyum (Na ⁺)	138	138
Potasyum (K ⁺)	4,5	2,8
Kalsiyum (Ca ⁺²)	2,4	1,1
Klor (Cl ⁻)	102	119
Bikarbonat (HCO ₃ ⁻)	24	22
Glukoz	5,0	3,3
Total Protein	70	0,35

BOS'un üretimi, otonom sinir sistemi ve dopamine ve atriyal natriüretik peptit (ANP) gibi nöropeptitler tarafından ince bir şekilde düzenlenir. Bu, BOS basıncından bağımsızdır. BOS'un koroid pleksuslarından salgılanmasından sonra lateral ventriküllerde Magendia foramen yolu ile üçüncü ventriküle ve oradan dördüncü ventriküle geçer. Daha sonra dördüncü ventrikülün porlarından sisterna magnaya geçer. BOS yolağı daha sonra serebral hemisferik subaraknoid boşluk, spinal subaraknoid boşluk ve omuriliğin merkez kanalı boyunca az BOS akışı olması ile birlikte üç yola ayrılır (52, 53) (Şekil-1). BOS akışı, sistolik nabza karşılık gelen nabızdır. BOS, araknoid granülasyonlar aracılığıyla venöz sisteme geri emilir. Serebral venöz sinüslerine uzanan subaraknoid boşluğun parmak benzeri çıkıntıları vardır. Bu çıkıntılar, BOS'un sinüslere geçişine izin veren tek yönlü kapı gibi hareket eder ve subaraknoid boşluklara kanın geçmesine engel olur. Geri emilimin büyük bir kısmı superior sagital sinüstedir, ancak sinir kılıflarında ve nöral lenfatik damarlarda da bir miktar emilim meydana gelir. Sağlıklı koşullarda, geri emilim hızı üretim hızına eşittir. Geri emilim, BOS basıncı artarsa artar ya da serebral venöz sinus basıncı artarsa azalır.(52).



Şekil-1: Beyin omurilik sıvısı (BOS) dolaşımı (52)

2.2.2 Beyin İnterstisyel Sıvısı (ISF)

Beyin interstisyel sıvısı (ISF), beyin parankiminin metabolik aktivitesivve kandan kaynaklanır. KBB çözünen maddelerin MSS 'ne geçişini zorlaştırmasına rağmen MSS'deki ISF vücudun diğer dokularındaki ISF ile benzerdir. Göz ve MSS dışındaki diğer organ ve sistemlerdeki ISF tek ekstraselüler sıvıdır ve BOS'a benzemez (54). Beyinden ISF drenajını göstermek için yapılan çalışmalarda hayvanların beyin parankimlerine izleyici madde ile beyin arterlerine enjeksiyonu sonrasında ipsilateral olarak lenf düğümlerine doğru izleyici maddelerin drene olduğunu göstermişlerdir (55, 56).

BOS ve ISF hem beyin hem de spinal kordla kısacası MSS ile ilişkili iki ekstraselüler sıvıdır (56). BOS drenajının bozulması hidrocefali ile ilişkiliyken, ISF drenajının bozulması ise intraserebral hemoraji, genişlemiş perivasküler alanlar ve demans ile ilişkilidir (57). MSS'deki ISF hem kandan hem de doku metabolizmasından oluşur ve insan beyni yaklaşık olarak 280 ml ISF içerir (10). BOS'ta ISF'ye belli bir miktarda sıvı sağlar. İnsan ve diğer memelilerin beyinlerinde lenfatik sistem damarları bulunmamaktadır. Buna rağmen ISF'nin beyinden yaklaşık

olarak 0,11-0,29 µl/dk/gr hızla drenajı sağlanmaktadır (10). Vücuttaki ortalama lenfatik drenaja eşdeğer bir hızdır (58).

ISF, AH'nin patofizyolojisinde önemli olan atık protein A β 'yı beyinden, bazal membrandan ve endotel tabaka arasında bulunan ve astrositleri çevreleyen membranlar ve düz kas hücrelerinin arasındaki baziller membranların içerisinden geçirir (55, 59). Bu ISF ve çözünmüş olan maddeler beyinden servikal lenf düğümlerine doğru drene olmalarını sağlar (60). Rodentlerde yapılan izleyici maddeler beynin Willis poligonundaki arterlerin adventisya katmanlarında lokalize olmuşlardır. İzleyici maddenin karotis arterlerin adventisyasındaki varlığının olması ISF'nin arter duvarlarından servikal lenfatiklere drene olduğunu göstermektedir (54). İnsan internal karotis arteri ile bağlantılı servikal lenf düğümleri beyin için ilk lenf düğümleri olarak görev alır. Çözünmüş maddeler ve ISF, beyinden serebral arterler boyunca drene edilir ve bu lenf düğümlerine ulaşırlar (54).

2.3 Beyin Damarları ve Perivasküler Boşluk

Perivasküler boşluklar (PVS), kan damarlarını çevreleyen ve beyin dokusu ile kan dolaşımı arasında molekül alışverişine izin veren sıvı dolu boşluklardır (61). Bu molekül değişimi, beyindeki iyon ve besin dengesini korumak için önemlidir. 19. yüzyılın ortalarında ilk olarak iki bilim insanı tarafından tanımlanan bu boşluklar, Virchow-Robin boşlukları (VRS) olarak da bilinmektedir (62). Ayrıca, PVS BOS'un beyinden akışında rol oynar. BOS, PVS'den geçerek atık ürünlerin atılmasına ve beyin sağlığının korunmasına yardımcı olur. Beyin damarları ve PVS birbiriyle yakından bağlantılıdır. Kan damarları beyne oksijen ve besin sağlamaktan sorumluyken, PVS bu damarları çevreler ve beyin omurilik sıvısının (BOS) akışında ve glimfatik sistem yoluyla atıkların temizlenmesinde rol oynar. Beyinde ki kan damarları da glimfatik sistemde yer alır. Glimfatik sistem, BOS'un PVS'den geçişine ve atık ürünlerin beyinden temizlenmesine dayanmaktadır. Kan damarları, beyin ve kan dolaşımı arasındaki molekül alışverişini düzenleyerek bu sistemde rol oynar. Genel olarak, beyin damarları ve PVS arasındaki ilişki, beyin sağlığını ve işlevini korumak için çok önemlidir. Bu sistemin fonksiyonun bozulması, AH, MS gibi nörolojik bozuklukların meydana gelmesine neden olmaktadır (62).

2.4 Astrositler ve Astrositik Son Ayaklar

Beynin genel sağlığını ve fonksiyonunu korumaktan sorumlu olan astrositler MSS’de en çok bulunan hücre tipidir. Glial fibriler asidik protein (GFAP) ve vimentin (Vim), astrositlerdeki hücre iskeletinin bir parçası olarak ara filamentleri (nanofilamentler) oluşturur (63). Reaktif gliosis, soma hipertrofisi ve süreçleri, değişmiş gen ekspresyonu, GFAP, Vim ve kalsiyum bağlayıcı protein S100 β ekspresyonunda artış, çeşitli beyin hasarlarına ve bazı NDH’lere karşı astrositlerin verdiği yanıtlardır (63, 64). Yaşlı MSS dokusunda her yerde bulunan reaktif astrositler, aksonal rejenerasyonu engelleme, gereksiz sitotoksin ve kemokinleri salgılama ve inflamasyonu arttırması nedeniyle zararlı olarak kabul edilmektedir (65). In vitro koşullardaki astrosit aktivitelerinin gösterilmesi, MSS dejenerasyonundan sonra yararlı mı yoksa zararlı mı olup olmadığı konusundaki belirsizliğe katkı sağlamaktadır. Örneğin, potansiyel koruyucu etkileri glutamat alımı ve nörotropin salgılanmasıyken, potansiyel zararlı etkileri inflamatuvar sitokinlerin ve sitotoksik radikallerin salgılanması olabilir (65). In vivo NDH deneysel modellerine, yanıta reaktif astrositlerin oynadığı roller hakkında bilgiler kısıtlıdır. Örneğin, yaşlı astrositler yüksek bir GFAP ve S100 β içeriği sergiler (66). Oligonükleotit dizilerinin kullanımı, farelerin yaşlanan beyininden gen ekspresyonunun ilk profilini vermiştir ve insan NDH’lerine paralel olarak yaşlanmanın hem neokorteks ve hipokampüste hem de serebellumdaki inflamasyon ve oksidatif stres ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (67, 68). GFAP, ayrıca ekspresyonda iki kat artışa uğrayan genlerden biridir. Bu nedenle, yaşlanan astrositlerin GFAP artışları, yaşlanan beyin inflamatuvar ve oksidatif strese verdiği bir yanıtın sonucu olabilir. Aslında nörodejeneratif bir hastalığın erken evresindeki bir beyinden normal "sağlıklı" yaşlı bir beyni ayıran özelliklerin daha iyi anlaşılması ve tedavi geliştirilmesinde önemli bir biyobelirteç olacaktır. Yaşlanan beyindeki astrositlerin sayısı normal beyindeki astrosit sayısından yaklaşık % 20 kadar daha fazladır (69, 70). Yaşlanma sırasında astrositlerdeki hasar görmüş nöronlara karşı bu artış yanıtı ve reaktif gliosis ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca, genç beyinde mevcut olan aynı düzeyde nöroprotektif etkiyi sağlamak için yaşlanan beyindeki astrosit sayısının artması bir diğer neden olarak açıklanabilir (71).

Astrositik son ayaklar, beyindeki kan damarları ve pia mater ile temas kuran astrositlerin özelleşmiş süreçleridir. Glimfatik sistem, beyindeki kan damarlarını saran son ayaklar olarak bilinen özel süreçlere sahip astrositler tarafından düzenlenir (72). Glimfatik sistemdeki rollerine ek olarak, astrositik son ayaklar beyinde kan akışını düzenlemek, iyon dengesini korumak ve nöronlara yapısal destek sağlamak da dahil olmak üzere çeşitli fonksiyonlara sahiptirler.

Astrositik son ayaklar, kan ve beyin dokusu arasındaki madde alışverişini kontrol eden glial limitanslar olarak bilinen fiziksel bir bariyer oluşturur (72). Glial limitans su, iyonlar ve diğer küçük moleküller için geçirgendir, ancak proteinler ve bağışıklık hücreleri gibi daha büyük moleküllerin geçişini kısıtlar. Böylece, KBB boyunca BOS ve ISF değişimini düzenleyerek bu süreçte önemli bir rol oynar. Astrosit son ayaklar, glimfatik sistemin KBB'sini bozmadan beyindeki atık ürünleri temizlemesine olanak tanır (73).

AQP4, BOS'un beyne akmasına izin verdiği ve atık ürünlerin beyinden temizlenmesini kolaylaştırdığı için glimfatik sistemin işlevi için kritik bir öneme sahiptir. Kısacası, astrositik son ayaklar kan ve beyin dokusu arasındaki madde alışverişini düzenleyen fiziksel bir bariyer oluştururlar ve sıvı ve atık ürünlerin hareket için önemli olan yüksek AQP4 su kanallarını eksprese oldukları için glimfatik sistemin düzgün çalışması için gereklidir (71, 74)

2.5 Glimfatik Sistem

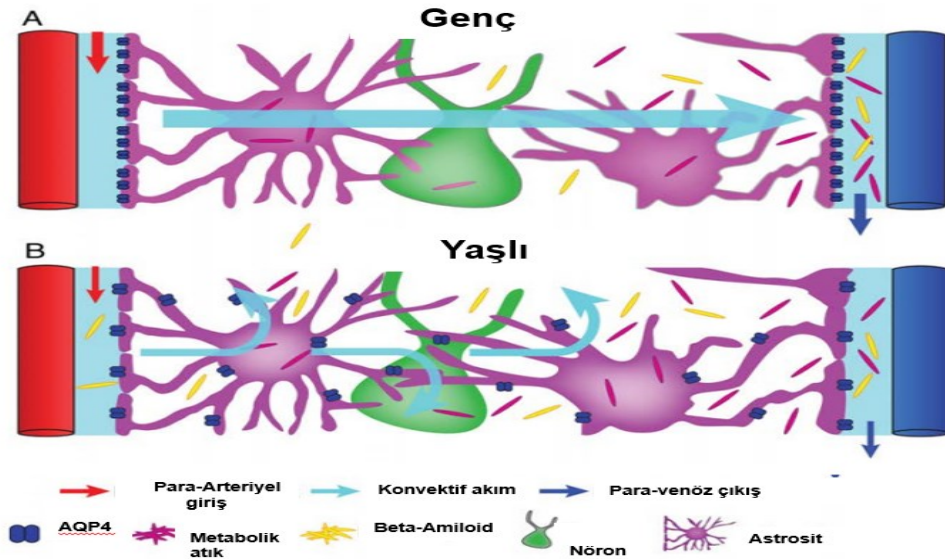
MSS'deki toplam su hacminin %68'ini intrasellüler sıvı geri kalan %32'sini ise ekstrasellüler sıvı oluşturmaktadır (4). Ekstrasellüler sıvı ISF, BOS ve kan damarlarında olmak üzere dağılır. MSS'de, çeşitli besinler beyinde metabolize olmaktadır daha sonra oluşan metabolik atıkların etkili bir şekilde beyinden temizlenmesi gerekmektedir (73).

Illiff ve arkadaşları, farelerin sisterna magnasından enjekte ettikleri floresan dekstran boyanın drenaj venlerin PVS'lerinde ve parankimal kapillerin bazal membranında bulunduğunu gösterdiler (3). Bu PVS temizleme sistemine glial hücrelere bağlı olması ve periferdeki lenfatik sisteme benzemesi nedeniyle “**glia**” ve **lenfatik**” kelimelerinden oluşturulan “**glimfatik sistem**” adını verdiler (3). Diğer bir deyişle glimfatik sistem, astrositlerin vasküler son ayağında ve vasküler adventisya

arasındaki boşluk içinde uzanan bir perivasküler yoldur. Glimfatik sistem daha fazla damar geçirgenliğine sahiptir ve beyin parankiminden makromoleküllerin temizlenmesine katkı sağlar (75).

2.5.1 Glimfatik Sistem Anatomisi

Glimfatik sistem, bir serebral lenfatik sistem gibi çalışır. BOS- ISF değişiminin olduğu perivasküler yol aracılığıyla beyindeki ekstraselüler atık proteinlerin temizlenmesi sağlar (4). Koroid pleksusta üretilen BOS, beyin parankimine geçerek beyindeki ISF ile karışır. (Şekil 2). Serebral kan damarlarının perivasküler boşluğu (PVS), BOS/ISF madde alışverişinin yapıldığı yerdir. Buna ek olarak, PVS'yi dışını sınırlayan glial hücreler atıkların dönüşümünde ve atılımında önemli rol oynar. BOS, ISF ile ekstraselüler proteinlerin paravenöz boşluk boyunca lenfatik dolaşıma akmasını sağlar. BOS aracılığıyla temizlenen bu ekstraselüler proteinler, astrositik aquaporin 4 (AQP4) su kanalının kolaylaştırdığı bir yolla paravenöz aralığa geçiş yapar. Paravenöz aralığa geçen BOS'daki ekstraselüler proteinler; kan dolaşımı, subaraknoid aralık veya drene olan ven duvarlarını takiben servikal lenfatiklere ulaşarak beyinden uzaklaştırılır. Yaşlanma ile glimfatik sistem bozularak metabolik atıkların birikmesine, AQP4 ekspresyonunun azalmasına ve polarizasyonunun bozulmasına neden olur (Şekil-2) (76).



Şekil-2: Yaşlı ve gençte glimfatik fonksiyon modeli (76)

Floresan maddeler kullanılarak yapılan two-foton görüntüleme tekniği ile BOS'un, beyin parankimine penetran arterleri çevreleyen perivasküler aralıklar boyunca girdiği ve daha sonra paravenöz aralığa geçtiği görülmüştür. Beyin ISF'deki çözünen maddelerin, paravenöz aralıktaki BOS'a geçerek temizlendiği gösterilmiştir (4).

2.5.2 Aquaporin-4 (AQP4) su kanalları

1992 yılından bulunan ilk AQP'den beri insanda 13 çeşit AQP (AQP0-AQP12) tanımlanmıştır (77, 78). Aquaporinlerin fizyolojik rolü, plazma membrane boyunca suyun taşınmasını kolaylaştırmaktır. Beyinde ve omurilikte, AQP4 öncelikle serebral damarları çevreleyen astrositik son ayaklarında eksprese olur. AQP4'ün soma yerine son ayakta büyük ölçüde polarize olması ve beyin endotel hücrelerinde su kanallarının olmaması AQP4'ün nöropile BOS akışını kolaylaştırdığını düşündürmektedir. “Glimfatik” terimi ilk olarak, glial AQP4 su kanalı olmayan farelerin vahşi tip (wild-type) farelere kıyaslandığında hem BOS hem de ISF akışının azalması gözlemine dayanmaktadır (77).

Aquaporin-4 (AQP4), beyin ve omurilik dahil olmak üzere MSS'de ve astrositik son ayaklarda yüksek oranda eksprese olan bir su kanalı proteindir (78). AQP4 kanallarının görevi, suyun hücre membranı boyunca hareketini kolaylaştırmaktır. Beyindeki su dengesinin korunmasından sorumludurlar ve beyin hacminin düzenlenmesinde kritik bir rol oynarlar (78).

AQP4 su kanalları, AH'nin gelişiminde rol oynayan A β 42 protein gibi atık ürünlerin beyinden temizlenmesinde de yer almaktadır. Su hareketi ve atık temizliğindeki rollerine ek olarak, AQP4 kanalları çeşitli patolojik durumlarda rol oynar (78). Örneğin, optik siniri ve omuriliği etkileyen nadir bir otoimmün hastalık olan nöromiyelit optikada (NMO), antikorlar AQP4 kanallarını hedefleyerek inflamasyona ve sinir sisteminde hasara yol açar (79). AQP4 kanalları beyin sağlığını ve fonksiyonun korumak için gereklidir ve bu kanalların disfonksiyonu nörolojik bozukluklara yol açabilir (78, 79). Rapor edilen çalışmalarda AQP4'ün glimfatik sistemin fonksiyonunda kritik bir rol oynadığını göstermiştir. Örneğin, AQP4 nakavt farelerde yapılan çalışmalar, AQP4 ekspresyonunun yokluğunun, bozulmuş glimfatik fonksiyon ve beyinden A β plaklarının azalmış klirensi ile ilişkili olduğunu göstermiştir

(80). Ayrıca bazı çalışmalarda, AQP4 ekspresyonunun AH, MS ve TBH dahil olmak üzere çeşitli nörolojik bozukluklarda değiştiğini gösterilmiştir (80). Bu nedenle, AQP4 ekspresyonundaki değişikliklerin bu hastalıkların gelişmesine veya ilerlemesine neden olabileceği düşünülmektedir.

2.5.2.1 Hipokampus ve AQP4

Hipokampus, kognitif fonksiyon ve uzun süreli hafıza ile ilişkili beyin bölgesi olarak bilinmektedir . Hsu ve arkadaşları, hipokampusun laminar spesifik AQP4 immunoreaktivitesi sergilediği gösterilmiştir (81). Hipokampusun CA1 bölgesinde AQP4'ün yoğun bir şekilde boyandığı görülmüştür. Dentat girusta AQP4'ün astrositik son ayak ve astrositik süreçlerinin yokluğu ile büyük ölçüde boyamanın yok olduğu görülmüştür. CA1 startum radiatum ve dentat girus hilusundaki astrositlerde AQP4 gözlemlenmiştir (81). Daha önce yapılan çalışmalarda, AQP4'ün sinaptik plastisitede önemli rol oynadığını gösterilmiştir (82). Özellikle, AQP4 eksikliği olan farelerde, bazal geçişte herhangi bir değişiklik olmaksızın uzun süreli güçlendirme (LTP) ve uzun süreli depresyonda (LTD) bozulma olduğu bildirilmiştir (82). Ayrıca, temporal lob epilepsisi olan fare modellerinde AQP4'ün azaldığı gözlemlendi (83). AQP4 eksikliği olan farelerde ise K^+ kinetiğinin bozulduğu ve nöbet sürelerinin uzadığı bildirildi. Temporal lob epilepsi hastalarında sıklıkla kognitif fonksiyonlarda özellikle hipokampüse bağlı spasyal bellekte bozulma görülmektedir (84). AQP4, hipokampüsteki sinaptik uyarılmasa süresince ekstraselüler K^+ u modüle eder (85). Bu nedenle, AQP4, sinaptik plastisite için önemlidir.

2.5.2.2 Serebellum ve AQP4

Serebellum, motor kontrol ve motor öğrenme ile ilişkili beyin bölgesi olmasının yanı sıra son zamanlarda kognitif fonksiyonlarda da rol oynadığı düşünülmektedir (86). Bütün beyin bölgelerine göre serebellum, AQP4'ün en yoğun olarak eksprese olduğu beyin bölgesidir (86, 87). Ancak, serebellumdaki AQP4'ün motor kontrol ve kognitif fonksiyon arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışma sayısı çok kısıtlıdır. Hipokampüste AQP4 eksikliği olan farelerde sinaptik plastisitenin azaldığı bildirilmiştir (82). Ancak AQP4 eksikliği olan farelerde serebellar sinaptik plastisite ve serebellar öğrenmeyi nasıl etkilediği gösteren bir çalışma bulunmamaktadır.

2.5.3 Glimfatik Sistemi Etkileyen Faktörler

Glimfatik sistemi etkileyen birçok faktörden bahsedilmektedir. Bunlar arasında yaşlanmaya bağlı nöroinflamasyon, vücut postürü, uyku, diyet ve egzersiz ön plana çıkmaktadır.

2.5.3.1 Yaşlanma

Yaşlanma, mikrogliya ve astrositlerin aktivasyonu ile morfolojisinde ve fonksiyonunda değişikliklere yol açarak kognitif disfonksiyona neden olan kronik ve düşük dereceli inflamasyon ile karakterize edilir (88, 89). Glimfatik sistemin fonksiyonu için temel olan ve astrositlerin son ayağında bulunan AQP4'lerin fonksiyonunun ve polarizasyonunun bozulması, BOS-ISF'nin perivasküler yollardan madde değişimini engelleyerek glimfatik sistemin bozulmasına neden olmaktadır (90). Nöroinflamasyon, beyinde protein dengesizliği ile ilişkilidir (91). Glimfatik sistem homeostazının bozulması sonucunda hiperfosforile olmuş ve yanlış katlanmış atık proteinlerin birikimi beyinde artmaya başlar. Normal şartlarda, proteasomal degradasyon ve otofaji gibi intrasellüler süreçler herhangi bir yan etki oluşturmadan bu atıkları temizler (92). Ancak, bu atık temizleme mekanizmaları tamamen temizleme yapamaz çünkü bazı proteinler ISF'ye salınır. Ayrıca, yaşlanma ile BOS hareketini sağlayan arteriyel pulsasyonlar azalır ve bu da glimfatik taşımayı bozar (93). Alzheimer gibi NDH'lerin neden yaşlıları etkilediğini bu sebepler açıklayabilir.

Yakın zamanlarda yapılan bir çalışmada yaşlı farelerin genç farelere göre glimfatik fonksiyonunun %80-90 oranında dramatik bir azalış olduğunu bildirdi (94). Glimfatik aktivitenin baskılanması hem BOS izleyici maddelerin akışı hem de radyo işaretli A β ve inülinin temizlemesi üzerindeki etkileri gösterilmiştir ve GFAP+ astrosit süreçlerinin hipertrofisi olarak tanımlanan reaktif gliosis yaşlanmayla birlikte artar (95). GFAP ekspresyonundaki değişikliklerin değişen glimfatik fonksiyona nasıl katkıda bulunacağı konusu belirsizliğini korusa da glimfatik fonksiyondaki yaşa bağlı azalmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Genç hayvanlarda astrositik son ayaklarda yerleşmiş olan AQP4 periarteriyel akışı yolağı boyunca BOS-ISF değişimini kolaylaştırmada merkezi bir rol oynar (3). AQP4'ün genetik olarak silinmesi BOS-ISF değişimini %65 oranında bozduğu ve A β klirensinin %55 oranında azaldığı

gösterilmiştir (96). BOS-ISF değişimindeki düşüş ile A β klirensi arasındaki dengenin olmaması, muhtemel enjekte edilen A β 'nın bir kısmı LRP-1/RAGE aracılı transendotelial taşıma yoluyla doğrudan kana geçmesiyle ilişkili olabileceğini öne sürmüştür (96). Bununla birlikte, astrositik AQP4 vasküler polarizasyonu yaşanan beyindeki reaktif astrositlerde kısmen bozulmuştur (93). Bu sonuçlar doğrultusunda yaşanmanın, özellikle penetran arteriyoller boyunca perivasküler AQP4 polarizasyonunun kaybıyla ilişkilidir ve kortikal parankimal AQP4'ün varlığı BOS-ISF değişimi ile korele olduğu bulunmuştur (92). Glimfatik fonksiyondaki yaşa bağlı azalmanın astroglial su taşınmasındaki düzenin bozulması ile ilgili olabileceği öne sürülmüştür.

2.5.3.2 Uyku, Vücut Postürü, Egzersiz ve Diyet

Glimfatik sistemi etkileyen faktörlerden birisi uykudur. Geçmişten kadar günümüze uykunun iyileştirici ve onarıcı bir etkisi olduğu bilinmektedir. Ancak bunun altında yatan temel mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. 2013'te Xie ve arkadaşları, uykunun glimfatik sistem üzerindeki etkisini araştırdıkları çalışmada iki-fotonlu mikroskop görüntüleme yöntemi kullanarak anestezi altındaki ve uyanık olan (97)farelerde BOS akışını karşılaştırmışlardır. Çalışma sonucunda, uyku sırasındaki toplam A β protein klirensinin %40'ından ve metabolik klirensin etkinliğinden sorumlu olan glimfatik sistemde uykunun hayati bir rol oynadığını bildirmiştir (98). Uyku yoksunluğunda kognitif fonksiyonların bozulması, demansa ve hatta ölüme neden olması bu keşfi desteklemektedir (99). Benzer şekilde, anestezi sırasındaki interstisyel alan uyanık duruma göre karşılaştırıldığında genişler bu da sirkadiyen ritmin değil hacim değişikliklerini takiben klirensin etkilendiğini göstermektedir (98).

Bir diğer etkileyen faktör ise vücut postürüdür. 2015 yılında Lee ve arkadaşları, vücut postürünün beynin glimfatik sistem üzerindeki etkilerini değerlendirmiş ve serebral hemodinamiğin ve intrakraniyal basınçların vücut postürü ile önemli ölçüde etkilendiğini öne sürmüşlerdir (97, 100). Glimfatik taşınmanın ve A β protein klirensinin yan ve sırtüstü yatışla daha fazla olduğunu bildirmişlerdir (100).

Egzersiz, glimfatik sistemi etkileyen faktörler arasındadır. He ve arkadaşları, gönüllü egzersiz uygulamasının yaşlı farelerde A β proteinin glimfatik sistem ile temizlenmesi ve yaşlanmaya bağlı nöroinflamasyon üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Bu çalışma sonucunda, gönüllü egzersizin A β protein birikimini azalttığı ve glial hücrelerin inflamatuvar aktivasyonunu iyileştirdiği rapor edilmiştir. Egzersiz ile glimfatik fonksiyonun optimizasyonu sonucunda kognitif fonksiyonların iyileştirildiğini gösterdiler (101, 102).

Diyette benzer şekilde glimfatik sistemi etkileyen faktörlerdendir (103). Yapılan bir çalışmada, yüksek yağlı diyetin glimfatik sistemin fonksiyonunu bozarak beyinde toksik madde birikimine neden olabileceği gösterilmiştir. Polifenol bakımından yüksek bir diyetin ise glimfatik sistemi pozitif yönde etkilediği ve kognitif disfonksiyonu azalttığını göstermişlerdir. Aralıklı açlık uygulamasının glimfatik fonksiyonu arttırdığı bildirilmiştir (103). 24 saatlik aç bırakılan farelerde beyindeki toksik maddelerin glimfatik sistemin artması ile azaldığı gözlemlenmiştir. Genel olarak, diyet ve açlık glimfatik sistemin işlevi üzerinde önemli bir etkisi olabilir ve bu da beyin sağlığını ve kognitif fonksiyonları etkileyebilir (103). Özellikle, polifenoller açısından zengin bir diyet yapmak ve aralıklı açlık uygulamak sağlıklı bir glimfatik sistemi sürdürmek ve kognitif gerileme riskini azaltmak için faydalı olabilir (104).

2.6. Ketojenik Diyet

Ketojenik diyet (KD), yüksek yağ, düşük karbonhidrat ve orta düzeyde protein içeren bir diyet çeşididir (105). Açlık durumunu taklit eden KD, organizma için enerji kaynağı olarak karbonhidratların yerine yağın kullanmasını sağlar. KD sırasında yağ asitleri karaciğer metabolizması tarafından keton cisimciklerine dönüştürülür ve daha sonra beslenme ketozisini indüklemek ve sonraki fizyolojik veya patolojik etkilerini göstermek için kan dolaşımına girer (106).

2.6.1 Tarihçesi

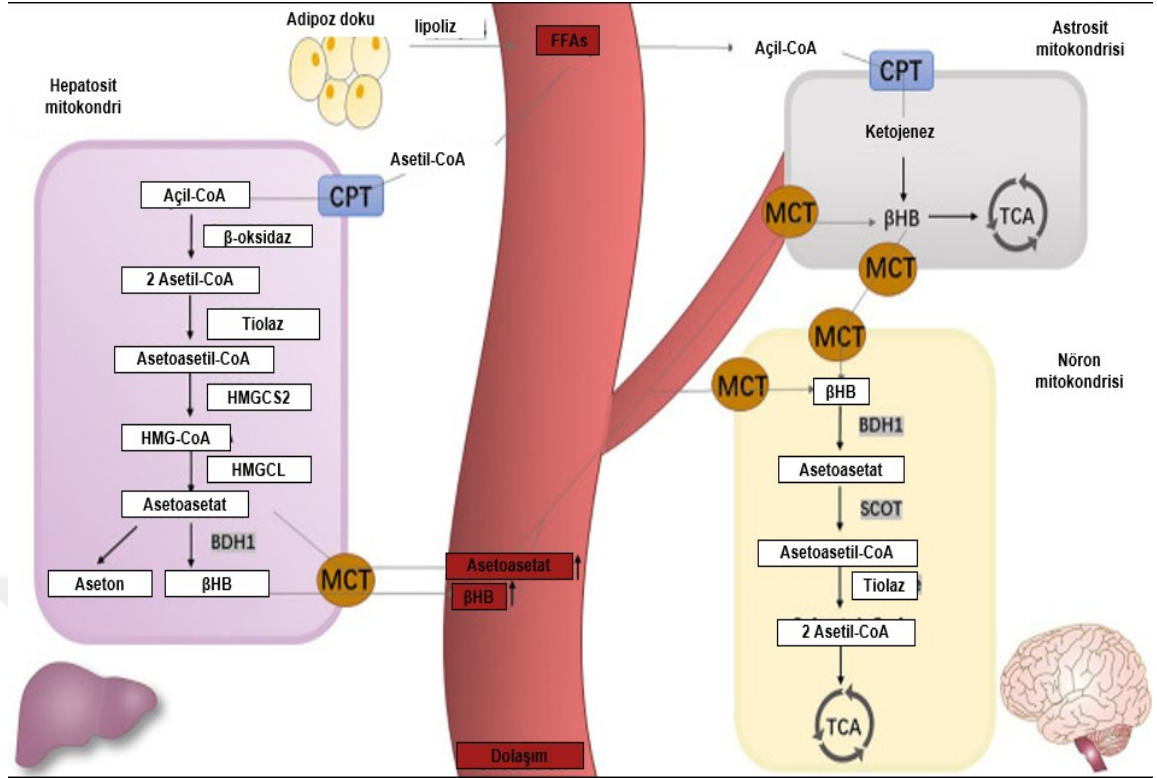
1921 yılında Woodyatt ve arkadaşları, β -hidroksi bütirik asit (BHB) ve aseton düzeylerinin, aç veya düşük karbonhidrat ve yüksek yağlı diyet uygulayan sağlıklı deneklerde yükseldiğini buldu (107). Başka bir çalışmada ise yüksek yağ ve düşük karbonhidrat özel bir diyetin ilaca dirençli epilepsi hastalarında epileptik nöbet kontrolüne sağladığını gösterdi (107). Bu önemli bulgular, klasik KD'nin ortaya çıkmasına neden oldu . Klasik KD'nin öne çıkan özellikleri, yüksek yağ ve düşük karbonhidrat içeriği ile yağın proteine ve karbonhidrata makro besin oranı 4:1'dir.

Günlük toplam karbonhidrat alımı 20-50 g ile sınırlıdır ve bu da günlük toplam enerji alımının %5-10'unu oluşturmaktadır (105). Karbonhidrat kısıtlaması, insülin seviyelerindeki artışı engelleyerek yağ asitlerinin keton cisimciklerine (BHB, asetoasetat ve aseton) dönüşmesini tetikler ve klasik KD'de diyet enerjisinin yaklaşık %90'ını sağlar (105).

2.6.2 Keton Oluşumu ve Ketojenik Diyetin Etki Mekanizması

Ketozis, KD veya karbonhidrat kısıtlamalı diyetler nedeniyle karbonhidrat metabolizmasındaki değişim sonucunda elde edilen fizyopatolojik bir süreçtir. Diyabetik ketoasidozun aksine beslenme ketozisi, 0,5 ila 5 mmol/L arasında değişen plazma BHB konsantrasyonları ile güvenli ve sürdürülebilir fizyolojik bir durumdur (108, 109). Beslenme ketozisinin fizyolojik özellikleri arasında normal kan gazı, yüksek keton cisimcikleri ve düşük ve stabil kan glukozudur. KD'nin yanı sıra açlık orta zincirli yağ asitleri ve eksojen ketonlar da beslenme ketozisini indükleyebilir (108).

İnsülin, karbonhidratlardan elde edilen enerjiyi depolayan yollardaki anahtar enzimleri aktive eder. Karbonhidrat yokluğunda ya da kısıtlanmasında insülin seviyesi azalması lipojenez ve yağ birikiminin azalmasına neden olur (110). Birkaç gün açlıktan veya karbonhidrat alımının büyük ölçüde azalmasından (yaklaşık 50 g/gün'ün altında) sonra glukoz depoları azalır (111). Vücut glukoz depolarının tükenmesi durumunda, normal yağ oksidasyonu için KREBS döngüsüne giren oksaloasetat tedarikinde azalma meydana gelir. Bu durum, "yağ yakmak" olarak adlandırılan sürecin oluşmasına neden olur (112). Ayrıca, MSS için glukoz tedariki de azalır, çünkü MSS glukozu enerji kaynağı olarak kullanabilen tek organ olarak bilinir. Bu nedenle, MSS'i 3-4 günün ardından sonra alternatif enerji kaynağını bulmaya zorlanır. Bu alternatif kaynaklar için aşırı üretilen asetil koenzim A (asetil-CoA)'dan elde edilir. Uzun süreli açlık, tip 1 diyabet ve ketojenik diyetlerde görülen bu durum keton cisimciklerinin yani asetoasetat, aseton ve BHB üretimini artırır. Ketojeniz adı verilen bu süreç karaciğerin mitokondriyel matriksinde meydana gelir (112, 113) (Şekil-3).



Şekil-3: Keton cisimciklerinin metabolizması (113) (Asetoasetil-CoA: asetoasetil-koenzim, açıl-CoA: açıl-koenzim, BHB: β -hidroksi bütirik asit, BHD1: beta hidroksibütirat dehidrojenaz-1, CPT: karnitin palmitol transferaz, FFAs: serbest yağ asitleri, HMG-CoA: 3-hidroksimetilgulitail-CoA, HMGCS2: 3-hidroksimetilgulitail-CoA sentaz 2, HMGCL: 3-hidroksimetilgulitail-CoA liaz, MCT: monokarboksilat tarnsporter, SCOT: süccinil-CoA-3-ketoacid CoA tranferaz, TCA: trikarboksilik asit)

Ketonlar, karaciğerdeki mitokondrilerde yağ asitlerinin oksidasyonundan kaynaklanır. Ana keton cisimler asetil CoA ve asetoasetattır. Asetoasetat, özellikle karaciğerde üretilir ve daha sonra dolaşım sistemiyle diğer dokulara taşınır (113). Ancak, asetoasetat karaciğer dışındaki dokularda pek kullanılmaz ve daha sonra BHB'ye dönüştürülür. Bu nedenle, BHB genellikle vücudun ana ketonu olarak kabul edilir. Ancak, BHB hidroksil grubu içerdiği için kesin bir anlamda bir keton olmayabilir (112).

Astrositler, beyinde serbest yağ asiti oksidasyonunun yapıldığı yer olarak bilinmektedir (114). Glukoz kısıtlaması olduğunda serbest yağ oksidasyonu ile üretilen astrosit kaynaklı keton cisimciklerinin nöronlar için önemli bir oksidatif enerji

kaynağı olduğunu gösteren çalışmalar literatürde mevcuttur (115-117). Beyindeki ketozis durumunda, periferden taşınan keton cisimcikler yerine astrosit aracılı serbest yağ asiti oksidasyonu tarafından sağlanan keton cisimciklerin daha baskın olduğu düşünülmektedir (118, 119).

2.6.3 Ketojenik Diyetin Nöroprotektif Etkileri

Ketojenik diyet, glikolizi inhibe ederek ortaya çıkan keton cisimcikleri aracılığıyla MSS'de nöroprotektif roller oynar. Plazmadaki keton cisimciği seviyeleri 4 nM'ı geçince bu moleküllerin beyine geçişi artar (120). *In vivo* PET teknikleri kullanan bazı çalışmalar, insan ve kemirgenlerde uzun süreli ketojenik diyet sonrası indüklenen keton cisimciği konsantrasyonunun normal diyetle beslenenlerle karşılaştırıldığında yaklaşık sekiz kat arttığı gösterilmiştir (121). Bununla birlikte, deneysel araştırmalarda hafif ketozisin beyindeki keton cisimciği seviyelerinin yalnızca iki katına çıkması nedeniyle ketozisin boyutu önemli olduğu bildirilmiştir (122). Plazma keton cisimciği seviyeleri beyindeki keton cisimciği seviyeleri ve metabolizması için önemlidir çünkü indüklenen keton cisimciğinin MSS'nde glukoz metabolizmasının baskılanmasını belirler (120, 121). Keton cisimciği ile indüklenen MSS'nde glukoz metabolizmasının baskılanması plazmadaki keton cisimciği seviyelerindeki her 1 nM artış için yaklaşık %9 arttığını göstermektedir (123). Diyet veya açlık ile indüklenen ketozis durumunda enerji kaynağı olarak kullanılan keton cisimciğinin beynin enerji ihtiyacının yaklaşık %60-70'ini sağladığı bildirilmiştir (124). Keton cisimciklerinin artması ile glikolizin inhibisyonu insülin sekresyonunu düzenler. Böylece, insülin duyarlılığını ve glikoz toleransını iyileştirir (104). Sonuç olarak yaşa bağlı ortaya çıkan hastalıkların başlamasını geciktirir ve çeşitli türlerin ömrünü uzatır (113).

2.6.3.1 Ketojenik Diyetin Aβ Plakları Üzerindeki Etkileri

KD'nin hücrel metabolizmayı modifiye etmesine ek olarak, keton cisimciklerin AH ile ilişkili toksik Aβ plak birikimine karşı tedavi edici ve koruyucu etkisi olduğu bulunmuştur (125). İnsan yakın AH modeli transjenik farelerde KD'nin serum BHB düzeylerinde artışa neden olduğu ve kontrolle karşılaştırıldığında Aβ plak birikimini önemli derecede azalttığı gösterildi. KD'nin sadece Aβ plak birikimini azaltması değil aynı zamanda Aβ nörotoksitesine karşı koruyucu etkiye sahip olduğu

düşünülmektedir. Kashiwaya ve arkadaşları, BHB, A β ve BHB ve A β kombinasyonu ile tedavi edilen sıçan hipokampal hücre kültüründe sadece A β alan hücre ölümünü arttığı, kontrolle karşılaştırıldığında nörit sayısında ve uzunluğunda azalması olduğunu ve bunun hipokampal A β toksisite etkisi olduğunu gösterdiler (126). BHB eklenen hücre kültüründe ise A β toksisitesi azaldı, büyüme faktörleri salgılayarak hücre sağkalımını arttırdığı bildirdiler (126). Böylece bu sonuçlarla BHB'nin var olan hasara karşı potansiyel onarıcı etkisi olduğunu gösterdiler. Bu yüzden, A β karşı KD'nin nöroprotektif mekanizması AH tedavisinde ve önlenmesinde kullanılan alternatif bir tedavi yöntemi olarak kabul edilmektedir (125).

2.7 Beyin Bağırsak Aksı

Mevcut literatüre göre, bağırsak mikrobiyotasının beyni etkilemek için beş önemli iletişim yolu vardır. Bunlar sinir ağları, nöroendokrin sistem, bağırsak mikrobiyota metabolik sistemi, bağırsak immün sistemi ve bariyer sistemidir. Bağırsak bakterileri, beyin ve nörolojik fonksiyonlar üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (127).

Bağırsak mikrobiyotası, bağırsakta üretilen bir dizi metabolit, peptit ve hormon gibi biyoaktif maddeleri salgılar. Bu maddeler, bağırsak ve beyin arasındaki iletişimi sağlayan bağırsak-beyin aksı aracılığıyla beyne ulaşabilirler. Bağırsak bakterileri, özellikle bağırsakta üretilen kortikotropin salgılayan hormon (CRH) ve kortizol gibi stres yanıtı hormonlarının üretimini etkileyebilirler. Araştırmalar, bağırsak mikrobiyotasının değiştirilmesinin, kortizol seviyelerinde artışa ve nörolojik fonksiyonlarda bozulmaya neden olabileceğini göstermektedir. Ayrıca, bağırsak mikrobiyotasının değiştirilmesinin, depresyon, anksiyete ve diğer psikiyatrik bozukluklar gibi nörolojik hastalıklarla da ilişkili olduğu öne sürülmektedir. Bazı çalışmalar, bağırsak mikrobiyotasındaki belirli bakteri türlerinin, nörotransmitterlerin (örneğin serotonin) üretimini etkileyerek nörolojik hastalıklara neden olduğunu öne sürmektedir. Ayrıca, bağırsak mikrobiyotası beyin inflamasyonunu kontrol eden KZYA ve triptofan gibi metabolitleri de salgılar (128). Bağırsak mikrobiyotası, triptofan gibi çeşitli besinlerin sindirilmesi sırasında biyolojik işlevler için önemli olan metabolitleri üretir. Triptofan, nörotransmitterlerin ve diğer biyolojik moleküllerin sentezinde önemli rol oynayan bir amino asittir (128). Triptofan diyeti, mikrogial ve astrosit aktivasyonunu kontrol etmek için bağırsak mikrobiyotası ile etkileşime giren

bir mekanizma sağlayabilir (128). Yapılan bir çalışmada, diyet takviyesi olarak KZYA tedavisinin, germ-free hayvanlarda bozulan mikrogial fonksiyonunu iyileştirdiğini bildirmiştir. KZYA'lar, bağırsak mikrobiyotası tarafından üretilen, sindirilemeyen karbonhidratların fermantasyonundan, proteinlerin ve peptitlerin sindiriminden türetilen metabolitlerdir (129).

Asetik, bütirik, propiyonik, valerik, izovalerik ve izobütirik asitler gibi metabolitler en çok çalışılan mikrobiyota metabolik ürünleridir (130). Fizyolojik koşullar altında, KZYA'lar bağışıklık sistemini düzenleme ve aktive etme, mikrogial hücre homeostazına kadar çeşitli fizyolojik işlevleri yerine getirir (131).

2.7.1 Bağırsak Mikrobiyota Değişimleri ve Normal Yaşlanma Süreçleri

Bağırsak homeostazındaki dengesizlik, normal yaşlanma süreci ve yaşlılarda birçok enfeksiyöz ve nörodejeneratif hastalık ile bağlantılıdır (132). Sağlıklı yaşlanan insanlar, genç yetişkinlerden farklı bir bağırsak mikrobiyota kompozisyonuna ve çeşitliliğine sahip olma eğilimindedir (127). Claesson ve arkadaşlarının yaptığı bir klinik çalışmada, yaşlı (65 yaş ve üstü) ve genç (28-46 yaş) arasındaki mikrobiyota disbiyoz değişimi dışkı örnekleme kullanılarak analiz edilmiştir (133). Çalışma, yaşlılarda *Bacteroidetes* filumunun %57 oranında baskın olduğunu ve *Firmicutes* filumunun %40 oranında baskın olduğunu gözlemledi. Bununla birlikte, genç deneklerde *Bacteroidetes* filumu %41 ve *Firmicutes* filumu ise %51 oranlarındaydı (133). Benzer şekilde Mariat ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, yetişkinler (25 ila 45 yaş) ve yaşlılar (70-90 yaş) arasında insan mikrobiyotasının *Firmicutes/Bacteroidetes* oranında (10,9'dan 0,6'ya) bir düşüş olduğunu gösteren diğer çalışmalarda gözlemlenmiştir (134).

Başlıca mikrobiyal filum olan *Firmicutes* ve *Bacteroidetes*, insan ve rodentlerin bağırsak mikrobiyotasında benzer şekilde bulunur (135, 136). Bu filum oranı düzeylerinde, topluluklarında ve kompozisyonlarında gözlemlenen önemli farklılıklar bulunmaktadır. İnsanlardan farklı olarak fare ve sıçanlardaki *Firmicutes/Bacteroidetes* oranı, ileri yaştaki rodentler (18-20 ay) genç rodentlerle (2-6 ay) karşılaştırıldığında yaklaşık olarak dokuz kat artmış ve buna kognitif bozukluklar ve artmış anksiyete davranışları gözlemlenmiştir (137, 138). Benzer şekilde, *Bacteroidetes* ve *Tenericutes* seviyelerini düşürerek ve *Firmicutes* ve *Actinobacteria*

seviyelerini artırarak mikrobiyota değişikliği incelenmiş ve sonuğta *Firmicutes* / *Bacteroidetes* oranında bir artış görölmüştür (139).

Yaşlanma sürecinde mikrobiyota değişikliği, mikrobiyota çeşitliliğinin azalması ve patolojik bakteriler olan *Proteobacterium* ve nispeten düşük oranlarda faydalı bakteri olan *Bifidobacterium*'daki artışla geręekleřir. Mikrobiyal biyoçeşitlilikteki değişikliklerin yanı sıra, KZYA'lar gibi yararlı mikrobiyota metabolitlerinin üretimi de büyük ölçüde azalır ve bu da yaşlanmayla ilişkili süreçle bağlantılı olabilir (140).

2.7.2 Bağırsak Disbiyoz ve Kognitif Disfonksiyon

Bağırsak disbiyozu, bağırsak mikrobiyotasında normal denge bozulduğunda ortaya çıkan bir durumdur. Antibiyotik kullanımı, zararlı bakterilerin yanı sıra yararlı bakterilerin de öldürölmesine neden olabilir ve bu durum bağırsak disbiyozuna yol açar (141). Benzer şekilde yüksek yağlı beslenme gibi beslenme türleri gibi faktörler bağırsak disbiyozun oluşmasına neden olabilir (142).

2.7.3 Bağırsak Mikrobiyotası, Antibiyotik Kullanımı ve Kognitif Fonksiyon

Mikrobiyota ile ilgili araştırmalarda model olarak kullanılan rodentler, bağırsak mikrobiyota ve beyin aksını daha iyi anlamak için standart koşullar altında uygulanan önemli araştırmalardır. Yaşlanmayla birlikte normal ve patojenik koşullarda mikrobiyotayı incelemek için kullanılan hayvan modellerinde birisi antibiyotik kullanımıdır. Bu modelde, şiddetli bağırsak mikrobiyota disbiyozunu tetiklemek için hayvanlar birkaç gün antibiyotiklerle tedavi edilir (143). Antibiyotik uygulaması, bakteriyel biyoyararlanımı önemli ölçüde azaltır. Ayrıca, antibiyotik uygulaması, farklı beyin bölgelerinde kognitif fonksiyonlarla ilgili BDNF ve sinaptofizin ekspresyonunu azaltarak kognitif fonksiyonları olumsuz etkiler. Frohlich ve arkadaşları, vankomisin, neomisin, metranidazol ve ampisilinden oluşana geniş spektrumlu antibiyotik kokteyli bağırsak disbiyozise neden olmuştur ve vankomisin KBB'yi geçerek plazmaya göre beyinde düzeyleri artmış ancak diğer antibiyotikler KBB'yi geçmeden plazmada kalmışlardır. Çalışmanın sonucunda antibiyotikle oluşturan bağırsak disbiyozun BDNF düzeylerini azaltarak kognitif gerilemeye neden olduğunu gösterilmiştir (143).

Yetişkin farelerde antibiyotik uygulaması, kontrol grubuna karşılaştırıldığında kısa zincirli yağ asitleri (KZYA) konsantrasyonlarında azalmaya ve kognitif bozukluğa neden oldu (143). Bu bulgular, KZYA'ların yaşlanma ile değiştiğini, hastalık ve kognitif gerilemenin patofizyolojisinde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Genç fareler yaşlı farelerle karşılaştırıldığında, KZYA metabolitlerinde %68 asetat ve propiyonat ve %80 bütirat seviyelerinde azalmaya neden oldu ve bu azalma kognitif bozukluklarla paralellik göstermiştir (138). Bu çalışma, bağırsak mikrobiyotası ile bilişsel işlev arasındaki bağlantıya dair kanıt sağlar ve bağırsak mikrobiyotasındaki yaşa bağlı değişikliklerin bilişsel gerilemeye katkıda bulunabileceğini öne sürer. Yapılan bu çalışmalar, yaşlanmayla birlikte hem insanlarda hem de hayvanlarda bağırsak mikrobiyotasında önemli değişiklikler gözlemlenmiştir ve bu değişiklikler giderek mikrobiyota disbiyozisi aşamasına gelmiştir. Bu nedenle yaşlanmayla birlikte bağırsak mikrobiyotasındaki meydana gelen değişiklikleri anlamak yaşlanma sürecinin başlamasına ilişkin potansiyel biyobelirteçler olabilecektir.

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Araştırmanın tipi

Araştırmanın tipi deneysel niteliktedir.

3.2 Araştırmanın yeri ve zamanı

Araştırmanın hayvan deneyleri kısmı, Eylül 2022 – Kasım 2022 tarihleri arasında, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Deneysel Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır (Tablo 2).

Etik kurul onayı Aralık 2021'de alınmış olup; ıslak laboratuvar testleri, ölçümler ve istatistiksel analiz Aralık 2022 – Mart 2023 tarihleri arasında yapılmıştır.

Tablo 2. Araştırma planı ve takvimi	
Projelerin planlanması	Aralık 2021- Ocak 2022
Etik Kurul Onayı	Aralık 2021 – Ocak 2022
Bap Projesi Giriş ve Onayı	Haziran 2022 – Haziran 2023
Sarfların ve analizler için gerekli malzemelerin alımı	Haziran 2022 – Ocak 2023
Deney gruplarında ketojenik diyet ve antibiyotik uygulanması ve davranış deneyleri	Eylül 2022 – Kasım 2022
Biyokimyasal ve immunofloresan boyama deney aşamaları	Aralık 2022 – Şubat 2023
Bulguların değerlendirilmesi ve istatistiksel analizler	Aralık 2022 – Mart 2023

3.3 Araştırmanın evreni ve örneklemi

Araştırma deney hayvanları üzerinde yapıldığı için araştırmanın evreni ve örneklemi bulunmamaktadır.

3.4 Çalışma materyali

Bu çalışmada, 41 adet Sprague Dawley ırkı genç (8 aylık) ve yaşlı (18 aylık) erkek sıçanlar (ortalama 400-550 gr) kullanılmıştır. Tüm hayvanlar deney sonlanıncaya kadar Deneysel Araştırmalar Biriminde standart koşullarda altında bakılmıştır. Haftada bir kez tüm grupların vücut ağırlığı ölçülürken, yedikleri yem miktarı günlük olarak ölçülmüştür. 10 hafta boyunca ketojenik diyet gruplarına kalori değeri 70 % zeytinyağı, 20 % protein, 1 % karbonhidrat içeren kalıp yemler sıçanların yiyebileceği boyutta dilimlenerek sıçanlara *ad libitum* verilmiştir. Beslenme düzeninin son haftasında antibiyotik gruplarına, bağırsak mikrobiyotasını bozmak ve disbiyozisi uyarmak için içme suyuna ampisilin (1 gr/L), neomisin (1 gr/ L), metronidazol (1 gr/L)

ve vankomisin (0,5 gr/L) eklenerek geniş spektrumlu bir antibiyotik kokteyli verilmiştir. Diyet programının son haftasında öğrenme ve bellek ve anksiyete testleri uygulanmıştır. Hayvan sakrifikasyonu sonrası elde edilen kan plazması ve beyin dokularında histolojik ve biyokimyasal değerlendirme yapılmıştır.

3.5 Araştırmanın değişkenleri

Bağımlı değişkenler: Ağırlık, tüketilen yem miktarı ve kalorisi, deney hayvanlarındaki öğrenme ve bellek ve anksiyete benzeri davranışlar, deney hayvanlarının kan plazmasındaki β -hidroksi bütirat (BHB), glukoz, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL), yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL), trigliserit (TG), total kolesterol (TC), ürik asit, alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), A β 42 seviyeleri, beyin korteksinin izleyici maddeye geçirgenliği, beyin dokularında (hipokampus ve serebellum) astrositik AQP4, A β 42 seviyeleri, hipokampus ve serebellumda astrositik AQP4 su kanalı ve glial fibriler asidik protein (GFAP) immunofloresan yoğunluğu

Bağımsız değişkenler: yaşlılık, ketojenik diyet ve antibiyotik uygulaması.

3.6 Veri toplama araçları

Çalışmanın veri toplama aşamaları Tablo 2’de belirtilmiştir.

3.6.1 Çalışma Grupları

Bu çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Yerel Etik Kurulu tarafından 22.12.2021 tarihinde 46/2020 kararı ile deneyin yapılması için etik açıdan uygun onayı alınmıştır. Bu çalışmada Sprague Dawley ırkı genç (7 aylık) sıçanlar (ortalama 300-450 gr) ve yaşlı (18 aylık) erkek sıçanlar (ortalama 500-600 gr) kullanılmıştır. Deney başlangıcında sıçanlar; Genç Standart Diyet (G-Kontrol) (1), Yaşlı Standart Diyet (Kontrol) (2) ve Yaşlı Ketojenik Diyet (KD) 3 gruba ayrılmıştır. Daha sonra yaşlı gruplar kendi arasında rastgele seçilerek 2 gruba daha ayrılmıştır; KD-Antibiyotik (KDAB) ve Antibiyotik (AB) grupları oluşturulmuştur. Toplamda 5 grup olarak incelenmiştir.

Gruplar

1. Genç Standart Diyet Grubu (G-Kontrol) (n=9)
2. Yaşlı Standart Diyet Grubu (Kontrol) (n=9)
3. Yaşlı Ketojenik Diyet Grubu (KD) (n=9)
4. Yaşlı Standart Diyet Antibiyotik Grubu (AB) (n=9)
5. Yaşlı Ketojenik Diyet Antibiyotik Grubu (KDAB) (n=9)

3.6.2 Ketojenik diyet uygulaması

Ketojenik yem özel olarak hazırlatıldı (ARDEN ARAŞTIRMA DENEY YEMLERİ) (yem içeriğinin enerji yüzdeleri Tablo 2’de gösterilmiştir) ve kullanılabilecek kadar -20 buzdolabında saklandı. Kullanılacak yemler bir gün önceden oda sıcaklığında bırakılarak yemin çözünmesi beklenildi. Ketojenik diyet gruplarının, diyetle uyum sağlaması için 2 hafta boyunca alıştırmaya diyetleri uygulandı. İlk hafta, %30 ketojenik yem ve %70 standart yem olarak sıçanlara uygulandı. İkinci hafta ise sıçanlara %50 ketojenik yem ve %50 standart yem olacak şekilde alıştırmaya diyeti uygulandı. Deney gruplarına ketojenik yem günlük olarak verildi ve hayvanların yeme serbest erişimi sağlandı. Deney boyunca her gün tüketilen yem miktarı tartıldı. Kontrol gruplarına standart pellet yem uygulandı (ARDEN ARAŞTIRMA DENEY YEMLERİ) (yem içeriğinin enerji yüzdeleri Tablo 3’de gösterilmiştir).

Tablo 3. Ketojenik diyet (KD) ve standart diyet (SD) besin taşlarının enerji yüzdeleri				
BESİN YAPI TAŞLARI	KD (zeytinyağı)		SD	
	Gr (%)	Kcal /kg	Gr (%)	Kcal /kg
Protein	18	10,20	18	16,5
Karbonhidrat	0,2	0,50	70	62,9
Yağ	68,4	89,30	10	20,6
Toplam		100		100

3.6.3 Antibiyotik uygulaması

Antibiyotik gruplarında bağırsak disbiyozu oluşturmak toz formdaki ampisilin (1 g/l), neomisin sülfat (1 g/l), metronidazol (1 g/l) ve vankomisin (0,5 g/l) 1 litre içme suyuna eklenerek geniş spektrumlu antibiyotik kokteyli hazırlandı. Daha önceki çalışmalarda uygulanan bu antibiyotik kokteylinin *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, ve *Verrucomicrobia* inhibe ettiği, 7 günü geçen antibiyotik tedavisinde ise 1 gr feçesteki bakteri sayısının anlamlı olarak arttığı gösterildi (141, 144, 145). Bu nedenle her gün taze olarak hazırlanan antibiyotik kokteyli bakteri sayısındaki artışı göz önünde bulundurarak 7 gün boyunca uygulanması yapıldı.

3.6.4 Morris su tankı testi

Morris su tankı testi, sıçanlarda öğrenme ve bellek gibi kognitif fonksiyonların değerlendirilmesi için kullanıldı (146). Morris su tankı, derinliği ve yerden yüksekliği 75 cm, çapı 140 cm opak malzemeden yapılmış ışık geçirmeyen yuvarlak bir havuzdan oluşmaktadır. Tank, 50 cm'e kadar 26 °C (± 2 °C) suyla dolduruldu ve daha sonra 10 cm çapında silindirik bir platform su seviyesinden daha aşağı seviyede görünmeyecek şekilde tank içine yerleştirildi. Havuzdaki su seviyesi hayvanın kuyruğunun havuz dibine değemeyeceği yükseklikte ayarlandı. Ortalama erişkin bir sıçanın gövde ve kuyruk boyunun toplamda en fazla 50 cm'e kadar ulaşabildiği bilinmesi nedeniyle havuz 50 cm'lik seviyeye kadar suyla doldurulmuştur. Havuzun bulunduğu odanın duvarlarına deney hayvanlarının yön bulmalarında ipucu olarak kullanabilecekleri tablo, renkli ve ışıklı objeler gibi işaretler yerleştirilmiştir. Bu işaretler, sıçanlar tarafından ipucu olarak kullanılarak yönlerini belirlemesini ve sudan kurtulmak için platformu bulmalarını sağlar. Sıçanların suya bırakılmasından gizli platformu bulmasına kadar harcanan süre, bu süre içinde aldıkları mesafe ve hayvanların hareketleri tankın merkezinden yaklaşık 2 m yükseklikte olan bir video kamera sistemi ile izlenerek kayıt altına alındı. Tank, havuzun tam merkezinden birbirini dik kesecek şekilde 2 çizgi ile kuzey doğu (KD), kuzey batı (KB), güney doğu (GD) ve güney batı (GB) olmak üzere dört eşit kadrana bölündü. Çizgilerin havuzun kenarlarını kestiği noktalar kuzey, güney, doğu ve batı yönü olarak belirlendi. GB kadrانının tam ortasına su yüzeyinin altında kalacak şekilde platform yerleştirildi ve deney süresince yerinde sabit kaldı. Sıçanlar, her gün sırasıyla güney, batı, kuzey ve doğu yönlerinden yüzleri

tankın duvarına dönük olacak şekilde suya bırakıldı. Suyu bırakılan sıçanın 60 sn içerisinde platformu bulması beklendi. Bu süre içerisinde platformu bulamayan sıçanların çevreyi tanımasını sağlamak için 20 sn kadar platformun üzerinde tutuldu ve daha sonra kafesine alındı. Bu işlemler günde 5 kere ard arda 4 gün tekrarlandı. Böylece her sıçana 4 günde toplam 20 deney uygulandı. Sıçanların her denemeleri arasında süre 5-10 dakika vardı. Öğrenme deneyleri bittikten sonra beşinci günde her bir sıçana hatırlatma deneyi (probe trial) yapıldı. Probe trail sırasında platform havuzdan çıkartıldı ve sıçanın 60 sn boyunca serbestçe yüzmesine izin verildi. Sıçanın her bir kadranda harcadığı süre ve toplam katettiği mesafe kaydedildi. Probe trail değerlendirmesinde, platformun daha önce bulunduğu kadranda geçirdiği süre değerlendirildi. Davranışsal veriler, Noldus Ethovision image video tracking sistemi kullanılarak yüzme mesafesi, platformu bulma süresi ve her kadranda harcadığı süre değerlendirildi.

3.6.5 Anksiyete Benzeri Davranışların Değerlendirilmesi

Gruplar arasındaki anksiyete benzeri davranışlar, açık alan ve yükseltilmiş artı labirent testleri kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.6.5.1 Açık alan testi (Open Field Test)

Lokomotor aktivite ve anksiyete benzeri davranışları değerlendirmek için açık alan testi kullanılmıştır (147). Açık alan testi, 1 metre karelik bir alan 35 lükslük bir ışık kaynağı tarafından aydınlatılmakta ve deney hayvanı bu alanın merkezine konulup 5 dakika boyunca bu alanda tutulmaktadır. Deneye hayvanının test süresince hareketleri kamera sistemi ile kaydedilmektedir. Açık alan testinde zemin, 12 tanesi kenarlarda 4 tanesi merkezde olmak üzere 16 eş kareye bölünmüştür. Kamera sistemi otomatik olarak alanın kenarlarında ve ortasında geçirilen süreleri kayıt altına almaktadır. Ayrıca deney hayvanının test boyunca yaptığı dışkı sayısı sayılmıştır. Deney düzeneği her testin yapılmasının ardından % 70'lik alkol ile temizlenmiştir. Deneyin sonucunda hayvanın test alanının kenarlarında ve ortasında geçirilen süre ve toplam aldığı mesafe değerlendirildi. Testin kayıt ve analizinde Noldus Ethovision image video tracking sistemi kullanıldı.

3.6.5.2 Yükseltilmiş artı labirent testi

Deney hayvanının anksiyete seviyesinin test edilmesine yarayan diğer bir düzenek yükseltilmiş artı labirent testidir (147). Ayrıca deney hayvanının lokomotor aktivitesi bu test ile değerlendirilebilir. Yükseltilmiş artı labirent testi, zeminden 75 cm yükseklikte, merkezde 5×5 cm’lik bir merkez platform ile yanlarda 50 cm uzunluğunda, 10 cm genişliğinde, 0,5 cm yüksekliğinde duvarları bulunan iki açık ve 50 cm uzunluğunda, 10 cm genişliğinde, 40 cm yüksekliğinde duvarları bulunan iki kapalı koldan oluşan bir düzenden oluşmaktadır. Deney hayvanı açık kollardan birine bakacak şekilde merkez platforma bırakılarak 5 dakika boyunca kamera sistemi izlenerek açık ve kapalı kollara giriş sayısı ile merkez platformda ve kollarda geçirilen süre ölçülmüştür. Deney düzeneği her testin yapılmasının ardından % 70’lik alkol ile temizlenmiştir. Bu testin kayıt ve analizinde bölümümüzde bulunan Noldus Ethovision XT video tracking sistemi kullanılmıştır.

3.6.6 Sakrifikasyon, serum ve doku örneklerinin toplanması

Karbondiyoksit (CO₂) anestezisi altında sıçanın sol kardiyak ventrikülden tüm kanı alınarak yaşamı sonlandırılmıştır. Beyin hızla çıkarılarak hipokampus ve serebellum olmak üzere bölgelere ayrılmıştır. Doku homojenat ve süpernatantlar ölçümler yapılana kadar -80°C’de buzdolabında saklanmıştır.

3.6.6.1 Doku homojenatlarının ve serumun hazırlanması

Deney hayvanlarının sakrifikasyonundan sonra kalbin sol ventrikülünden alınan kan örnekleri 5000 g’de 15 dakika +4°C’de santrifüje edilerek serumları ayrılmıştır. Ayrıştırılan serumlar ıslak laboratuvar işlemleri yapılınca dek -80°C’de buzdolabında saklanmıştır.

Sakrifikasyon sonrası -80°C’de saklanan hipokampus ve serebellum dokuları ilk olarak hassas doku tartısı ile tartıldı. Ardından dokular, zirkonyum silikat boncuklar kullanılarak Doku ağırlığı (g): PBS hacmi (ml) oranı 1:10 olacak şekilde doku üzerine PBS eklendikten sonra Biospec MiniBeadbeater-16 (BioSpec Products Inc., USA) cihazı ile homojenizasyon işlemi yapıldı. Homojenatlara 5000 g’de 15 dakika

süresince 4°C’de santrifüj işlemi uygulandı. Elde edilen süpernatantlar yapılacak tüm biyokimyasal analizler için kullanıldı.

3.6.7 Biyokimyasal analizler

Kan plazmasında lipit profili, alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), ürik asit ölçümü için DEÜ Merkez Laboratuvarından hizmet alınmıştır. Kan keton ve glukoz düzeyleri ketometre ve glukometre ile ölçülmüştür. Kit protokolüne uygun olarak ELISA yöntemiyle plazma A β 42 düzeyleri; hipokampus ve serebellum beyin dokularında ise AQP4 ve A β 42 düzeylerine bakılmıştır.

3.6.7.1 Kan keton ve glukozu ölçümü

Sıçanlar, sakrifikasyondan önce 2 saat aç bırakıldı. Sakrifikasyon sırasında kalpten alınan kanda glukoz ve keton test stribi kullanarak glukometre ve ketometre (On.Call Advanced GK Dual) ile keton ve glukoz düzeyleri ölçüldü.

3.6.7.2 Kan lipit profili, alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), ürik asit ölçümü

-80 buzdolabından çıkarılan kan serumlarının oda sıcaklığında çözünmesi için beklenilmiştir. Daha sonra, düşük dansiteli lipoprotein (LDL), yüksek dansiteli lipoprotein (HDL), trigliserit, total kolesterol, ALT, AST ve ürik asit düzeyleri Dokuz Eylül Üniversitesi Merkez Laboratuvarı’ndaki oto analizör (Siemens Healthineers, ADVIA 1800 Chemistry System) ile ölçülmüştür.

3.6.7.3 Amiloid Beta- 42 (A β 42) ölçümü

Hipokampus, serebellum ve kan plazmalarında A β 42 analizleri için Bioassay Technology Laboratory (BT-LAB) Rat A β 1-42 beta peptid ELISA kiti (katalog no: E0093Ra, China) kullanılmıştır.

Kit duyarlılığı 2,52 pg/ml, ölçüm aralığı ise 5 pg/ml- 2000 pg/ml’dir. Tekrarlanabilirlik değişim katsayısı %10’dan küçüktür.

ELİSA Kit içeriği:

1. 96 kuyucuklu mikropalak
2. Standart solüsyonu
3. Streptavidin-HRP
4. Biotinize edilmiş Rat A beta 1-42 antikoru
5. Konsantre Yıkama solüsyonu (25x)
6. Substrat reaktif maddeleri (A ve B)
7. Reaksiyon durdurma solüsyonu

Kit içeriğinin hazırlanması:

- 1- Kullanım öncesi tüm materyaller oda ısısına (18-25°C) getirildi.
- 2- Yıkama solüsyonu: Yoğunlaştırılmış yıkama tampon solüsyonu (25x, 20 ml) 500 ml distile su içerisine eklenerek seyreltildi.
- 3- Standart çalışma solüsyonu: 120 µl'lik referans standardın (2400 pg/ml) üzerine 120 ml referans standart&örnek solüsyonu eklenip karıştırıldı ve ardından 1200 pg/ml konsantrasyonunda çalışma solüsyonu hazırlandı. Sonrasında seri seyreltmeler yapıldı. Seyreltme metodu: 6 adet 2 ml'lik (ependorf) tüp alınarak her birine 120 µl referans standart&örnek solüsyonu eklendi. İlk tüpte hazırlanan 1200 pg/ml konsantrasyonundaki çalışma solüsyonundan 120 µl ilave edildi. Sonrasında her tüpe (son tüp hariç) sırayla bir önceki tüpten 120 µl alınıp eklenerek standartlar 2400, 1200, 600, 300, 150, 75 pg/ml ve 0 pg/ml konsantrasyonlarında olacak şekilde hazırlandı.

Analizin yapılışı:

- 1- ELISA plağındaki ilk sütuna standartlar ve blank/kör yerleştirildi. Diğer kuyucuklara örnekler koyuldu. Standart kuyucuklarına 50 µl standartlar koyuldu. Ardından uygun kuyucuklara 40 µl örnek ve 10 µl biyotinize Aβ1-42 antikoru çalışma solüsyonu koyuldu. Daha sonra standart ve örnek kuyucuklarına 50 µl Streptavidin-HRP koyuldu. Sonrasında plağın üzeri kapatıldı ve 37 °C'deki inkübatörde 60 dakika inkübe edildi.

2- İnkübasyon sonrasında multiplak yıkama cihazında (Thermo Scientific™ Wellwash™ Versa Microplate Washer) plak 30 sn ile 1 dk arasında 300 µl yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı.

3- Her kuyucuğa 50 µl Substrat A solüsyonu koyuldu. Ardından 50 µl Substrat B solüsyonu konuldu ve plağın üzeri kapatılarak 37 °C’de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.

4- Her kuyucuğa 50 µl reaksiyon durdurma solüsyonu koyuldu. Kuyucuklardaki mavi renk sarı renge döndü.

5- Thermo Scientific Multiscan GO marka multiplak okuyucuda 10 dk içinde 450 nm dalga boyunda optik yoğunluk değerleri (OD) ölçüldü. Değerler pg/ml olarak hesaplandı.

3.6.7.4 Aquaporin-4 (AQP4) ölçümü

Hipokampus ve serebellumda AQP-4 analizleri için Bioassay Technology Laboratory (BT-LAB) Rat AQP4 ELISA kiti (katalog no: E058Ra, China) kullanılmıştır.

Kit duyarlılığı 0,034 pg/ml, ölçüm aralığı ise 0,06 ng/ml- 18ng/ml’dir. Tekrarlanabilirlik değişim katsayısı %10’dan küçüktür.

ELİSA Kit içeriği:

1. 96 kuyucuklu mikropalak
2. Standart solüsyonu (19,2 ng/ml)
3. Streptavidin-HRP
4. Biotinize edilmiş Rat AQP-4 antikoru
5. Konsantre Yıkama solüsyonu (25x)
6. Substrat reaktif maddeleri (A ve B)
7. Reaksiyon durdurma solüsyonu

Kit içeriğinin hazırlanması:

1- Kullanım öncesi tüm materyaller oda ısısına (18-25°C) getirildi.

2- Yıkama solüsyonu: Yoğunlaştırılmış yıkama tampon solüsyonu (25x, 20 ml) 500 ml distile su içerisine eklenerek seyreltildi.

3- Standart çalışma solüsyonu: 120 µl'lik referans standardın (19,2 ng/ml) üzerine 120 ml referans standart&örnek solüsyonu eklenip karıştırıldı ve ardından 9,6 ng/ml konsantrasyonunda çalışma solüsyonu elde edildi. Sonrasında seri seyreltmeler yapıldı. Seyreltme metodu: 6 adet 2 ml'lik (ependorf) tüp alınarak her birine 120 µl referans standart&örnek solüsyonu eklendi. İlk tüpte hazırlanan 9,6 ng/ml konsantrasyonundaki çalışma solüsyonundan 120 µl ilave edildi. Sonrasında her tüpe (son tüp hariç) sırayla bir önceki tüpten 120 µl alınıp eklenerek standartlar 19,2, 9,6, 4,8, 2,4, 1,2 ng/ml ve 0,6 ng/ml konsantrasyonlarında olacak şekilde hazırlandı.

Analizin yapılışı:

1- ELISA plağındaki ilk sütuna standartlar ve blank/kör yerleştirildi. Diğer kuyucuklara örnekler koyuldu. Standart kuyucuklarına 50 µl standartlar koyuldu. Ardından uygun kuyucuklara 40 µl örnek ve 10 µl biyotinize Aβ1-42 antikoru çalışma solüsyonu koyuldu. Daha sonra standart ve örnek kuyucuklarına 50 µl Streptavidin-HRP koyuldu. Sonrasında plağın üzeri kapatıldı ve 37 °C'deki inkübatörde 60 dakika inkübasyona bırakıldı.

2- İnkübasyon sonrasında multiplak yıkama cihazında (Thermo Scientific™ Wellwash™ Versa Microplate Washer) plak 30 sn ila 1 dk arasında 300 µl yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı.

3- Her kuyucuğa 50 µl Substrat A solüsyonu koyuldu. Ardından 50 µl Substrat B solüsyonu konuldu ve plağın üzeri kapatılarak 37 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.

4- Her kuyucuğa 50 µl reaksiyon durdurma solüsyonu koyuldu. Kuyucuklardaki mavi renk sarı renge döndü.

5- Thermo Scientific Multiscan GO marka multiplak okuyucuda 10 dk içinde 450 nm dalga boyunda optik yoğunluk değerleri (OD) ölçüldü. Değerler pg/ml olarak hesaplandı.

3.6.7.5 BCA protein analizi

Hipokampus ve amigdala BCA (bikinkoninik asit) protein analizleri ABP Biosciences marka BCA Protein Assay Kit (katalog no: P011) kullanılarak gerçekleştirildi. Kitin duyarlılığı 5 µg/ml. Örnek hacmi aralığı 1-20 µl, konsantrasyon aralığı 20-2000 µg/ml idi.

Kit içeriği:

- 1- Reaktif A
- 2- Reaktif B
- 3- Protein standardı

Analizin yapılışı:

1- Protein standardı 1 ml protein standart solüsyonu ile karıştırıldı. Böylece 10 mg/ml konsantrasyonunda stok solüsyon elde edildi.

2- Stok solüsyonu 1 mg/ml konsantrasyonda seyreltilti.

3- BCA çalışma solüsyonunun hazırlanması: reaktif A ve reaktif B 50:1 oranında karıştırıldı.

4- Standart solüsyondan sırayla 0, 4, 8, 12, 16, ve 20 µl alınarak boş bir düz tabanlı plaktaki kuyucuklara konuldu. Her kuyucuğa standart diluent eklenerek hacim 20 µl'ye tamamlandı ve seyreltilti.

5- Örneklerden 20 µl alınarak mikrolaktaki diğer kuyucuklara eklendi.

6- Her bir kuyucuğa 200 µl BCA çalışma solüsyonu eklendi ve 37°C'de inkübatörde 30 dakika inkübasyona bırakıldı.

7- Sonuçlar 562 nm'de Thermo Scientific Multiscan GO marka multiplak okuyucuda analiz edildi.

3.6.8 İntrasisternal yolla izleyici (tracer) maddenin beyin içine infüzyonunun yapılması

Floresein isothiocyanate (FITC)- dekstran (Sigma-Aldrich, 500 kDa) kan akışı, vasküler drenaj gibi süreçlerin ölçümünü takip etmek için kullanılan izleyici floresan boya olup aynı zamanda mikrodolaşım, perfüzyon ve hücre membran geçirgenliği araştırmalarında kullanılmaktadır. Floresein-dekstran (500 kDa), beyin omurilik sıvısı izleyicisi olarak kullanılmaktadır (148).

Ramos ve arkadaşlarının glimfatik fonksiyon çalışmak için uyguladığı yöntem kullanılarak sisternal magna (CM) enjeksiyonu yapılmıştır (149).

İntrasisternal enjeksiyon için öncelikle kanül hazırlandı. 30 GA dental iğnenin 5-10 mm kadar ucundan kesildi. Kırılan iğne ucu 30 cm'lik polietilen tüp (PE10) ucuna yerleştirildi. Yapay beyin omurilik (126 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1,25 mM NaH₂PO₄, 2 mM MgSO₄, 2 mM CaCl₂, 1 mM glukoz, 26 Mm NaHCO₃, 1 litre distille su) hazırlandı ve izleyici floresan boya %5'lik konsantrasyonla yapay beyin omurilik sıvı içerisinde çözüldü. 100 µL'lik Hamilton şırıngasına 30 GA hipodermik iğne ucu takıldı ve 20 µL floresan boya çekildi. Tübülün diğer ucuna eklendi.

İzleyici madde verilecek sıçanların ilk olarak ağırlıkları tartıldı. Daha sonra, sıçanlara intraperitoneal (i.p.) olarak 21 GA insülin enjektörü ile genel anestezi (ketamine+ksilazin; sırasıyla, 50 mg/kg ve 5 mg/kg) uygulandı. Yaklaşık 5-10 dk kadar sıçanların anestezi altına girmesi beklenildi ve ara sıra arka ayak refleksi ve nefesi alışverişi kontrol edildi. Anesteziye giren sıçanın kafasının arkası bir tıraş makinesi aracılığıyla tıraş edildi. Sıçan stereotaksik alete yerleştirilerek kafa ve burun sabitlendi. Gözlerine göz damlası damlatıldı. Kafatasının arkasından kulak hizasından ince bir makas yardımı ile orta hat (oksipital tepe noktası referans alındı) boyunca yaklaşık 1 cm kadar bir kesi yapıldı.

Boyun kaslarını ortaya çıkarmak için kavisli forseps ile yüzeysel bağ dokusu ayırıldı ve bağ dokusunun ayrılması sırasında ortaya çıkan kanamalar pamuklu çubuk aracılığıyla temizlendi. Kasların ayrılması ile sisterna magna (CM) ortaya çıkarıldı. CM, serebellum ve medulla arasında ters çevrilmiş üçgene benzer gri renkte bir yapıdır. Ekartör aracılığıyla kaslar ayrıldı ve pamuklu çubuk yardımıyla CM membranı silindi.

Tübülün ucuna yerleştirilen iğnenin eğimli ucu duraya dik olarak CM'nin ortasına yerleştirildi. Yerleştirilme sırasında dışarı çıkan beyin omurilik sıvısı silindi. İğne ucunun sabitlenmesi için yapıştırıcı damlatıldı. Daha sonra enjeksiyon işlemine başlandı. 5 dk boyunca 2 µL/dk hız (toplam 10 µL) ile izleyici floresan boya enjekte edildi. Enjeksiyondan sonra tübülün ucu koter yardımı ile kesildi ve sıçan ısıtma pedine alınarak sağ tarafa yatırılıp 30 dk boyunca floresan boyanın beyin omurilik sıvısında dolaşmasına izin verildi.

3.6.9 Beyin kesitlerinin hazırlanması

Sıçanlara genel anestezi (ketamine+ksilazin; sırasıyla, 50 mg/kg ve 5 mg/kg, intraperitoneal (i.p.)) uygulandıktan sol kardiyak ventrikülün apeksinden şırınga yardımıyla önce serum fizyolojik (SF) verildi ve kanın uzaklaşması sağlandı daha sonra fiksasyon için %4'lük para formaldehit (PFA) sol kardiyak ventrikülün apeksinden şırınga ile verildi. Perfüzyon sonrası sıçanın beyni çıkartıldı ve +4°C buzdolabında 48 saat boyunca %4'lük PFA içinde bekletildi. Daha sonra %4'lük PFA'dan çıkarılan beyin dokuları farklı konsantrasyonlardaki süktroz solüsyonlarına sırasıyla koyuldu: önce oda sıcaklığında %10 süktroz solüsyonu 1 saat, %20 süktroz solüsyonu daha sonra 1 saat ve %30 süktroz solüsyonunda beyin dokusu dibe çökene kadar +4°C buzdolabında bekletildi. Süktroz solüsyonundan çıkarılan beyinlerin hipokampus ve serebellum bölgelerini içeren kısımları kesilerek uygun doku gömme kalıplarına konuldu ve O.C.T ile dolduruldu. Leica (CM 1950) marka kryostat -25°C ayarlandı ve O.C.T.'ye gömülü dokuların donması beklenildi. İzleyici madde enjekte edilen sıçan beyinlerinden 8 µm kalınlıkta 10 adet frozen kesit alınarak pozitif şarjlı lamalar üzerine alındı ve -80°C buzdolabında saklandı. İmmunofloresan boyama yapılacak beyin dokularından her sıçandan 10 adet 50 µm kalınlıkta kesitler alındı. Alınan beyin kesitleri 1x PBS ile dolu 6 kuyucuklu plaklara alındı ve 5 dk boyunca 3 kez yıkama işlemi yapıldı. Daha sonra görüntüleme yapana kadar frozen beyin kesitleri 2 ml'lik mikrosantifüj tüplerine koyulan 1-1,5 ml saklama solüsyonu (250 ml için 70 gr süktroz, 75 ml etilen glikol ve 0,1 M fosfat tamponu uygun hacime ulaşana kadar eklenir) içine transfer edildi ve çalışılana kadar -80°C buzdolabında saklandı.

3.6.9.1 İzleyici floresan maddenin beyine nüfuzu, DAPI ile boyanması ve floresan mikroskopla görüntülenmesi

-80°C buzdolabından alınan örneklerin olduğu preparatlar karanlık bir ortamda oda sıcaklığına gelmesi için 20 dk kadar bekletildi. Daha sonra 3 kez 1x TBS ile yıkandı ve DAPI (4',6-Diamidino-2-Fenilidol, Dihidroklorik, katalog no: D1306 ve 1x PBS ile 1:1000 seyreltildi) boyandı ve 15 dk kadar oda sıcaklığında bekletildikten sonra OLYMPUS BX61 markalı floresan mikroskop altında hem FITC-dextran 500 hem de DAPI ile beyin kesitlerinden görüntü alınarak izleyici maddenin beyin korteksinden geçişini görüntüsü alınmıştır.

3.6.9.2 Glial Fibril Asidik Protein (GFAP) ve Aquaporin-4 (AQP4)'ün immunofloresan boyanması ve görüntülenmesi

İmmunofloresan boyama için Potts E.M ve arkadaşlarının kullandığı serbest yüzdürme (free-floating) yöntemi kullanılmıştır (150).

Bloklama Solüsyonunun Hazırlanması

- 1- 1x TBS
- 2- 0.3% Triton X-100 (Sigma, T-8787, 100 ml)
- 3- 3 % Goat Serum (Capricorn Scientific, 100 ml)

Antikor Dilüsyon Solüsyonunun Hazırlanması

- 1- 1x TBS
- 2- 0.3% Triton X-100 (Sigma, T-8787, 100 ml)
- 3- 1 % Goat Serum (Capricorn Scientific, 100 ml)

Primer Antikorlar

-Aquaporin-4 su kanalını hipokampus ve serebellumda işaretlemek için **Aquaporin-4 Poliklonal Primer Antikoru** (Bioss Antibodies, katalog no: bs-0634R, Host: Rabbit, Reaktive Species: Human, Mouse, rat,) 1:100 dilüsyon yapılarak kullanıldı.

-Hipokampus ve serebellumdaki astrositler için **GFAP Poliklonal Primer Antikoru** (Bioss Antibodies, katalog no: bs-0199R, Host: Rabbit, Reaktive Species: Human, mouse, rat, others) 1:100 dilüsyon yapılarak kullanıldı.

Sekonder Antikorlar

-Aquaporin-4 su kanalı için **Anti-rabbit IgG (H+L), F(ab')₂, Fragment (Alexa Fluor 594 Conjugate)** (Cell Signaling Technology, USA, katalog no: #8889, Source: Goat) sekonder antikoru 1:500 oranında dilüsyon yapılarak kullanıldı.

- Astrositler için **Anti-rabbit IgG (H+L), F(ab')₂, Fragment (Alexa Fluor 488 Conjugate)** (Cell Signaling Technology, USA, katalog no: #4412, Source: Goat) sekonder antikoru 1:500 oranında dilüsyon yapılarak kullanıldı.

Birinci gün boyama basamakları

- 1- -80°C buzdolabından çıkarılan saklama solüsyonu içerisindeki kesitlerin oda sıcaklığına gelmesi için 20 dk kadar bekletildi.
- 2- Saklama solüsyonundan arındırmak için 6-kuyucuklu plaklar içerisine alındı.
- 3- Her kuyucukta yaklaşık 6 ml kadar 1xTBS eklendi. Beyin kesitleri 1x TBS ile 3 kez 5 dk boyunca yıkandı. Hafif bir şekilde her yıkamada plak çalkalandı.
- 4- Her kuyucuğa yaklaşık 7 ml kadar blok solüsyonu koyuldu ve yıkanan beyin kesitleri blok solüsyonuna alındı ve 30 dk boyunca bekletilerek bloklama işlemi yapıldı.
- 5- Daha sonra 2 ml mikrosantrifüj tüpler içerisine 1-1,5 ml kadar primer antikor koyuldu ve bloklama işlemi sonrası dokular primer antikorun içine alınarak 1 gece boyunca (12-14 saat) +4°C buzdolabında saklandı.

İkinci gün boyama basamakları

- 1- Primer antikordan alınan kesitler 1x TBS ile 3 kez yıkandı (ilk iki yıkama 30 sn, son yıkama 10 dk).
- 2- Sekonder antikorlara uygun 1:500 dilüsyon yapıldıktan sonra 2 ml'lik mikrosantrifüj tüp içine alındı ve kesitler bu tüplere aktarıldıktan sonra 2 saat boyunca karanlık ortamda oda sıcaklığında tutuldu.

- 3- 2 saat sonra kesitler 3 kez 1x TBS ile yıkandı (ilk iki yıkama 30 sn, son yıkama 15 dk).
- 4- Son yıkama sırasında 1:1000 dilüsyon yapılan DAPI eklendi.
- 5- Kesitler fırça yardımıyla pozitif şarjlı lam üzerine yüzdürülerek yerleştirildi.
- 6- 10-15 dk kuruması için bekletildi ve üzerine lamel kapatıldı.

ZEISS (LSM880) marka lazer taramalı konfokal mikroskop kullanılarak hipokampus ve serebellumda AQP-4 ve GFAP immuflorosan boyama görüntülenmesinden sonra 10X ve 40X görüntüler alındı. 8 örneğin beyin bölgelerinde AQP-4 ve GFAP ortalama floresan yoğunluk yüzdesi alınarak hesaplama yapıldı.

3.7 Verilerin değerlendirilmesi

İstatistiksel analiz için Graph.Pad Prism 9.0 programı kullanılmıştır. Gruplar arasındaki farklılıklar 2'den fazla olan gruplarda tek yönlü varyans analizi (ANOVA), tekrarlayan ölçümlerde ANOVA (GLM-repeated measures) testi ile değerlendirilmiştir ve anlamlılık olması durumunda gruplar arasındaki farkı değerlendirmek için post-hoc Bonferroni testi yapılmıştır. 3'ten az grupların karşılaştırılmasında bağımsız gruplar arasında t-testi (Independent samples t-Test) ile değerlendirilme yapılmıştır. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlılık sınır değeri olarak kabul edilmiştir.

3.8 Araştırmanın sınırlılıkları

Çalışmanın başlangıç planında büyük ve küçük moleküler ağırlıklı tracer maddenin beyine geçişi araştırılacaktı ancak yetersiz bütçe nedeniyle sadece büyük moleküler ağırlıklı izleyici madde kullanılabildi. Ketojenik diyet ve antibiyotik sonrası hayvanların gaita örneklerindeki mikrobiyota değişimi analizi yapılamadı bu nedenle gaita örnekleri toplandı ve -80'de mikrobiyota analizi yapılana kadar saklanacaktır. Çalışmanın inflamasyon ayağı başta planlandı ancak yetersiz bütçe nedeniyle bakılamadı. İmmünofloresan boyama yöntemi sadece GFAP ve AQP4'ün lokalizasyon ve floresan yoğunluğuna bakıldı. Kognitif fonksiyonlarda önemli bir biyobelirteç olan BDNF düzeylerine bakılamadı.

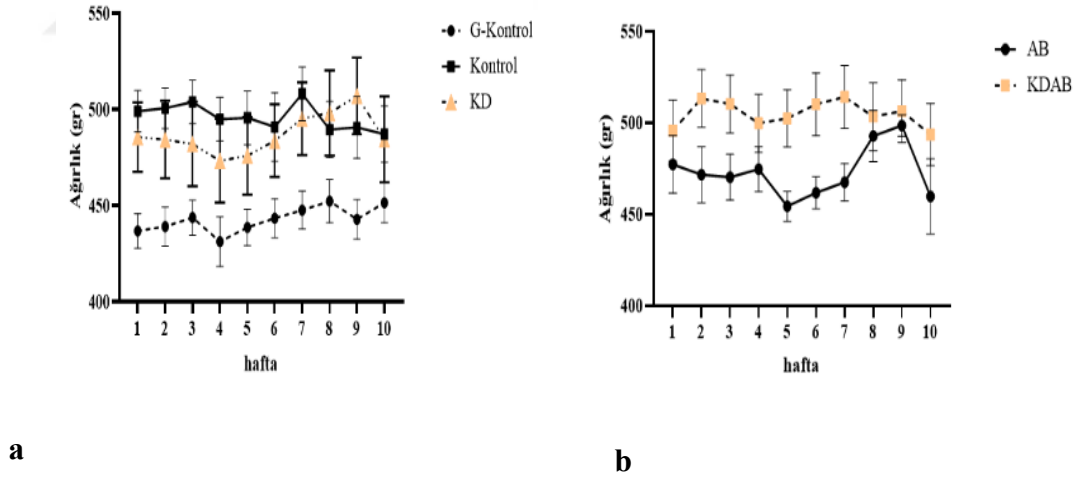
3.9 Etik Kurul Onayı

Bu çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Yerel Etik Kurulu tarafından 22.12.2021 tarihinde 46/2020 kararı ile “Ketojenik Diyetin, Yaşlı Sıçanlarda Aquaporin-4 (AQP-4) Aracılı Glimfatik Sistem Üzerindeki Etkisinde Bağırsak Mikrobiyotasının Rolünün Araştırılması” olarak kabul edilip onaylanmıştır.

4 BULGULAR

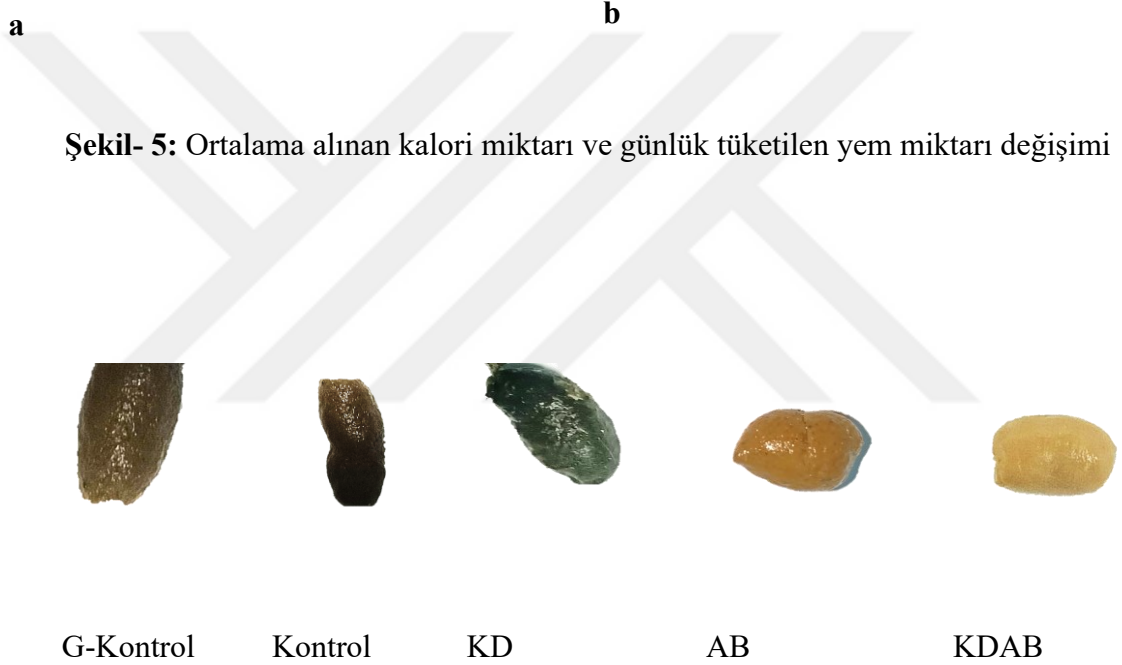
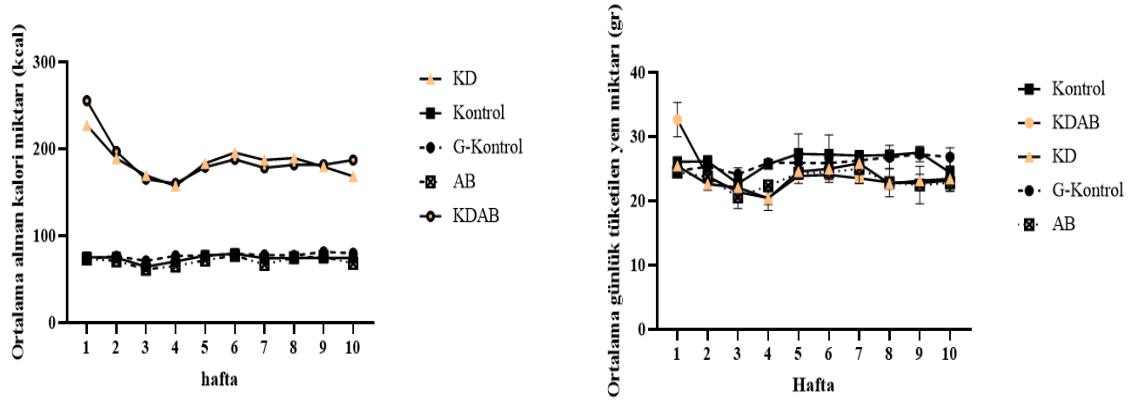
4.1 Vücut Ağırlığı ve Ortalama Günlük Alınan Enerji Miktarı ve Gaita Renk Değişimi

G-Kontrol, Kontrol ve KD gruplarının ve antibiyotik gruplarının 10 hafta boyunca tekrarlayan ağırlık ölçümlerinde anlamlı bir fark görülmedi ($p>0,05$) (Şekil- 4a ve 4b).



Şekil- 4. Haftalık vücut ağırlığı değişimi

KD gruplarının 10 hafta boyunca ortalama günlük alınan kalori miktarı ve günlük tüketilen yem miktarı ilk 4 hafta boyunca azalma eğiliminde giderken sonraki haftalarda alınan kalori miktarı ve tüketilen yem miktarı aynı oranlarda devam etti (Şekil- 5.a ve 5.b).

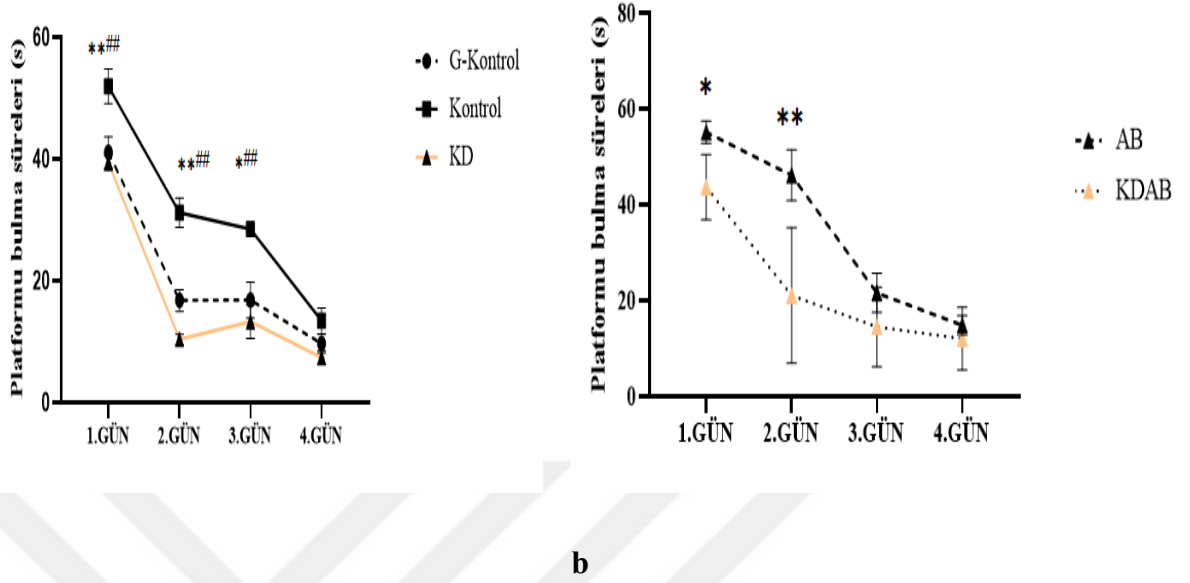


Şekil- 6: Diyet ve antibiyotik tedavisi sonrası gaita renk değişimi

4.2 Davranış Deneylerinin Bulguları

4.2.1 Morris Su Tankı Bulguları

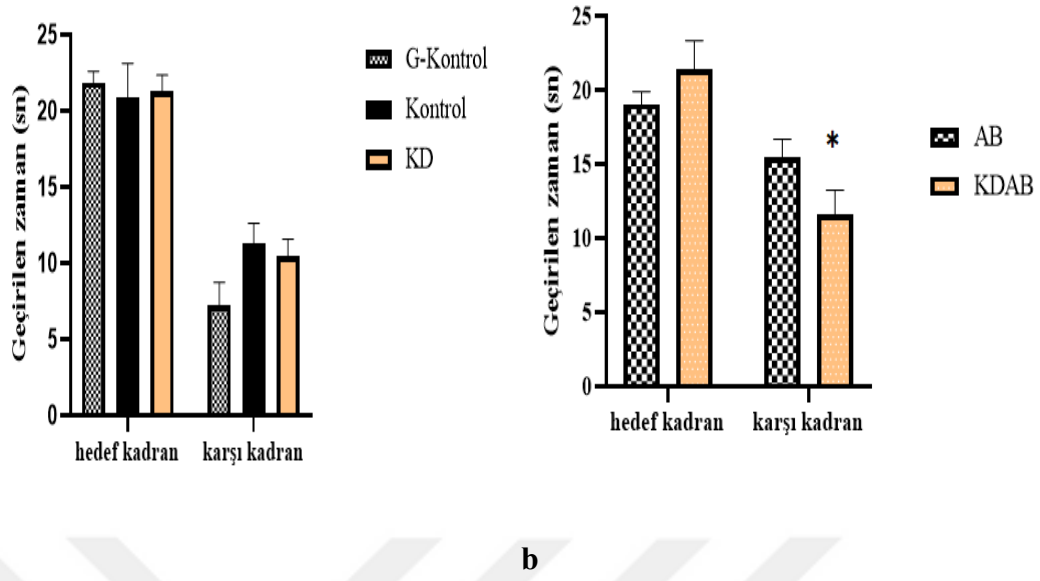
Morris su tankı testinde, G-Kontrol grubunun 1.gün, 2.gün ve 3. günde platformu bulma süreleri Kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır (1. gün ve 2. gün için $p < 0,01^{**}$, 3. gün için $p < 0,05^{*}$). Ayrıca, KD grubunun 1.gün, 2.gün ve 3. günde platformu bulma süreleri Kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır (1.gün, 2.gün



Şekil- 7: Morris su tankı testinde dört günlük platformu bulma süreleri

ve 3. gün için $p < 0,01^{##}$). G-Kontrol ve KD grubunda arasında ilk üç gün ve 4.gün ise tüm gruplar arasında platformu bulma süreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p > 0,05$) (Şekil- 7.a). AB ve KDAB gruplarının 4 günlük platformu süreleri değerlendirilmiştir. KDAB grubunun, 1. gün ve 2. gün platformu bulma süresi AB grubuna göre anlamlı şekilde azaldı (1. gün için $p < 0,05^*$ ve 2. gün için $p < 0,01^{**}$), 3. gün ve 4. gün ise gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p > 0,05$) (Şekil- 7.b).

Morris su tankı testinde, belleğin değerlendirildiği 5. gündeki probe testinde hedef kadranda ve karşı kadranda geçirilen zaman bakımından diyet grupları arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır ($p > 0,05$) (Şekil- 8.a). Morris su tankı probe testinde, AB ve KDAB gruplar arasında hedef kadranda geçirilen zaman bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken ($p > 0,05$), karşı kadranda geçen süre KDAB grubunda AB grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır ($p < 0,05^*$) (Şekil- 8.b).

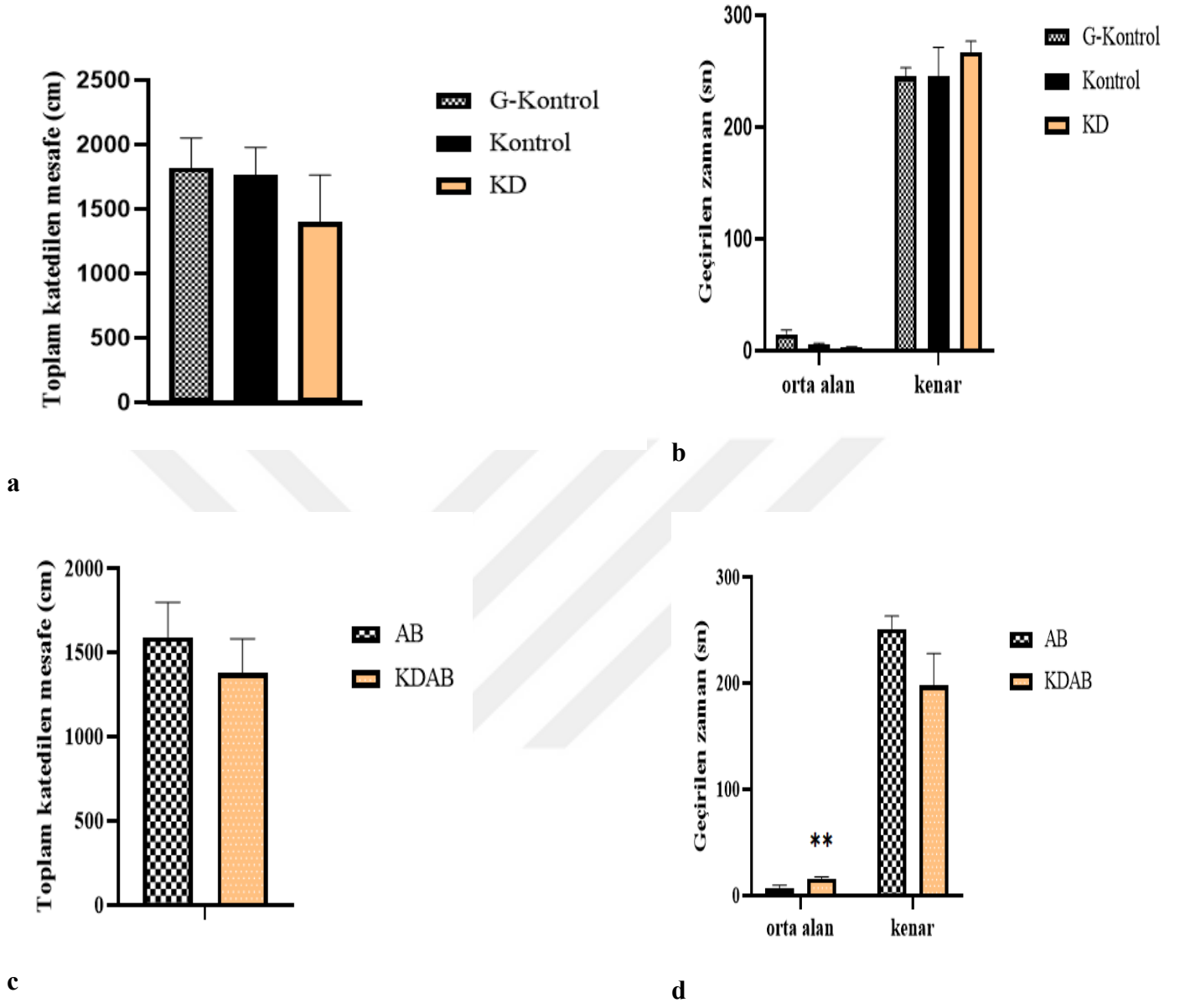


Şekil- 8: Morris su tankı probe testi. Beşinci gün platformun olduğu hedef kadranda ve karşı kadranda geçirilen zaman

4.2.2 Açık Alan Testi Bulguları

Açık alan testinde, diyet grupları arasında toplam kat ettiği mesafe karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$) (Şekil- 9.a). Ancak, orta alan ve kenarda geçirilen zaman bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$) (Şekil- 9.b).

AB ve KDAB grupları arasında toplam kat ettiği mesafe karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$) (Şekil- 9.c). AB grubu ile kıyaslandığında KDAB grubunun kenarda geçirdiği süre bakımından aralarında anlamlı bir fark bulunamazken ($p>0,05$), orta alanda geçirilen süre KDAB grubunda AB grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ($p<0,01^{***}$) (Şekil- 9.d).

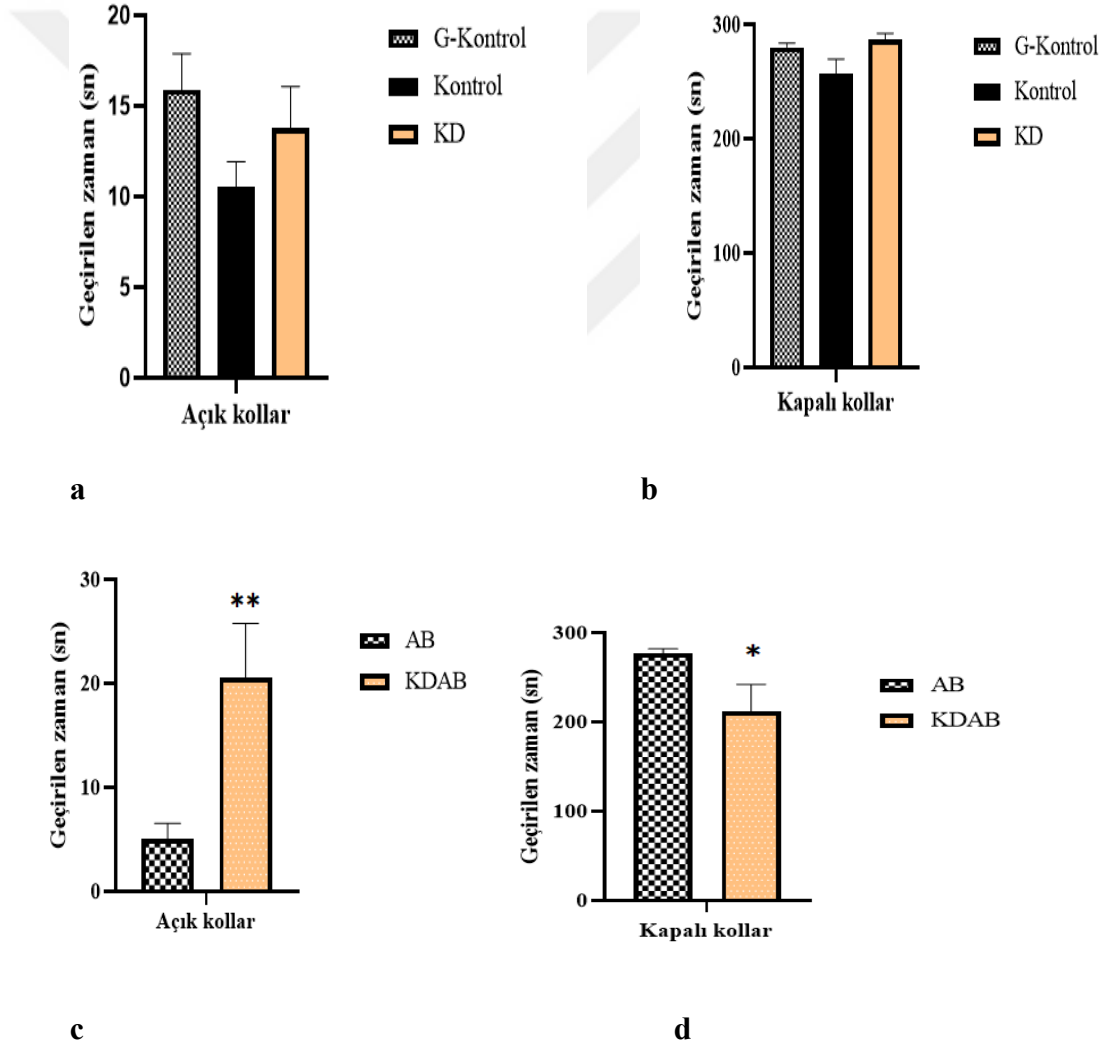


Şekil- 9: Açık Alan Testi Bulguları

4.2.3 Yükseltiilmiş Artı Labirent Testi Bulguları

Yükseltiilmiş artı labirent testinde, açık ve kapalı kollarda geçen zaman bakımından G-Kontrol, Kontrol ve KD grupları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0,05$) (Şekil-10.a ve 10.b).

KDAB grubu, AB grubu ile karşılaştırıldığında açık kollarda geçirilen zaman anlamlı düzeyde arttı ($p<0,01^{**}$) (Şekil- 10.c.). Kapalı kollarda geçirilen zaman KDAB grubu AB grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde azaldı ($p<0,05^{*}$) (Şekil-10.d).



Şekil- 10: Yükseltiilmiş artı labirent test bulguları

4.3 Biyokimyasal Analiz Sonuçları

4.3.1 Kan BHB, Glukoz, Lipit Profili, AST, ALT ve Ürik Asit Seviyeleri

KD grubunun kan β -hidroksi bütirat (BHB) düzeyleri, kontrol gruplarına göre anlamlı olarak artmıştır ($p<0,01$). Grupların kan glukoz düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$). Kan lipit profili incelendiğinde, TG ve HDL düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamazken ($p>0,05$), LDL düzeyleri KD grubunda kontrol gruplarına göre anlamlı olarak artmıştır ($p<0,01$). TK düzeyleri KD grubu G-Kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artarken ($p<0,01$), Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Metabolik sendrom marker olarak kullanılan TG/HDL oranı açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Kan plazma ürik asit düzeylerinde gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$). Plazma AST ve ALT düzeyleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$) (Tablo-4).

Tablo-4: Diyet grupları için biyokimyasal ölçümler

	G-Kontrol	Kontrol	KD
BHB (mmol/L)	1,28 ± 0,1	1,2 ± 0,1	<u>2,5 ± 0,1^{xx,##}</u>
Glukoz (mg/dl)	347,8 ± 29,9	324 ± 15,5	411,0 ± 37,3
TG (mg/dl)	53,20 ± 10,4	73,8 ± 6,0	77,4 ± 8,3
LDL (mg/dl)	9,32 ± 0,5	11,28 ± 1,3	<u>26,15 ± 0,4^{xx,##}</u>
HDL (mg/dl)	36,5 ± 2,5	41,25 ± 1,9	54,6 ± 6,5
TK (mg/dl)	55,7 ± 4,0	66,2 ± 4,4	<u>99,8 ± 12,5^{##}</u>
TG/HDL	1,46 ± 0,1	1,80 ± 0,2	1,43 ± 0,1
Ürik asit (mg/dl)	3,12 ± 0,4	2,96 ± 0,3	3,52 ± 0,6
AST (mg/dl)	98,7 ± 9,7	104,2 ± 13,3	118,4 ± 17,8
ALT (mg/dl)	69,7 ± 6,5	67,8 ± 2,7	80,5 ± 9,2

BHB: β-hidroksi bütirat **HDL:** yüksek dansiteli lipoprotein; **LDL:** Düşük dansiteli lipoprotein; **TG:** Trigliserit; **TK:** Total kolesterol; **AST:** Aspartat aminotransferaz; **ALT:** Alanin aminotransferaz. Değerler, ortalama ± standard hata (SEM) olarak verilmiştir ve p < 0,05 değeri anlamlı bulunmuştur. G-Kontrol x Kontrol, p < 0,05* ve p < 0,01**; G-Kontrol x KD, p < 0,05[#] ve p < 0,01^{##}; Kontrol x KD, p < 0,05^x ve p < 0,01^{xx}.

KDAB grubu, AB grubu ile karşılaştırıldığında kan BHB düzeyleri anlamlı olarak arttı (p < 0,01). Glukoz, TG, LDL, HDL, TK, TG/HDL oranı, ÜA, AST ve ALT düzeyleri bakımından antibiyotik grupları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (p > 0,05) (Tablo-5).

Tablo-5: Antibiyotik grupları için biyokimyasal ölçümler

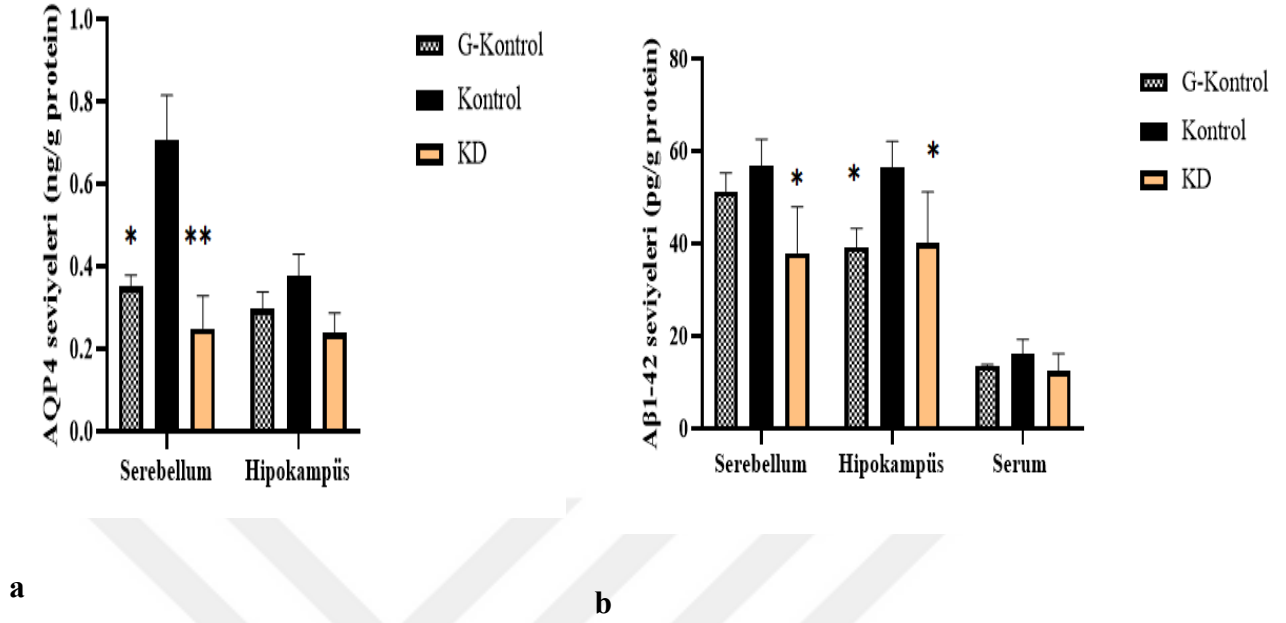
	AB	KDAB
BHB (mmol/L)	1,76 ± 0,1	<u>2,4 ± 0,1**</u>
Glukoz (mg/dl)	412,4 ± 37,3	426 ± 30,6
TG (mg/dl)	65,3 ± 10,4	49 ± 9,1
LDL (mg/dl)	17,6 ± 1,8	16,4 ± 5,1
HDL (mg/dl)	35,3 ± 2,4	48,5 ± 8,9
TK (mg/dl)	61,2 ± 6,7	78,5 ± 13,5
TG/HDL	1,84 ± 0,3	1,12 ± 0,2
Ürik asit (mg/dl)	2,8 ± 0,3	2,7 ± 0,5
AST (mg/dl)	78,5 ± 8,7	78,6 ± 9,8
ALT (mg/dl)	51,3 ± 6,2	55 ± 9,7

HDL: yüksek dansiteli lipoprotein; **LDL:** Düşük dansiteli lipoprotein; **TG:** Trigliserit; **TK:** Total kolesterol; **AST:** Aspartat aminotrasferaz; **ALT:** Alanin aminotrasferaz. Değerler ortalama ± standard hata (SEM) olarak verilmiş ve p <0,05 değeri anlamlı kabul edilmiştir. p<0,05* ve p<0,01** olarak gösterilmiştir.

4.3.2 Diyet Gruplarında Hipokampus, Serebellum AQP4 Su Kanalı ve Aβ₁₋₄₂ Protein Seviyeleri ve Serum Aβ₁₋₄₂ Protein Seviyeleri

Kontrol ile kıyaslandığında, hem G-Kontrol grubunda hem de KD grubunda serebellumdaki AQP4 seviyeleri azaldı (p<0,05[#] ve p<0,05*). Hipokampüsteki AQP4 düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0,05) (Şekil- 11.a).

Kontrol ile kıyaslandığında, KD grubunun hem hipokampus hem de serebellumunda, G-Kontrol grubunun ise hipokampus Aβ₁₋₄₂ seviyeleri anlamlı olarak azalmıştır (her ikisi için p<0,05) ve serumdaki Aβ₁₋₄₂ seviyeleri bakımından diyet grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0,05) (Şekil- 11.b).

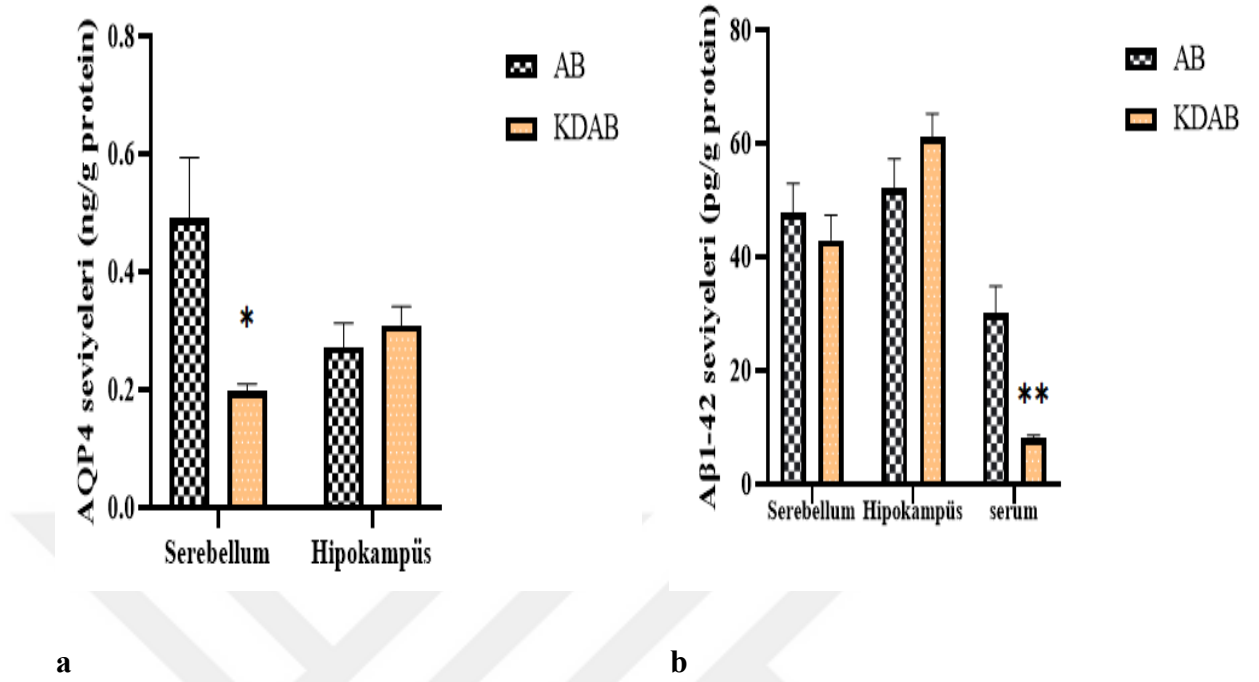


Şekil-11: Diyet gruplarında AQP4 ve Aβ₁₋₄₂ seviyeleri

4.3.3 Antibiyotik Gruplarında Hipokampus, Serebellumda AQP4 Su Kanalı ve Aβ₁₋₄₂ Protein Seviyeleri ve Serum Aβ₁₋₄₂ Protein Seviyeleri

Serebellum AQP4 seviyeleri, KDAB grubunda AB grubuna göre anlamlı olarak arttı ($p < 0,01^{**}$) (Şekil-12.a). KDAB grubunun hipokampus AQP4 seviyeleri AB grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$) (Şekil-12.b).

Antibiyotik grupları arasında serebellum ve hipokampüsteki Aβ₁₋₄₂ seviyeleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). Ancak, serum Aβ₁₋₄₂ seviyeleri KDAB grubunda AB grubuna göre anlamlı olarak azaldı ($p < 0,01^{**}$) (Şekil-12.b).



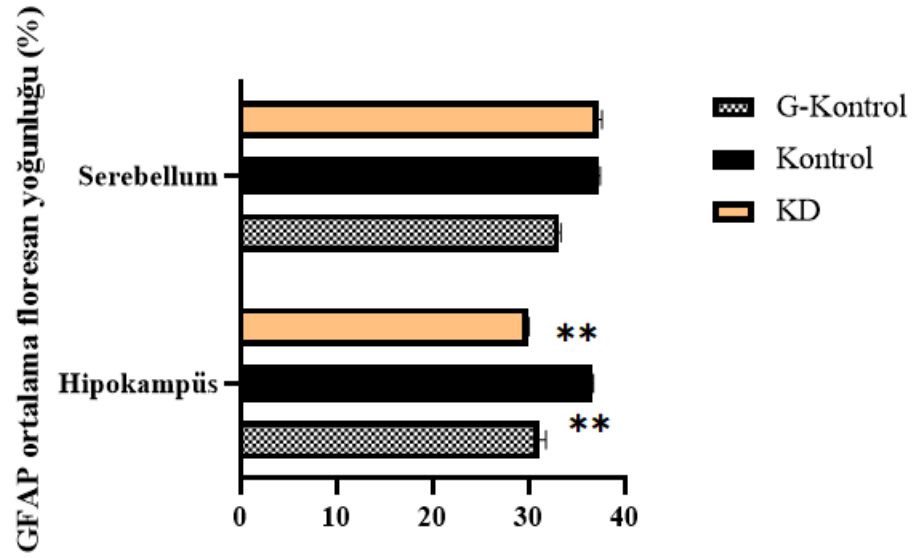
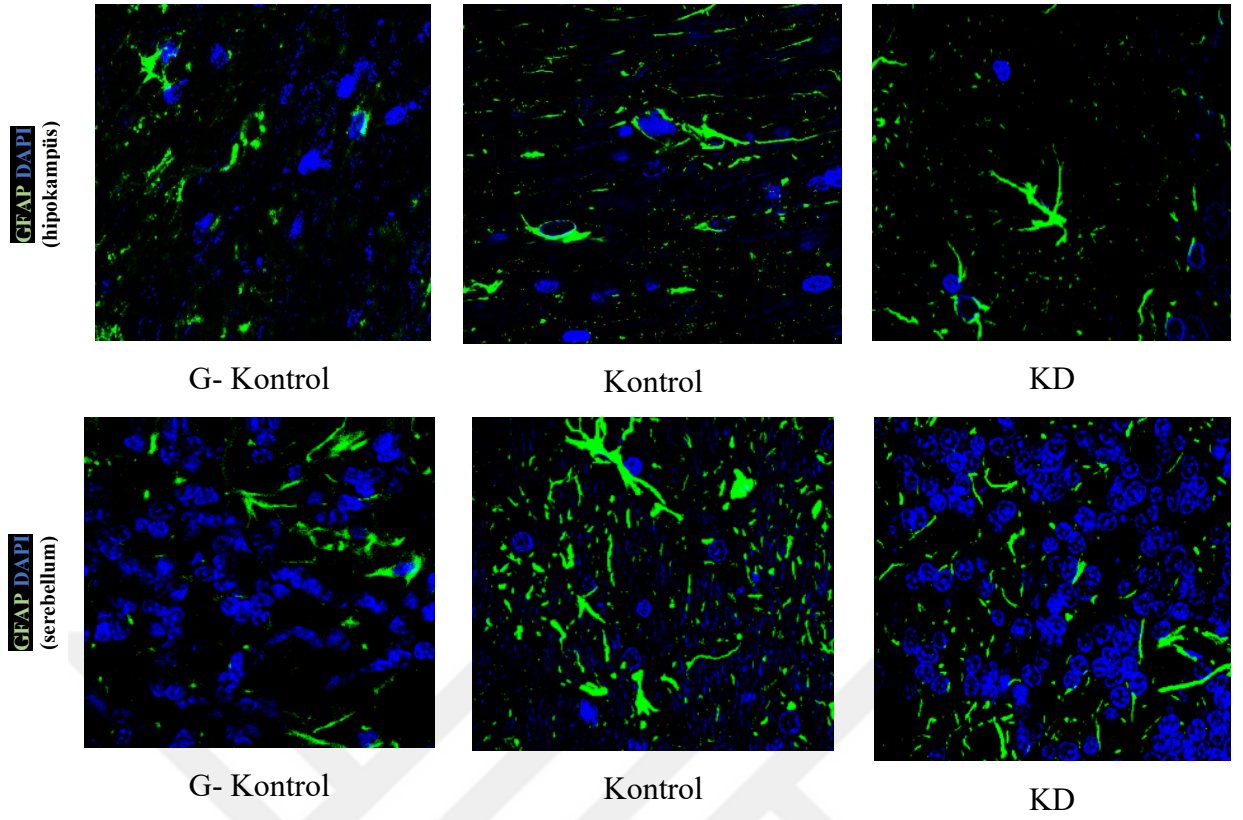
Şekil-12: Antibiyotik gruplarında AQP4 ve Aβ1-42 seviyeleri

4.4 İmmunofloresan Boyama Sonuçları

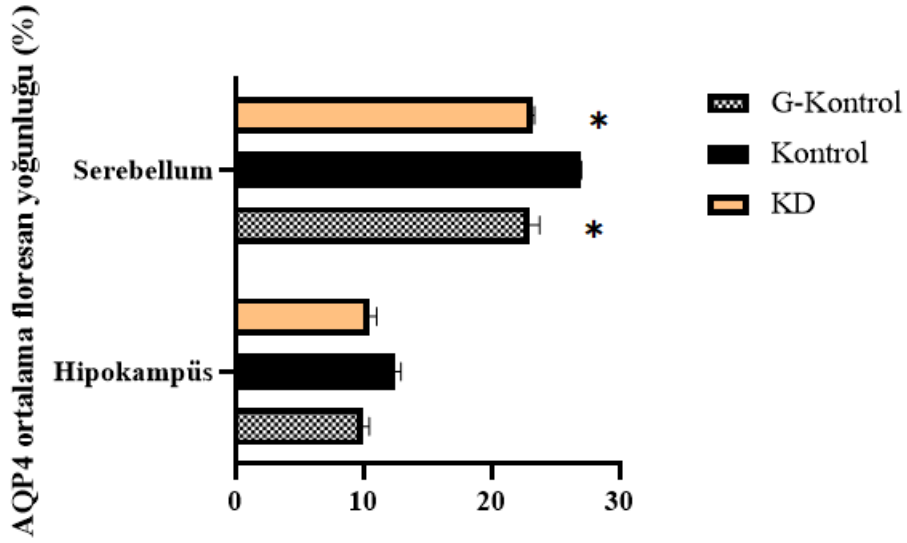
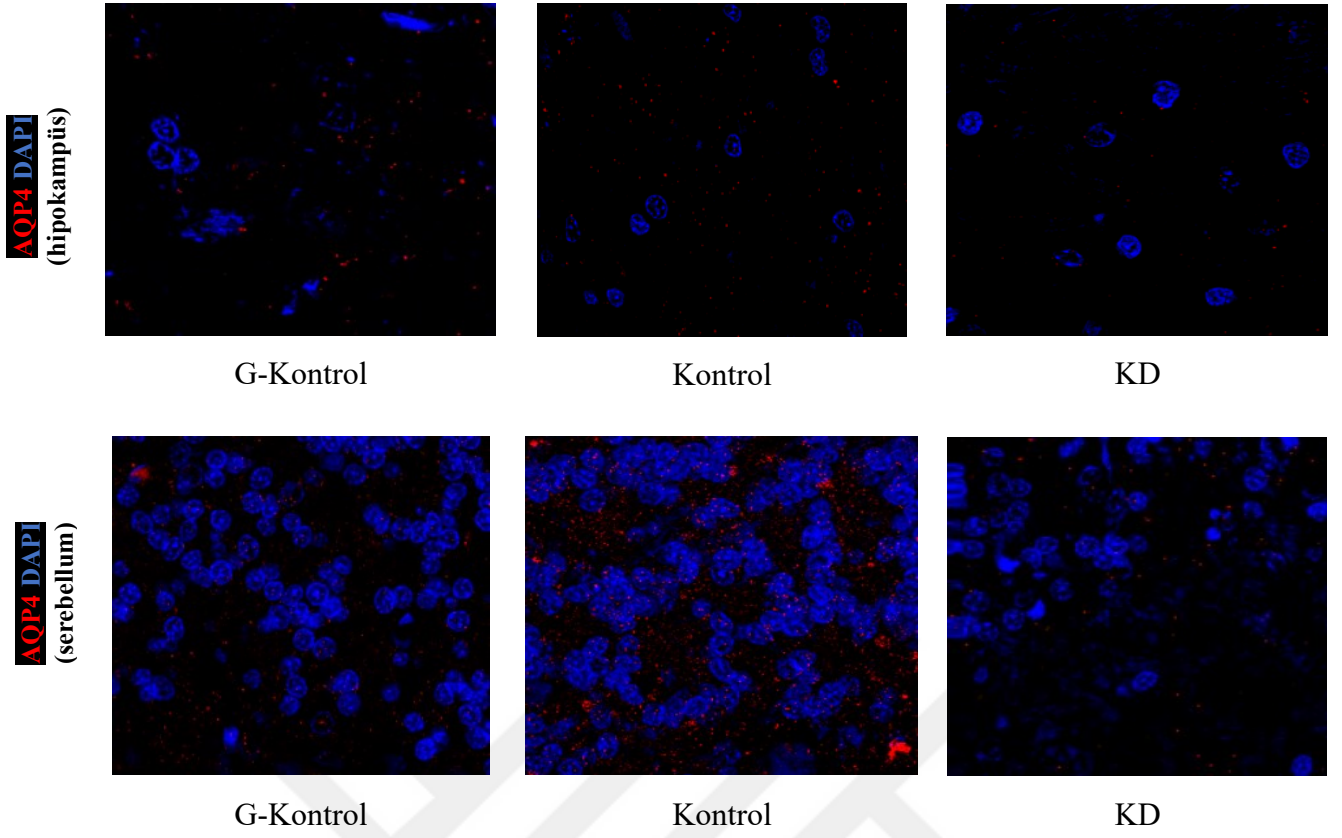
4.4.1 Diyet Gruplarında Hipokampus ve Serebellumda AQP4 Su Kanalı ve Glial Fibriler Asidik Proteinin (GFAP) İmmunofloresan Yoğunluğu

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, G-Kontrol ve KD grubunda hipokampus GFAP floresan yoğunluğu anlamlı olarak azalmıştır ($p < 0,01^{**}$). Ancak, serebellumda GFAP floresan yoğunluğu bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$) (Şekil-13).

Serebellum ortalama AQP4 floresan yoğunluğu, KD ve G-Kontrol grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldı ($p < 0,05^{*}$), KD ve G-Kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0,05$). Hipokampus AQP4 su kanalı floresan yoğunluğu bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0,05$). (Şekil- 14).



Şekil- 13: Diyet gruplarında hipokampus ve serebellumda ortalama GFAP floresan yoğunluğu (40X lazer taramalı konfokal mikroskop görüntüsü) Bar 20µm (n=2).



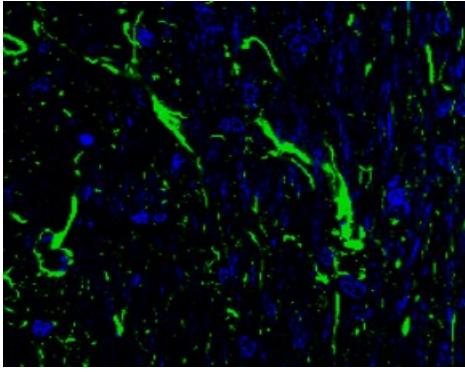
Şekil- 14: Diyet gruplarında hipokampüs ve serebellumda ortalama AQP4 floresan yoğunluğu (40X lazer taramalı konfokal mikroskop görüntüsü) Bar 20µm (n=2)

4.4.2 Antibiyotik Gruplarında Hipokampus ve Serebellumda AQP4 Su Kanalı ve Glial Fibriler Asidik Proteinin (GFAP) İmmunofloresan Yoğunluğu

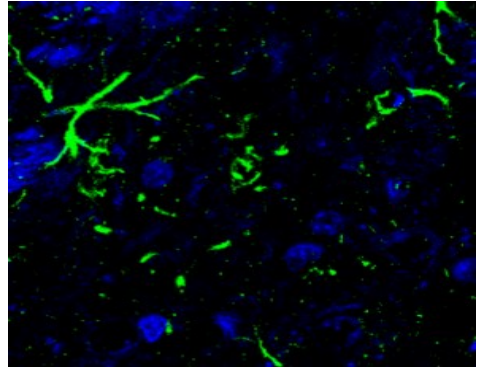
Kontrol grubuna göre, AB grubunda serebellum ve hipokampus GFAP floresan yoğunluğu anlamlı olarak artarken ($p<0,01^{##}$), KDAB grubunda serebellum GFAP floresan yoğunluğu anlamlı olarak azalmıştır ($p<0,01^{##}$). AB grubu göre KDAB grubunda hem hipokampus hem de serebellum da GFAP floresan yoğunluğu anlamlı olarak azaldı ($p<0,01^{**}$) (Şekil-15).

AB grubu ile karşılaştırıldığında, hem hipokampus hem de serebellumda AQP4 su kanallarının floresan yoğunluğu KDAB grubunda anlamlı olarak azaldı ($p<0,05^*$) (Şekil-16).

GFAP DAPI
(hipokampüs)

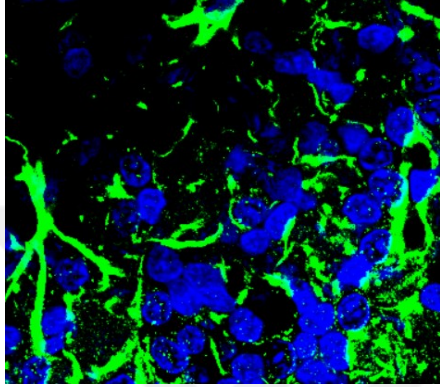


AB

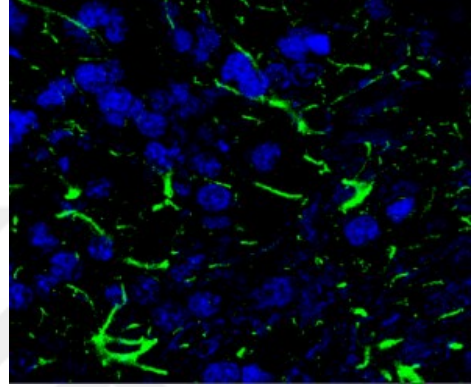


KDAB

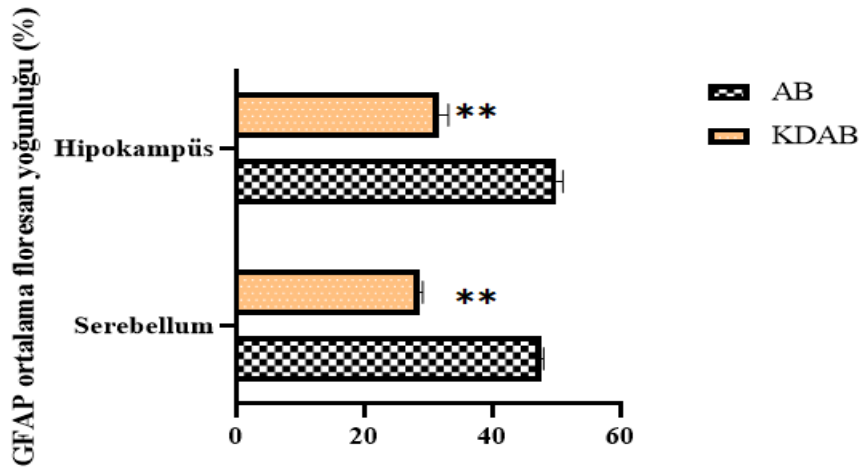
GFAP DAPI
(serebellum)



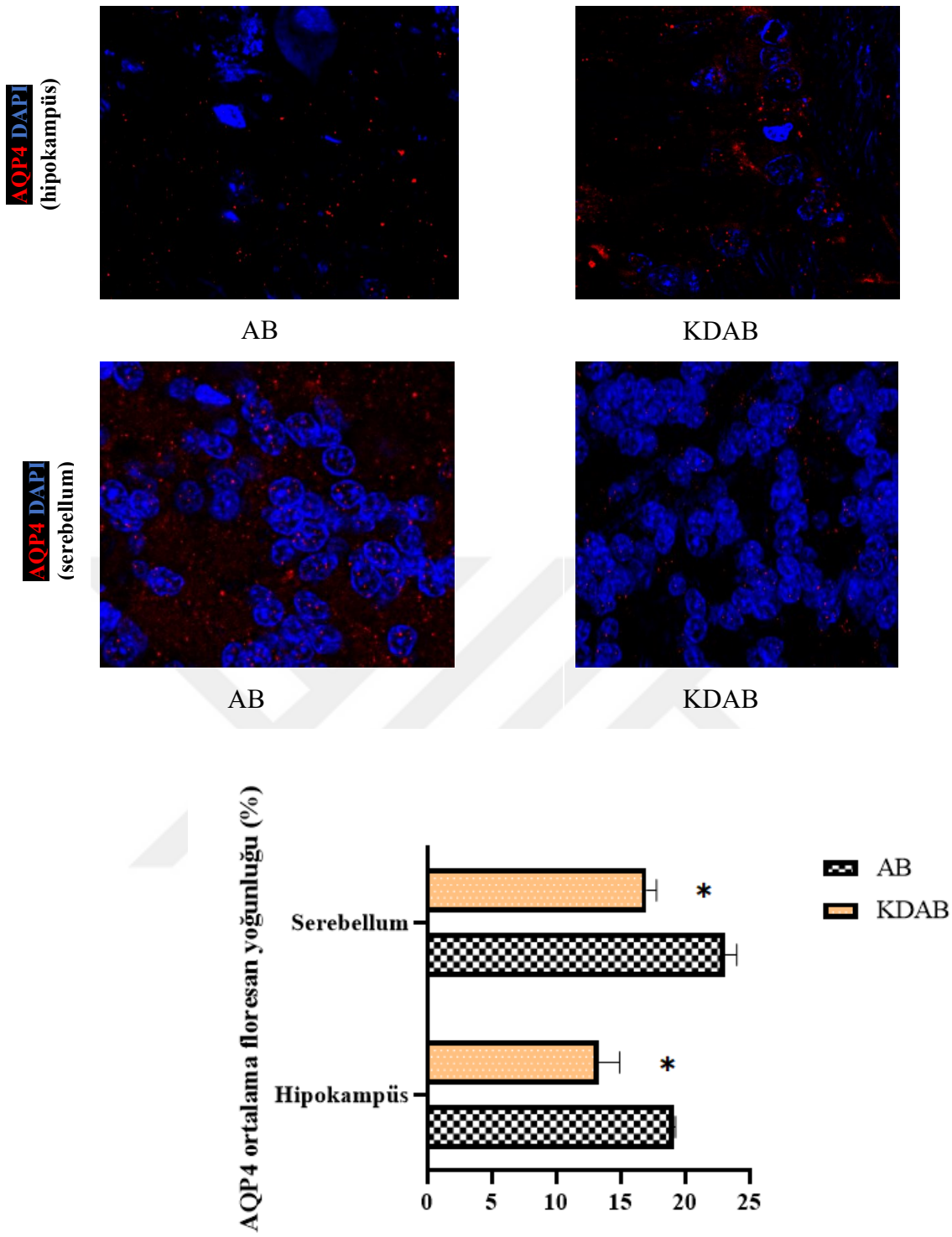
AB



KDAB



Şekil-15: Antibiyotik gruplarında hipokampüs ve serebellumda ortalama GFAP floresan yoğunluğu (40X lazer taramalı konfokal mikroskop görüntüsü) Bar 20µm.(n=2)

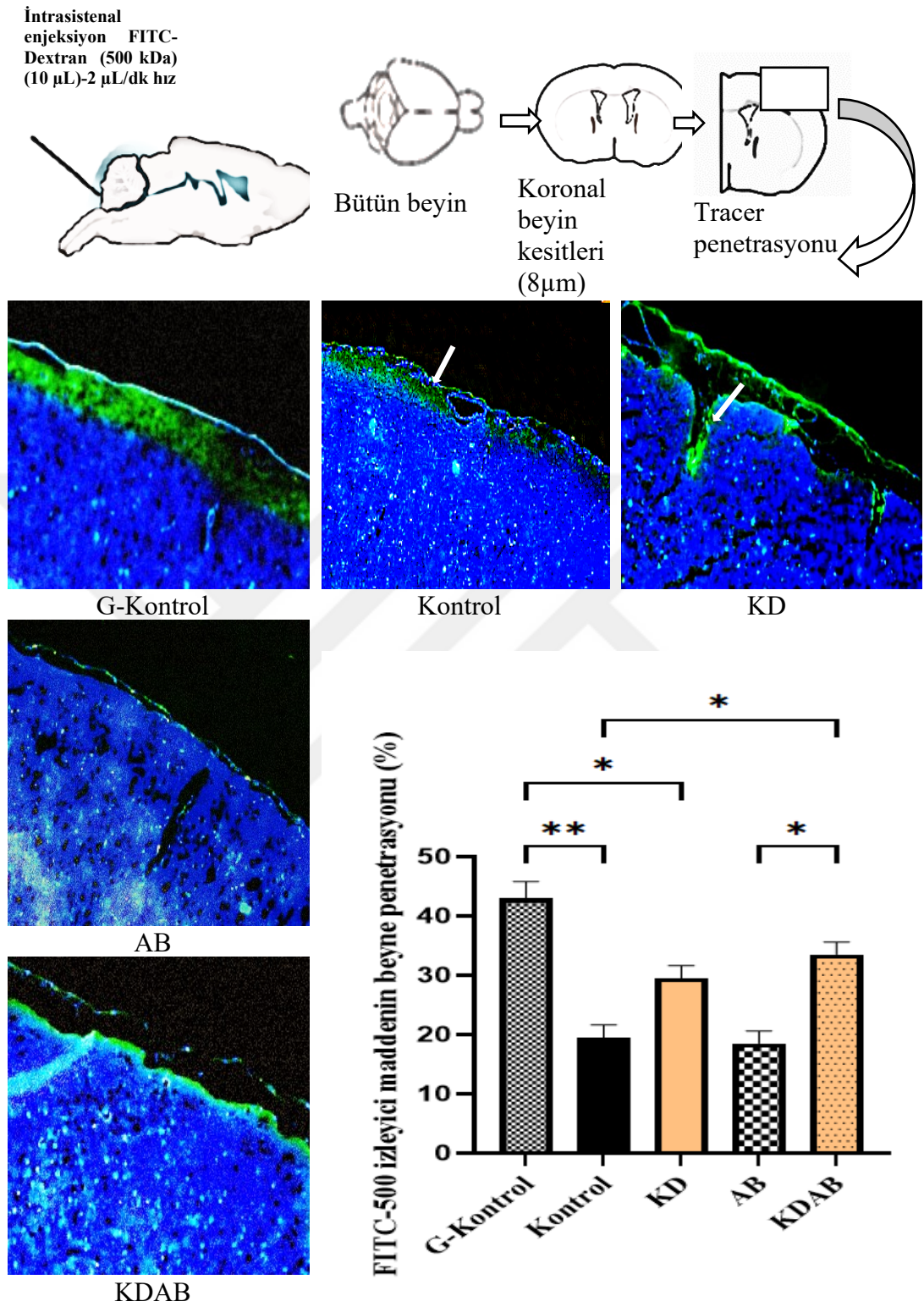


Şekil-16: Antibiyotik gruplarında hipokampüs ve serebellumda ortalama AQP4 floresan yoğunluğu (40X lazer taramalı konfokal mikroskop görüntüsü) Bar 20µm (n=2)

4.5 İzleyici (Tracer) Floresan Maddenin Beyine Penetrasyonu

FITC-Dextran (500 kDa) intrasisternal infüzyonu sonunda, G-Kontrol grubuna göre Kontrol ve KD grubunda izleyici madde (tracer) penetrasyonu anlamlı olarak azaldı (sırasıyla $p<0,01^{**}$ ve $p<0,05^{*}$). Kontrol ve KD grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında AB grubunda tracer geçişi arasında anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Benzer şekilde, AB ve KDAB grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. KDAB grubunda tracer madde geçişi Kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ($p<0,05^{*}$) (Şekil-17).





Şekil-17: FITC-500 tracer maddenin beyne penetrasyonu (10x motorize floresan mikroskop görüntüsü) Bar 200 pixel (DAPI: mavi FITC-500: yeşil)

Tablo-6: Tez çalışmasında kullanılan sarf malzemeler		
Malzeme Adı	Markası/Kod	Kullanım Amacı
Ketojenik diyet yemi	ARDEN YEM	BESLENME
Standart diyet yemi	ARDEN YEM	BESLENME
FITC-500 dextran	Thermoscientific	İzleyici madde
Goat serum	Capricorn	Bloklama
Anti-rabbit IgG (H+L), F(ab') ₂ , Fragment (Alexa Fluor 594 Conjugate)	Cell Signaling Technology	Sekonder Antikor (Immunofloresan boyama)
Anti-rabbit IgG (H+L), F(ab') ₂ , Fragment (Alexa Fluor 488 Conjugate)	Cell Signaling Technology	Sekonder Antikor (Immunofloresan boyama)
BCA protein analiz kiti	ABP Biosciences	Protein Analizi
Rat-AQP4 Elisa Kiti	BT-LAB/E058Ra	ELİSA
Rat-Aβ1-42 Elisa Kiti	BT-LAB/E0093Ra	ELİSA
Aquaporin-4 Poliklonal Primer Antikoru	Bioss Antibodies/ bs-0634R,	Prime Antikor (Immunofloresan boyama)
GFAP Poliklonal Primer Antikoru	Bioss Antibodies/ bs-0199R	Prime Antikor (Immunofloresan boyama)
PFA	Thermoscientific	Doku Fiksasyonu, Perfüzyon
Triton-X100	Thermoscientific	Antikor Dilüsyonu
Ketamin	Ketasol	Anestezi
Ksilazin		Anestezi
Antibiyotikler	Sigma	Tedavi
21G iğne ucu		Enjeksiyon
İnsülin enjektörü		Enjeksiyon
Serum fizyolojik		Perfüzyon
Sükroz		Doku
PBS		Dilüsyon/Yıkama işlemi

Keton sribi	On Call GK/Dual	Keton ölçümü
Glukoz sribi	On Call GK/Dual	Glukoz ölçümü
TBS	Kimyalab	Yıkama işlemi

5 TARTIŞMA

Bu çalışmada, ketojenik diyetle (KD) tüketilecek yağ kaynağı olarak polifenol düzeyi yüksek olan zeytinyağı (TUAY, cardiolive) kullanılmıştır. Zeytinyağı KD uygulamasının yaşlı sıçanlarda AQP4 aracılı glimfatik sistem üzerindeki etkisinde bağırsak mikrobiyotasının rolünü araştırmak için literatürde bağırsak disbiyozise neden olan geniş spektrumla antibiyotik kokteyli uygulanmıştır. Çalışmada on hafta boyunca uygulanan KD ve yedi gün boyunca dört farklı antibiyotikle (metronidazol, ampisilin, neomisin ve vankomisin) hazırlanan geniş spektrumlu kokteyl verilen yaşlı sıçanlarda hipokampus ve serebellumda AQP4 su kanalı ve glial fibriler asidik protein (GFAP) immunofloresan yoğunluğu ve seviyelerini nasıl etkilediği ve bağırsak mikrobiyotasının bu süreçteki rolü değerlendirilmiştir. Bunun yanı sıra yaşlılıkla birlikte değişen hafıza ve kognisyon ile ilişkili hipokampus ve serebellum bölgelerinde ve serumda potansiyel toksik molekül olan A β ₁₋₄₂ protein düzeyleri araştırılmıştır. Uygulanan KD'nin ve antibiyotik kokteylinin haftalık ağırlık değişimi, günlük kalori, yem tüketim miktarları ve gaita renk değişimi üzerindeki etkisi takip edilmiştir. KD'nin kan keton ve glukoz düzeyleri, kan lipit profili, AST ve ALT düzeyleri ve ürik asit düzeyleri üzerindeki etkilerine bakılmıştır. Ayrıca Morris su tankı testi ile öğrenme ve bellek fonksiyonları, açık alan ve yükseltilmiş artı labirent testleri ile sıçanların anksiyete benzeri davranışları değerlendirilmiştir.

Son zamanlarda, kilo verdirici etkisi nedeniyle toplumda KD popüler hale gelmiştir. KD'nin ortalama günlük yem tüketimi, kalori alımı ve vücut ağırlığındaki etkisini araştıran bazı çalışmalar rapor edilmiştir. Roberts ve arkadaşları, KD uygulanan erkek C57BL/6 farelerin kontrol diyetle göre daha az besin tüketimi yaptıklarını ve vücut ağırlıklarının azaldığını göstermiştir (151). Çalışmamızda, 10 hafta boyunca uygulanan diyetin sıçanların haftalık ortalama ağırlık üzerindeki değişimi takip edilmiştir. KD grubunun Kontrol grubuna göre ilk beş hafta ağırlıkları azalma eğilimindeyken sonraki haftalarda Kontrol grubu ile benzer olarak devam etmiştir. İki diyet çeşidi de serbest erişimle hayvanlara verilmiştir ve bu nedenle kalori

bakımından farklı değerlere sahiptirler. Murray ve arkadaşları, 66 gün boyunca uygulanan KD'nin erişkin sıçanlarda kontrol diyetle göre daha fazla kalori almasına rağmen enerji harcamasının artması sonucunda vücut ağırlıklarının azaldığını göstermiştir (152). Bu çalışmalardan farklı olarak çalışmamızda yaşlı sıçanlarda uygulanan iki diyetin kalori düzeyleri farklı olmasına rağmen ağırlık değişiminde, kalori alımında ve günlük tüketilen yem miktarı bakımından belirgin bir fark görülmemiştir. Ancak KD gruplarının beşinci haftadan sonra ağırlıklarının arttığı görülmüştür Antibiyotik gruplarında ise, yedi gün boyunca uygulanan antibiyotik tedavisi AB grubundaki hayvanlarda 9. hafta ve 10. hafta karşılaştırıldığında ortalama ağırlıklarında azalma görülmüştür ancak KDAB grubunda bir değişiklik görülmemiştir. Çalışmalardaki uygulanan diyet içeriklerinin farklı olmasına veya kullanılan hayvan modeli, yaş, diyetle alınan kaloringin kas hacminde artışa neden olması ve antibiyotik kullanımı sonrası oluşan yan etkiler ve benzeri faktörler ağırlık artışına ya da azalmasına neden olmuş olabilir.

Yaşlanma sürecinde beyinde gerçekleşen değişiklikler öğrenme ve bellek gibi kognitif fonksiyonları etkilemektedir (153). Yapılan birçok çalışmada yaşlanma sürecinin kognitif fonksiyonların azalmasına neden olduğu gösterilmiştir ve kognitif fonksiyonlardaki bu azalmaya beyindeki nöron kaybı, oksidatif stres, inflamasyon, anormal protein birikimi (örneğin A β ve tau proteini), glial hücreler ve bağırsak mikrobiyotasındaki değişimlerin neden olduğu öne sürülmüştür (154-157). Son yapılan araştırmalarda yaşlanmanın beynin lenfatik sistem olarak adlandırılan glimfatik sistem fonksiyonunun bozulmasının da kognitif fonksiyonları azalttığı rapor edilmiştir (158). Ancak yaşlanmanın neden olduğu glimfatik sistemdeki bozulmanın, diyet ve egzersiz gibi yaşam tarzı değişiklikleriyle tersine çevrilebileceğini öne sürülmektedir. Tüm bu nedenlerden dolayı, yaşlanmanın neden olduğu kognitif azalmayı önlemek veya geciktirmek için yaşam tarzı değişiklikleri yapmak önemlidir. Bu değişiklikler arasında sağlıklı bir diyet uygulamak, düzenli egzersiz yapmak ve uyku düzenini önemsemek yer alabilir.

Ketojenik diyetin (KD) yaşlılarda öğrenme ve bellek gibi kognitif fonksiyonlar üzerindeki etkileri inceleyen araştırmalar rapor edilmiştir (159). Xu ve arkadaşları, üç hafta uygulanan KD'nin yaşlı sıçanlarda spasyal öğrenme ve belleği arttığını bulmuştur ve KD'nin beyindeki mitokondriyal biyogenezi artırarak kognitif

fonksiyonlara katkı sağladığını göstermiştir (160). Balietti ve arkadaşları, yaptığı bir çalışmada bir ay uygulanan KD'nin yaşlı farelerde spasyal belleği iyileştirdiği ancak işletim belleği ve dikkat gibi diğer kognitif fonksiyonlar üzerinde etkisi olmadığını bildirmiştir (161). Beckett ve arkadaşları, KD'nin AH modeli farelerde öğrenmeyi arttırdığını göstermiş ve KD'nin beynin enerji kaynağı olarak glukoz yerine keton cisimciklerinin kullanmasının kognitif fonksiyonları arttırdığını ileri sürmüştür (162). Qosa ve arkadaşları, AH fare modellerinde EVOO ve EVOO fenolik içeriklerinin ağızdan verilmesi A β birikimini ve tau nöropatolojilerini azalttığı ve bellek ve kognisyonu iyileştirdiği gösterilmiştir (36). Çalışmamızda Morris su tankı testinin ilk üç gününde platformu bulma süreleri KD ve G-Kontrol grubunda Kontrol grubuna göre azaldı. Deney prosedüründe uyguladığımız antibiyotik kokteylinin, sıçanların Morris su tankındaki performansı üzerindeki etkilerini inceleyen bazı çalışmalar rapor edilmiştir. Wang ve arkadaşları, antibiyotik kokteyli uygulanan farelerde kontrole göre spasyal belleğin ve Morris su tankı performansının bozulduğunu belirtmiştir (163). Benzer şekilde, Fröhlich ve arkadaşları vankomisin, neomisin, metronidazol ve ampisilin içeren antibiyotik kokteylinin farelerde spasyal öğrenme ve belleği bozduğu gösterilmiştir (143). Benzer şekilde çalışmamızda da standart diyetle birlikte antibiyotik uygulanan yaşlı sıçanlarda ilk iki gün platformu bulma süreleri Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında arttı. Antibiyotik uygulaması spasyal öğrenmeyi bozdu. Diğer yandan zeytinyağı KD ile antibiyotik uygulanan KDAB grubu AB grubuna göre platformu bulma süreleri azaldı. Sonuçlar doğrultusunda antibiyotik kullanımı öğrenmeyi olumsuz yönde etkilerken KD ile antibiyotik uygulanması ise öğrenmeyi arttırdı. KD'nin bağırsak disbiyozu azaltması ya da yararlı bakteri sayısını artması sonucu kognitif fonksiyonları arttırmış olabilir. Beşinci gün bellek testinde ise hem diyet grupları ve hem de antibiyotik grupları arasında hedef kadrın ve karşı kadrın geçirilen süre bakımından anlamlı fark bulunmadı. Ancak, KD ve KDAB gruplarında karşı kadrında geçen süre Kontrol ve AB gruplarına göre azaldı. Kısacası, çalışmamızda KD'nin spasyal öğrenmeyi arttırdığını ancak spasyal bellek üzerinde etkisi olmadığını gözlemledik. Antibiyotik kullanımının ise öğrenmeyi bozduğu ancak zeytinyağı KD ile uygulandığında öğrenme davranışında negatif bir etki oluşturmadığı bulunmuştur. Diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında diyet içeriği ve süresi, antibiyotik kullanımı nedeniyle değişen bağırsak mikrobiyotası ve hayvan

modellerindeki farklılıklar nedeniyle spasyal bellek üzerinde etkisi görülmemiş olabilir.

KD'nin anksiyete ve motor davranışı üzerinde iyileştirici etkisi olduğuna dair birçok çalışma rapor edilmiştir (164, 165). Oral ya da içme suyuna verilen geniş spektrumlu antibiyotik tedavileri ile anksiyete benzeri davranışları indükleyen çalışmalar literatürde mevcuttur. Soto ve arkadaşları, bağırsak mikrobiyotasındaki değişikliklerin beyin insülin duyarlılığının düzenlenmesi yoluyla davranışları değiştirebileceğini rapor etmiştir (166). Oral metronidazol veya vankomisin ile tedavi edilen diyetle bağlı obeziteye sahip farelerde beyin insülin sinyal duyarlılığında artış ve anksiyete ve depresyon belirtilerinde azalma gözlenmiştir (167). Antibiyotik kullanımı sonrası *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* gibi yararlı bakterilerin azalması anksiyete ve depresyon davranışını arttırdığı gözlemlenmiştir (167). Bazı araştırmalar, bağırsak mikrobiyotasındaki antibiyotik aracılı değişikliklerin hipokampal beyin kaynaklı nörotrofik faktörün (BDNF) azalmasının anksiyolitik etki ve kognitif fonksiyonlardaki azalma ilişkili olduğunu göstermiştir (168).

Açık alan testi, deney hayvanlarında anksiyete benzeri davranışlar ve lokomotor aktiviteyi değerlendirmek için kullanılan testlerden biridir (169, 170). Bir diğer anksiyete testi ise geçerliliği kanıtlanmış olan korku temelli anksiyeteyi değerlendirmek için kullanılan yükseltilmiş artı labirent testidir (171). Çalışmamızda, KD ve antibiyotik uygulamasının anksiyete benzeri davranışlar ve lokomotor aktivite değerlendirilmiştir. Çalışmamızın açık alan testi sonuçlarında, G-Kontrol, Kontrol ve KD grupları arasında toplam katettiği mesafe açısından anlamlı bir fark görülmedi. KD'nin yaşlı sıçanlarda lokomotor aktiviteyi etkilemediği görülmüştür. Benzer şekilde hem orta alanda hem de kenarlarda geçirilen süre bakımından diyet grupları arasında anlamlı bir fark yoktu. Bu nedenle, KD'nin yaşlı sıçanlardaki anksiyete üzerinde bir etkisi görülmemiştir. Antibiyotik grupları arasında toplam katedilen mesafe bakımından anlamlı fark görülmedi. Ancak KDAB grubu, AB grubuna göre açık alanın kenarlarında daha az thigmotaksis yaptı. Orta alanda geçirilen süre ise KDAB grubunda anlamlı olarak arttı.

Çalışmamızın yükseltilmiş artı labirent testi sonuçlarında, G-Kontrol, Kontrol ve KD gruplarının açık kollar ve kapalı kollarda geçen süre bakımından aralarında

anlamli bir fark bulunamamıştır. Ari ve arkadaşları çalışmamızdan farklı olarak, eksojen keton verilen sıçanlarda yükseltilmiş artı labirent testinde keton alan grupların kontrole göre açık kollarda daha fazla zaman harcarken kapalı kollarda geçirdiği sürenin azaldığını ve keton düzeylerinin artmasının anksiyeteyi azalttığını rapor etmiştir (172). Desbonnet ve arkadaşları, antibiyotik kokteyli ile bozulan bağırsak mikrobiyotasının yetişkin beyninde anksiyeteyi azalttığı ancak kognitif fonksiyonları bozduğunu bildirmiştir ve bu antibiyotik tedavisinin triptofan metabolik yolağının değişen dinamikleri, BDNF, oksitosin ve vazopressin ekspresyonunu önemli ölçüde azaltması ile ilişkili olduğunu öne sürmüştür (173). Ancak antibiyotik gruplarında KDAB grubunun açık kollarda geçirdiği süre AB grubuna göre anlamli olarak artmıştır. Aynı şekilde labirentin kapalı kollarında geçen süre KDAB grubunda AB grubuna göre anlamli derecede azalmıştır. Kısacası, KD'nin tek başına kognitif fonksiyonları arttırırken, anksiyete üzerinde etkisi olmadığı görülmüştür. Antibiyotik kullanımı kognitif fonksiyonları bozarken ve anksiyete üzerinde önemli bir etkisi olmadığı görüldü. Ancak değişen bağırsak mikrobiyotası nedeniyle KD antibiyotik kullanımının oluşturabileceği anksiyete benzeri davranışları ise azaltmıştır.

Çalışmamızda zeytinyağlı KD'nin yaşlı sıçanların metabolizması üzerindeki etkilerini değerlendirmek için BHB , glukoz, kan lipit profili(TG, TC, HDL, LDL), AST ve ALT ve ürik asit seviyeleri ölçüldü. Çalışmamızda KD ile beslenen yaşlı sıçanlarda kan BHB düzeyleri, TK ve LDL seviyeleri Kontrol grubuna göre anlamli olarak arttı. Glukoz, HDL, TG, AST ve ALT düzeyleri bakımından anlamli bir fark bulunmamıştır. Roberts ve arkadaşları, geç orta yaşta başlanan KD'nin metabolizma üzerindeki etkilerini incelemek için dolaşımdaki metabolitlerini değerlendirmişler ve 18 aylık farelerde TK seviyelerinin arttığı görülürken, 12 aylıkken başlanan KD'nin TK üzerinde bir etkisi olmadığını birleştirmişler (151). KD'nin total kolesterolü arttırması, anti-inflamatuar ilişkili HDL'deki artış nedeniyle olabileceğini öne sürmüşlerdir. KD, yaşlanmaya bağlı olarak TK düzeylerinin artışına neden olmuş olabilir (174). Yapılan bir çalışmada , farelerin EVOO tüketimi sonrasında *Bacteroides* cinsinin miktarı yükselmiş ve plazma trigliserit seviyeleri ile aralarında negatif korelasyon olduğu saptanmıştır (40). Bununla birlikte, *Lachnospiraceae* miktarı EVOO tüketimi ile artmış ve insanlardaki plazma HDL kolesterol ile aralarında pozitif korelasyon saptanmıştır (40). İnsan ve hayvan çalışmalarında,

probiyotik formda kullanılan EVOO'nun *Lactobacillus* miktarını arttırdığı ve plazma total kolesterol seviyelerini azalttığı görülmüştür (41). Bakteriler tarafından üretilen KZYA'lar EVOO tüketimi ile artar ve kan glukozu homeostazı üzerindeki tıropatik etkilerini ortaya çıkarır. Çalışmamızda, 18 aylıkken başladığımız KD'nin total kolesterol seviyelerindeki artışın sebebi yaşlanmaya bağılı olarak gelişmiş olabilir. KD, vücuttaki yağ depolarının parçalanmasına ve serbest yağ asitlerinin artmasına neden olur. Bu durumda, karaciğerde LDL kolesterol üretimi artar ve kanda LDL kolesterol seviyeleri yükselebilir. Ziegler ve arkadaşları, çalışmamıza benzer şekilde 8 haftalık KD'nin 30 günlük Wistar sıçanlarda TG, LDL, HDL, TK, glukoz, ürik asit ve TG/HDL düzeyleri açısından kontrol diyetle göre değişmediğı ancak BHB düzeylerinin arttığını göstermiştir (175). Benzer şekilde KDAB ve AB grupları arasında sadece BHB düzeyleri bakımından fark görülürken lipit profili, glukoz ve ürik asit bakımında gruplar arasında anlamlı fark bir yoktu. KDAB grubunda AB grubuna göre BHB düzeyleri anlamlı olarak arttı. Kısacası, antibiyotik uygulanan KD yaşlı sıçanlarda lipit profilini pozitif ya da negatif yönde bir etkisi olmadığını gözlemledik.

Genç hayvanlarda AQP4 su kanalı, astrosit son ayağında eksprese olmaktadır ve periarteriyel akış yolları boyunca BOS-ISF değişimini ve maddelerin ISF'den çıkışını kolaylaştırır (4). Yaşlılarda ise, AQP4 su kanalı astrositlerin sadece vasküler son ayağı ile sınırlı kalmayıp aynı zamanda parankimal astrosit süreçlerine de katılır. Bu yüzden, reaktif astrositlerde astrositik AQP4'ün vasküler polarizasyonu azalır. Bu nedenle, astrogliaların su taşıma fonksiyonunun bozulması glimfatik fonksiyonda azalmaya neden olur. AQP4 genetik olarak silindiğinde BOS-ISF değişimini %65 oranında bozar ve A β atılımını azaltır. Yaşlanma, NDH'ler için önemli bir risk faktörüdür. Yaşlanma sürecinde glimfatik sistemin disfonksiyonu, kognitif bozulmaya ve sinir sistemi hastalıklarına sebep olan yanlış oluşturulmuş ve hiperfosforile olmuş proteinlerin birikmesine neden olur. Anormal protein birikimi birçok NDH'de meydana gelir (4). Glimfatik sistemin bozulması astrositleri ve mikrogliaları aktive ederek inflamasyon gelişimine, motor ve kognitif bozukluklara neden olur (176). Hipokampus öğrenme-bellek gibi kognitif fonksiyonlarla ilişkili beyin bölgesidir. Özellikle yaşlanma ve yaşa bağılı ortaya çıkan NDH'lerde hipokampus hacminde bir azalma olduğu gösterilmiştir. Geçmişten günümüze kadar serebellumun sadece hareket koordine ettiği kabul edilirdi ancak günümüzde kognitif ve davranış

süreçlerinin düzenlenmesi dahil olmak üzere motor olmayan fonksiyonları sahip olduğu düşünülmektedir bu nedenle serebellumun AH gibi kognisyonu etkileyen nörodejeneratif koşullarda potansiyel bir rol olduğunu düşündürür (177).

Çalışmamızda, KD ve G-Kontrol grubunun serebellumunda AQP4 seviyeleri Kontrole göre anlamlı bir şekilde azaldı. Benzer şekilde KD, hipokampus AQP4 seviyeleri Kontrol grubuna göre azalttı ancak anlamlı bir fark yoktu. Yaşlı sıçanlar genç sıçanlarla karşılaştırıldığında hem hipokampus hem de serebellum AQP4 seviyelerinde anlamlı bir fark olmasa da KD serebellumda G-Kontrol grubuna göre AQP4 seviyeleri azaldı. Genç ve yaşlı bağırsak mikrobiyotasının farklı olduğunu gösteren yayınlarda yararlı bakteri sayısının yaşlanmaya bağlı olarak azaldığı gösterilmiştir. KDAB grubunda ise hem hipokampüste hem de serebellumda AB grubuna göre anlamlı olarak azaldı.

Son araştırmalarda plazma $A\beta_{1-42}$ 'nin AH'nin tanısında bir biyobelirteç olabileceği konusu hala tartışmalıdır. Ancak Shallie ve arkadaşları, AH modeli sıçanlarda kognitif gerileme ile plazma $A\beta_{1-42}$ 'nin seviyesindeki artış arasında pozitif korelasyon olduğunu gösterdiler (178). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, G-Kontrol ve KD gruplarının hipokampus ve serebellum $A\beta_{1-42}$ seviyeleri anlamlı olarak azalırken serum $A\beta_{1-42}$ seviyeleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. KDAB grubunun serum $A\beta_{1-42}$ düzeyleri AB grubuna göre azalmıştır. KDAB ve AB grupları arasında hipokampüse ve serebellum $A\beta_{1-42}$ düzeylerinde anlamlı bir fark bulunamamıştır. KD'yle antibiyotik tedavisi uygulandığında, bağırsak mikrobiyotasındaki disbiyozu karşı oluşturduğu yanıt kognitif gerilemeyi azaltmış olabilir. Plazma $A\beta_{1-42}$ seviyelerindeki azalma kognitif gerilemenin bir biyobelirteci olabilir.

AQP4, ilk olarak MSS'nde ve astrositlerde eksprese olmaktadır. Astrositlerin genellikle sinaptik plastisitede önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır (179). AQP4'ün sinaptik plastisite, öğrenme ve bellek, kognitif fonksiyon üzerindeki etkileri yeni araştırılmaya başlandı. Hipokampus, limbik sistemin önemli bir parçası olup bu bölgede AQP4'ün görevleri araştırılmaya devam etmektedir (179).

İmmunofloresan boyama sonuçlarında, hipokampus AQP4 ortalama floresan yoğunluğu bakımından KD, Kontrol ve G-Kontrol arasında anlamlı bir fark yoktu ancak KD ve G-Kontrol grubunda AQP4 ortalama floresan yoğunluğu Kontrole göre kısmen azaldı. Benzer şekilde, KD ve G-Kontrol grubunda serebellum AQP4 ortalama floresan yoğunluğu Kontrol grubuna göre azaldı. Antibiyotik tedavisi alan KDAB grubunda ise AQP4 ortalama floresan yoğunluğu AB grubuna göre hem hipokampüste hem de serebellumda anlamlı olarak azaldı. Literatürde, KD'nin serebellumda ve hipokampüste AQP4 seviyeleri üzerindeki etkilerini inceleyen ilk araştırmadır. Bu sonuçlar doğrultusunda, KD inflamasyonu azaltarak AQP4 seviye ve ekspresyonunu azaltarak yaşlılığa bağlı olarak artabilecek reaktif astrogliozisin oluşumunu azaltmış olabilir. Bu nedenle kognitif fonksiyonu artırmış olabilir.

Hücre iskeletini oluşturan proteinlerin biri olan GFAP, nörodejenerasyon ve beyin hasarları gibi birçok patolojik durumda ekspresyonundaki artış nedeniyle yaygın olarak kullanılan astroglial aktivasyon biyobelirtecidir (180). Bondan ve arkadaşları, yüksek kalorili diyetle bağlı olarak hipokampal inflamasyonun ve GFAP düzeylerinin arttığını bunun kısa ve uzun süreli belleği bozduğunu bildirdiler (181). Serebellum ve hipokampüste reaktif astrositleri belirlemek için ortalama GFAP floresan yoğunluğunu inceledik. Çalışmamızda, KD ve G-Kontrol grubunda hipokampus GFAP ortalama floresan yoğunluğu Kontrol grubuna göre azalırken, serebellum GFAP ortalama floresan yoğunluğu bakımından anlamlı bir fark yoktu. Benzer şekilde antibiyotik gruplarında hem hipokampus hem de serebellum GFAP floresan yoğunluğu KDAB grubunda AB grubuna göre azaldı. KD, inflamasyona bağlı olarak artan GFAP düzeylerini azaltmış olabilir.

Anestezi altında intrasisternal yolla sıçan beynine enjekte edilen FITC-dextran (500 kDa) moleküler ağırlığı büyük olan izleyici bir floresan maddedir. BOS izleyicisi floresan boyanın enjeksiyonundan sonra alınan beyin kesitleri floresan mikroskopla maddenin beyin korteksine penetrasyonunu değerlendirildi. G-Kontrol grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı. KD grubu Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir artış vardı. Bu sonuçlarla KD glimfatik akışı arttırdığını söyleyebiliriz. Benzer şekilde, KDAB grubu AB grubu ile kıyaslandığında floresan madde penetrasyonunda anlamlı bir artış vardı. KD, bağırsak mikrobiyotasını koruyarak bu glimfatik sisteme pozitif etki sağlamış olabilir. KD, astrositik AQP4

polarizasyonunu pozitif yönde etkileyerek glimfatik fonksiyonu arttırmış olabilir. Floresan maddenin beyine penetrasyonunun artması glimfatik aktivitenin arttığını göstermektedir (94). Bu nedenle, zeytinyağı KD'nin hem bağırsak disbiyozu engellediğini hem de glimfatik fonksiyonu arttırdığını ve buna bağlı olarak öğrenme süreçlerini pozitif yönde etkilediğini söyleyebiliriz.

6 SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, zeytinyağı ketojenik diyet ve standart diyetin yaşlı sıçanlarda AQP4 ilişkili glimfatik sistem, kognitif fonksiyonlar, davranış, kan biyokimyası değişimi üzerine etkilerini inceledik. Bu süreçte bağırsak mikrobiyotasının rolünü araştırmak için antibiyotik ile bağırsak disbiyoz oluşturduğumuz sıçanlarda zeytinyağı ketojenik diyetin etkilerini de değerlendirdik. Bu çalışmada şu sonuçları elde ettik:

Ketojenik diyet, kan BHB seviyelerini yükseltti. Kan lipit profilini ve glukoz düzeylerini önemli ölçüde değiştirmedik. Ketojenik diyet, standart diyete göre yaşlı sıçanların öğrenme ve bellek gibi fonksiyonları üzerinde olumlu etki oluşturdu. Antibiyotik kullanımı kognitif fonksiyonları bozdu ancak ketojenik diyet bu bozulmayı iyileştirdi. Benzer sonuçlar yaşlılarda anksiyete ve benzeri davranışlarda da standart diyete göre ketojenik diyetin az da olsa tedavi edici etkisi olduğunu gösterdi.

AQP4 aracılı glimfatik sistemi değerlendirmek için serum $A\beta_{1-42}$ 'i seviyeleri, serebellum ve hipokampus $A\beta_{1-42}$ ve AQP4 seviyeleri, AQP4 ve GFAP immunofloresan yoğunluğu değerlendirildi. Ketojenik diyet ve antibiyotik ile uygulanan ketojenik diyet, standart diyetle karşılaştırıldığında yaşlı sıçanlarda hipokampus ve serebellum AQP4 seviyelerini ve immunofloresan yoğunluğunu ve GFAP immunofloresan yoğunluğu azaldı. Ketojenik diyet serum, hipokampus ve serebellum $A\beta_{1-42}$ seviyeleri azalttı. Benzer sonuçlar antibiyotik ile uygulanan ketojenik diyet serum, hipokampus ve serebellum $A\beta_{1-42}$ seviyeleri azalttı. Bu sonuçlar, ketojenik diyetin GFAP'ı azaltması bu bölgelerdeki inflamasyonun azalması ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. İnflamasyon artışına bağlı olarak reaktif astrositlerin azalması AQP4 seviyelerini azaltmış olabilir. Ketojenik diyet beyin bölgelerinde inflamasyonu azaltarak glimfatik akışı hızlandırmış böylece kognitif

fonksiyonları arttırmış olabilir. Uyguladığımız ketojenik diyetteki zeytinyağının prebiyotik ve antibakteriyel özelliği sayesinde bağırsak disbiyoz oluşumuna engellemesi veya yararlı bakteri sayısını arttırması kognitif fonksiyonları iyileştirmiş olabilir.

Kısacası, ketojenik diyeti kognitif fonksiyonlarla ilişkili serebellum ve hipokampus gibi beyin bölgelerinde AQP4 su kanalı seviyelerini azaltarak astrogliazise karşı glimfatik akışı hızlandırmış ve yaşlılarda kognitif fonksiyonlar üzerinde pozitif etki oluşturmuştur. Ketojenik diyet bu etkiyi bağırsak mikrobiyotasını ve kompozisyonunu değiştirerek yapmış olabilir.

Çalışmamızda, zeytinyağlı ketojenik diyetin bağırsak mikrobiyotasını nasıl etkilediğini ve bağırsak mikrobiyotasındaki değişim ve hangi bakterilerin bu süreçte rol oynadığı değerlendirilememiştir ve beyin bölgelerinde inflamasyonuna bakılamamıştır. Ketojenik diyetin yaşlı sıçanlarda AQP4 aracılı glimfatik sistem üzerindeki etkisinde bağırsak mikrobiyotasının rolünün anlaşılması için daha fazla araştırma yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Ketojenik diyetin bu sistem üzerindeki etki mekanizmalarını araştırmak gelecekte oluşabilecek nörodejeneratif hastalıklara karşı koruyucu tedavi olarak kullanımına olanak sağlayacaktır.

7 KAYNAKLAR

1. Foldi M. The brain and the lymphatic system (I). *Lymphology*. 1996;29(1):1-9.
2. Verkman AS, Mitra AK. Structure and function of aquaporin water channels. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000;278(1):F13-28.
3. Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, et al. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid beta. *Sci Transl Med*. 2012;4(147):147ra11.
4. Jessen NA, Munk AS, Lundgaard I, Nedergaard M. The Glymphatic System: A Beginner's Guide. *Neurochem Res*. 2015;40(12):2583-99.
5. Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin water channels in the nervous system. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14(4):265-77.
6. Nagelhus EA, Ottersen OP. Physiological roles of aquaporin-4 in brain. *Physiol Rev*. 2013;93(4):1543-62.
7. Walz T, Fujiyoshi Y, Engel A. The AQP structure and functional implications. *Handb Exp Pharmacol*. 2009(190):31-56.
8. Hoddevik EH, Khan FH, Rahmani S, Ottersen OP, Boldt HB, Amiry-Moghaddam M. Factors determining the density of AQP4 water channel molecules at the brain-blood interface. *Brain Struct Funct*. 2017;222(4):1753-66.
9. Mathiisen TM, Lehre KP, Danbolt NC, Ottersen OP. The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction. *Glia*. 2010;58(9):1094-103.
10. Abbott NJ. Evidence for bulk flow of brain interstitial fluid: significance for physiology and pathology. *Neurochem Int*. 2004;45(4):545-52.
11. Cirrito JR, Yamada KA, Finn MB, Sloviter RS, Bales KR, May PC, et al. Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo. *Neuron*. 2005;48(6):913-22.
12. Larson ME, Sherman MA, Greimel S, Kuskowski M, Schneider JA, Bennett DA, et al. Soluble alpha-synuclein is a novel modulator of Alzheimer's disease pathophysiology. *J Neurosci*. 2012;32(30):10253-66.

13. Yamada K, Cirrito JR, Stewart FR, Jiang H, Finn MB, Holmes BB, et al. In vivo microdialysis reveals age-dependent decrease of brain interstitial fluid tau levels in P301S human tau transgenic mice. *J Neurosci*. 2011;31(37):13110-7.
14. Aukland K, Reed RK. Interstitial-lymphatic mechanisms in the control of extracellular fluid volume. *Physiol Rev*. 1993;73(1):1-78.
15. Goulay R, Flament J, Gauberti M, Naveau M, Pasquet N, Gakuba C, et al. Subarachnoid Hemorrhage Severely Impairs Brain Parenchymal Cerebrospinal Fluid Circulation in Nonhuman Primate. *Stroke*. 2017;48(8):2301-5.
16. Iliff JJ, Chen MJ, Plog BA, Zeppenfeld DM, Soltero M, Yang L, et al. Impairment of glymphatic pathway function promotes tau pathology after traumatic brain injury. *J Neurosci*. 2014;34(49):16180-93.
17. Benveniste H, Liu X, Koundal S, Sanggaard S, Lee H, Wardlaw J. The Glymphatic System and Waste Clearance with Brain Aging: A Review. *Gerontology*. 2019;65(2):106-19.
18. Xu Z, Xiao N, Chen Y, Huang H, Marshall C, Gao J, et al. Deletion of aquaporin-4 in APP/PS1 mice exacerbates brain Abeta accumulation and memory deficits. *Mol Neurodegener*. 2015;10:58.
19. Lundgaard I, Lu ML, Yang E, Peng W, Mestre H, Hitomi E, et al. Glymphatic clearance controls state-dependent changes in brain lactate concentration. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2017;37(6):2112-24.
20. Pistollato F, Sumalla Cano S, Elio I, Masias Vergara M, Giampieri F, Battino M. Associations between Sleep, Cortisol Regulation, and Diet: Possible Implications for the Risk of Alzheimer Disease. *Adv Nutr*. 2016;7(4):679-89.
21. Selkoe DJ. Physiological production of the beta-amyloid protein and the mechanism of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*. 1993;16(10):403-9.
22. Ma D, Wang AC, Parikh I, Green SJ, Hoffman JD, Chlipala G, et al. Ketogenic diet enhances neurovascular function with altered gut microbiome in young healthy mice. *Sci Rep*. 2018;8(1):6670.
23. Natale G, Biagioni F, Busceti CL, Gambardella S, Limanaqi F, Fornai F. TREM Receptors Connecting Bowel Inflammation to Neurodegenerative Disorders. *Cells*. 2019;8(10).

24. Quigley EMM. Microbiota-Brain-Gut Axis and Neurodegenerative Diseases. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2017;17(12):94.
25. Zlokovic BV. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci.* 2011;12(12):723-38.
26. Cahill GF, Jr., Herrera MG, Morgan AP, Soeldner JS, Steinke J, Levy PL, et al. Hormone-fuel interrelationships during fasting. *J Clin Invest.* 1966;45(11):1751-69.
27. Taylor MK, Swerdlow RH, Burns JM, Sullivan DK. An Experimental Ketogenic Diet for Alzheimer Disease Was Nutritionally Dense and Rich in Vegetables and Avocado. *Curr Dev Nutr.* 2019;3(4):nzz003.
28. Gasior M, Rogawski MA, Hartman AL. Neuroprotective and disease-modifying effects of the ketogenic diet. *Behav Pharmacol.* 2006;17(5-6):431-9.
29. Van der Auwera I, Wera S, Van Leuven F, Henderson ST. A ketogenic diet reduces amyloid beta 40 and 42 in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nutr Metab (Lond).* 2005;2:28.
30. Beckett TL, Studzinski CM, Keller JN, Paul Murphy M, Niedowicz DM. A ketogenic diet improves motor performance but does not affect beta-amyloid levels in a mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res.* 2013;1505:61-7.
31. Brownlow ML, Benner L, D'Agostino D, Gordon MN, Morgan D. Ketogenic diet improves motor performance but not cognition in two mouse models of Alzheimer's pathology. *PLoS One.* 2013;8(9):e75713.
32. Becker C, Neurath MF, Wirtz S. The Intestinal Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. *ILAR J.* 2015;56(2):192-204.
33. Steele RD. Blood-brain barrier transport of the alpha-keto acid analogs of amino acids. *Fed Proc.* 1986;45(7):2060-4.
34. Tagliabue A, Ferraris C, Uggeri F, Trentani C, Bertoli S, de Giorgis V, et al. Short-term impact of a classical ketogenic diet on gut microbiota in GLUT1 Deficiency Syndrome: A 3-month prospective observational study. *Clin Nutr ESPEN.* 2017;17:33-7.
35. Millman JF, Okamoto S, Teruya T, Uema T, Ikematsu S, Shimabukuro M, et al. Extra-virgin olive oil and the gut-brain axis: influence on gut microbiota, mucosal immunity, and cardiometabolic and cognitive health. *Nutr Rev.* 2021;79(12):1362-74.

36. Qosa H, Mohamed LA, Batarseh YS, Alqahtani S, Ibrahim B, LeVine H, 3rd, et al. Extra-virgin olive oil attenuates amyloid-beta and tau pathologies in the brains of TgSwDI mice. *J Nutr Biochem*. 2015;26(12):1479-90.
37. Ozdal T, Sela DA, Xiao J, Boyacioglu D, Chen F, Capanoglu E. The Reciprocal Interactions between Polyphenols and Gut Microbiota and Effects on Bioaccessibility. *Nutrients*. 2016;8(2):78.
38. Martinez-Lapiscina EH, Clavero P, Toledo E, Estruch R, Salas-Salvado J, San Julian B, et al. Mediterranean diet improves cognition: the PREDIMED-NAVARRA randomised trial. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84(12):1318-25.
39. Liu Z, Wang N, Ma Y, Wen D. Hydroxytyrosol Improves Obesity and Insulin Resistance by Modulating Gut Microbiota in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Front Microbiol*. 2019;10:390.
40. Millman J, Okamoto S, Kimura A, Uema T, Higa M, Yonamine M, et al. Metabolically and immunologically beneficial impact of extra virgin olive and flaxseed oils on composition of gut microbiota in mice. *Eur J Nutr*. 2020;59(6):2411-25.
41. Fu J, Bonder MJ, Cenit MC, Tigchelaar EF, Maatman A, Dekens JA, et al. The Gut Microbiome Contributes to a Substantial Proportion of the Variation in Blood Lipids. *Circ Res*. 2015;117(9):817-24.
42. Boonstra E, de Kleijn R, Colzato LS, Alkemade A, Forstmann BU, Nieuwenhuis S. Neurotransmitters as food supplements: the effects of GABA on brain and behavior. *Front Psychol*. 2015;6:1520.
43. Alkasir R, Li J, Li X, Jin M, Zhu B. Human gut microbiota: the links with dementia development. *Protein Cell*. 2017;8(2):90-102.
44. Fulop T, Witkowski JM, Bourgade K, Khalil A, Zerif E, Larbi A, et al. Can an Infection Hypothesis Explain the Beta Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease? *Front Aging Neurosci*. 2018;10:224.
45. Parada Venegas D, De la Fuente MK, Landskron G, Gonzalez MJ, Quera R, Dijkstra G, et al. Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. *Front Immunol*. 2019;10:277.

46. Demarin V, Zavoreo I, Kes VB, Simundic AM. Biomarkers in Alzheimer's disease. *Clin Chem Lab Med*. 2011;49(5):773-8.
47. Braniste V, Al-Asmakh M, Kowal C, Anuar F, Abbaspour A, Toth M, et al. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci Transl Med*. 2014;6(263):263ra158.
48. Li J, Lin S, Vanhoutte PM, Woo CW, Xu A. Akkermansia Muciniphila Protects Against Atherosclerosis by Preventing Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in Apoe^{-/-} Mice. *Circulation*. 2016;133(24):2434-46.
49. Wyss-Coray T. Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation. *Nature*. 2016;539(7628):180-6.
50. Streit WJ, Khoshbouei H, Bechmann I. The Role of Microglia in Sporadic Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2021;79(3):961-8.
51. Bowirrat A. Immunosenescence and Aging: Neuroinflammation Is a Prominent Feature of Alzheimer's Disease and Is a Likely Contributor to Neurodegenerative Disease Pathogenesis. *J Pers Med*. 2022;12(11).
52. Hirsch N. Cerebrospinal fluid and its physiology. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*. 2013;14(9):379-80.
53. Damkier HH, Brown PD, Praetorius J. Epithelial pathways in choroid plexus electrolyte transport. *Physiology*. 2010;25(4):239-49.
54. Erdoğan H, Kelten B, Yücetaş SC, ÇINAR N, Karaoğlu A, Taşdemiroğlu E. Beyinin lenfatik drenaj ve protein eliminasyon yetmezliğine bağlı arteriyopatileri. *Maltepe Tıp Dergisi*. 2013;5(3):32-40.
55. Weller RO, Galea I, Carare RO, Minagar A. Pathophysiology of the lymphatic drainage of the central nervous system: Implications for pathogenesis and therapy of multiple sclerosis. *Pathophysiology*. 2010;17(4):295-306.
56. Weller RO, Subash M, Preston SD, Mazanti I, Carare RO. Perivascular drainage of amyloid-beta peptides from the brain and its failure in cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease. *Brain Pathol*. 2008;18(2):253-66.
57. Salzman KL, Osborn AG, House P, Jinkins JR, Ditchfield A, Cooper JA, et al. Giant tumefactive perivascular spaces. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2005;26(2):298-305.
58. Szentistvanyi I, Patlak CS, Ellis RA, Cserr HF. Drainage of interstitial fluid from different regions of rat brain. *Am J Physiol*. 1984;246(6 Pt 2):F835-44.

59. Weller RO, Djuanda E, Yow HY, Carare RO. Lymphatic drainage of the brain and the pathophysiology of neurological disease. *Acta Neuropathol.* 2009;117(1):1-14.
60. Cserr HF, Knopf PM. Cervical lymphatics, the blood-brain barrier and the immunoreactivity of the brain: a new view. *Immunol Today.* 1992;13(12):507-12.
61. Mestre H, Kostrikov S, Mehta RI, Nedergaard M. Perivascular spaces, glymphatic dysfunction, and small vessel disease. *Clin Sci (Lond).* 2017;131(17):2257-74.
62. Braffman BH, Zimmerman RA, Trojanowski JQ, Gonatas NK, Hickey WF, Schlaepfer WW. Brain MR: pathologic correlation with gross and histopathology. 1. Lacunar infarction and Virchow-Robin spaces. *AJR Am J Roentgenol.* 1988;151(3):551-8.
63. Volterra A, Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci.* 2005;6(8):626-40.
64. Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* 1997;20(12):570-7.
65. Cabezas R, Avila M, Gonzalez J, El-Bacha RS, Baez E, Garcia-Segura LM, et al. Astrocytic modulation of blood brain barrier: perspectives on Parkinson's disease. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:211.
66. Barreto G, Santos-Galindo M, Diz-Chaves Y, Pernia O, Carrero P, Azcoitia I, et al. Selective estrogen receptor modulators decrease reactive astrogliosis in the injured brain: effects of aging and prolonged depletion of ovarian hormones. *Endocrinology.* 2009;150(11):5010-5.
67. Lee CK, Weindruch R, Prolla TA. Gene-expression profile of the ageing brain in mice. *Nat Genet.* 2000;25(3):294-7.
68. Zeier Z, Madorsky I, Xu Y, Ogle WO, Notterpek L, Foster TC. Gene expression in the hippocampus: regionally specific effects of aging and caloric restriction. *Mech Ageing Dev.* 2011;132(1-2):8-19.
69. Peinado MA, Quesada A, Pedrosa JA, Torres MI, Martinez M, Esteban FJ, et al. Quantitative and ultrastructural changes in glia and pericytes in the parietal cortex of the aging rat. *Microsc Res Tech.* 1998;43(1):34-42.

70. Pilegaard K, Ladefoged O. Total number of astrocytes in the molecular layer of the dentate gyrus of rats at different ages. *Anal Quant Cytol Histol.* 1996;18(4):279-85.
71. Barreto GE, Gonzalez J, Capani F, Morales L. Role of astrocytes in neurodegenerative diseases: Intechopen; 2011.
72. Nakada T, Kwee IL. Fluid Dynamics Inside the Brain Barrier: Current Concept of Interstitial Flow, Glymphatic Flow, and Cerebrospinal Fluid Circulation in the Brain. *Neuroscientist.* 2019;25(2):155-66.
73. Mestre H, Mori Y, Nedergaard M. The Brain's Glymphatic System: Current Controversies. *Trends Neurosci.* 2020;43(7):458-66.
74. Mestre H, Hablitz LM, Xavier AL, Feng W, Zou W, Pu T, et al. Aquaporin-4-dependent glymphatic solute transport in the rodent brain. *Elife.* 2018;7.
75. Kim YK, Nam KI, Song J. The Glymphatic System in Diabetes-Induced Dementia. *Front Neurol.* 2018;9:867.
76. Aalling N, Munk ASF, Lundgaard I, Nedergaard M. The Glymphatic System. *Short Course.* 2017;27.
77. Wang Y, Huang C, Guo Q, Chu H. Aquaporin-4 and Cognitive Disorders. *Aging Dis.* 2022;13(1):61-72.
78. Mader S, Brimberg L. Aquaporin-4 Water Channel in the Brain and Its Implication for Health and Disease. *Cells.* 2019;8(2).
79. Ratelade J, Verkman AS. Neuromyelitis optica: aquaporin-4 based pathogenesis mechanisms and new therapies. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44(9):1519-30.
80. Rasmussen MK, Mestre H, Nedergaard M. The glymphatic pathway in neurological disorders. *Lancet Neurol.* 2018;17(11):1016-24.
81. Hsu MS, Seldin M, Lee DJ, Seifert G, Steinhauser C, Binder DK. Laminar-specific and developmental expression of aquaporin-4 in the mouse hippocampus. *Neuroscience.* 2011;178:21-32.
82. Skucas VA, Mathews IB, Yang J, Cheng Q, Treister A, Duffy AM, et al. Impairment of select forms of spatial memory and neurotrophin-dependent synaptic plasticity by deletion of glial aquaporin-4. *J Neurosci.* 2011;31(17):6392-7.

83. Lee DJ, Hsu MS, Seldin MM, Arellano JL, Binder DK. Decreased expression of the glial water channel aquaporin-4 in the intrahippocampal kainic acid model of epileptogenesis. *Exp Neurol*. 2012;235(1):246-55.
84. Amlerova J, Laczo J, Vlcek K, Javurkova A, Andel R, Marusic P. Risk factors for spatial memory impairment in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2013;26(1):57-60.
85. Haj-Yasein NN, Bugge CE, Jensen V, Ostby I, Ottersen OP, Hvalby O, et al. Deletion of aquaporin-4 increases extracellular K(+) concentration during synaptic stimulation in mouse hippocampus. *Brain Struct Funct*. 2015;220(4):2469-74.
86. Hubbard JA, Hsu MS, Seldin MM, Binder DK. Expression of the Astrocyte Water Channel Aquaporin-4 in the Mouse Brain. *ASN Neuro*. 2015;7(5).
87. Therrien AS, Bastian AJ. Cerebellar damage impairs internal predictions for sensory and motor function. *Curr Opin Neurobiol*. 2015;33:127-33.
88. Barrientos RM, Kitt MM, Watkins LR, Maier SF. Neuroinflammation in the normal aging hippocampus. *Neuroscience*. 2015;309:84-99.
89. Di Benedetto S, Muller L, Wenger E, Duzel S, Pawelec G. Contribution of neuroinflammation and immunity to brain aging and the mitigating effects of physical and cognitive interventions. *Neurosci Biobehav Rev*. 2017;75:114-28.
90. Ren H, Luo C, Feng Y, Yao X, Shi Z, Liang F, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids promote amyloid-beta clearance from the brain through mediating the function of the glymphatic system. *FASEB J*. 2017;31(1):282-93.
91. Raha AA, Henderson JW, Stott SR, Vuono R, Foscari S, Friedland RP, et al. Neuroprotective Effect of TREM-2 in Aging and Alzheimer's Disease Model. *J Alzheimers Dis*. 2017;55(1):199-217.
92. Nedergaard M. Neuroscience. Garbage truck of the brain. *Science*. 2013;340(6140):1529-30.
93. Iliff JJ, Wang M, Zeppenfeld DM, Venkataraman A, Plog BA, Liao Y, et al. Cerebral arterial pulsation drives paravascular CSF-interstitial fluid exchange in the murine brain. *J Neurosci*. 2013;33(46):18190-9.
94. Kress BT, Iliff JJ, Xia M, Wang M, Wei HS, Zeppenfeld D, et al. Impairment of paravascular clearance pathways in the aging brain. *Ann Neurol*. 2014;76(6):845-61.

95. Sabbatini M, Barili P, Bronzetti E, Zaccheo D, Amenta F. Age-related changes of glial fibrillary acidic protein immunoreactive astrocytes in the rat cerebellar cortex. *Mech Ageing Dev.* 1999;108(2):165-72.
96. Deane R, Zlokovic BV. Role of the blood-brain barrier in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 2007;4(2):191-7.
97. Lee H, Xie L, Yu M, Kang H, Feng T, Deane R, et al. The Effect of Body Posture on Brain Glymphatic Transport. *J Neurosci.* 2015;35(31):11034-44.
98. Xie L, Kang H, Xu Q, Chen MJ, Liao Y, Thiagarajan M, et al. Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science.* 2013;342(6156):373-7.
99. Stickgold R. Neuroscience: a memory boost while you sleep. *Nature.* 2006;444(7119):559-60.
100. Brosnan RJ, Steffey EP, LeCouteur RA, Imai A, Farver TB, Kortz GD. Effects of body position on intracranial and cerebral perfusion pressures in isoflurane-anesthetized horses. *J Appl Physiol (1985).* 2002;92(6):2542-6.
101. He XF, Liu DX, Zhang Q, Liang FY, Dai GY, Zeng JS, et al. Voluntary Exercise Promotes Glymphatic Clearance of Amyloid Beta and Reduces the Activation of Astrocytes and Microglia in Aged Mice. *Front Mol Neurosci.* 2017;10:144.
102. Reddy OC, van der Werf YD. The Sleeping Brain: Harnessing the Power of the Glymphatic System through Lifestyle Choices. *Brain Sci.* 2020;10(11).
103. Zhang J, Zhan Z, Li X, Xing A, Jiang C, Chen Y, et al. Intermittent Fasting Protects against Alzheimer's Disease Possible through Restoring Aquaporin-4 Polarity. *Front Mol Neurosci.* 2017;10:395.
104. Limanaqi F, Busceti CL, Biagioni F, Lazzeri G, Forte M, Schiavon S, et al. Cell Clearing Systems as Targets of Polyphenols in Viral Infections: Potential Implications for COVID-19 Pathogenesis. *Antioxidants (Basel).* 2020;9(11).
105. Kossoff EH, Hartman AL. Ketogenic diets: new advances for metabolism-based therapies. *Curr Opin Neurol.* 2012;25(2):173-8.
106. Puchalska P, Crawford PA. Multi-dimensional Roles of Ketone Bodies in Fuel Metabolism, Signaling, and Therapeutics. *Cell Metab.* 2017;25(2):262-84.
107. Wheless JW. History of the ketogenic diet. *Epilepsia.* 2008;49 Suppl 8:3-5.

108. Kesl SL, Poff AM, Ward NP, Fiorelli TN, Ari C, Van Putten AJ, et al. Effects of exogenous ketone supplementation on blood ketone, glucose, triglyceride, and lipoprotein levels in Sprague-Dawley rats. *Nutr Metab (Lond)*. 2016;13:9.
109. Miller VJ, Villamena FA, Volek JS. Nutritional Ketosis and Mitohormesis: Potential Implications for Mitochondrial Function and Human Health. *J Nutr Metab*. 2018;2018:5157645.
110. Paoli A, Rubini A, Volek JS, Grimaldi KA. Beyond weight loss: a review of the therapeutic uses of very-low-carbohydrate (ketogenic) diets. *Eur J Clin Nutr*. 2013;67(8):789-96.
111. Owen OE, Morgan AP, Kemp HG, Sullivan JM, Herrera MG, Cahill GF, Jr. Brain metabolism during fasting. *J Clin Invest*. 1967;46(10):1589-95.
112. Fukao T, Lopaschuk GD, Mitchell GA. Pathways and control of ketone body metabolism: on the fringe of lipid biochemistry. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2004;70(3):243-51.
113. Jiang Z, Yin X, Wang M, Chen T, Wang Y, Gao Z, et al. Effects of Ketogenic Diet on Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases. *Aging Dis*. 2022;13(4):1146-65.
114. Falkowska A, Gutowska I, Goschorska M, Nowacki P, Chlubek D, Baranowska-Bosiacka I. Energy Metabolism of the Brain, Including the Cooperation between Astrocytes and Neurons, Especially in the Context of Glycogen Metabolism. *Int J Mol Sci*. 2015;16(11):25959-81.
115. Le Foll C, Levin BE. Fatty acid-induced astrocyte ketone production and the control of food intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2016;310(11):R1186-92.
116. Taib B, Bouyakdan K, Hryhorczuk C, Rodaros D, Fulton S, Alquier T. Glucose regulates hypothalamic long-chain fatty acid metabolism via AMP-activated kinase (AMPK) in neurons and astrocytes. *J Biol Chem*. 2013;288(52):37216-29.
117. Thevenet J, De Marchi U, Domingo JS, Christinat N, Bultot L, Lefebvre G, et al. Medium-chain fatty acids inhibit mitochondrial metabolism in astrocytes promoting astrocyte-neuron lactate and ketone body shuttle systems. *FASEB J*. 2016;30(5):1913-26.

118. Ishii T, Takanashi Y, Sugita K, Miyazawa M, Yanagihara R, Yasuda K, et al. Endogenous reactive oxygen species cause astrocyte defects and neuronal dysfunctions in the hippocampus: a new model for aging brain. *Aging Cell*. 2017;16(1):39-51.
119. Schonfeld P, Wojtczak L. Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: the cellular perspective. *J Lipid Res*. 2016;57(6):943-54.
120. Nylen K, Velazquez JL, Sayed V, Gibson KM, Burnham WM, Snead OC, 3rd. The effects of a ketogenic diet on ATP concentrations and the number of hippocampal mitochondria in *Aldh5a1*(-/-) mice. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1790(3):208-12.
121. Greco T, Glenn TC, Hovda DA, Prins ML. Ketogenic diet decreases oxidative stress and improves mitochondrial respiratory complex activity. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2016;36(9):1603-13.
122. Kim DY, Davis LM, Sullivan PG, Maalouf M, Simeone TA, van Brederode J, et al. Ketone bodies are protective against oxidative stress in neocortical neurons. *J Neurochem*. 2007;101(5):1316-26.
123. Masino SA, Kawamura M, Wasser CD, Pomeroy LT, Ruskin DN. Adenosine, ketogenic diet and epilepsy: the emerging therapeutic relationship between metabolism and brain activity. *Curr Neuropharmacol*. 2009;7(3):257-68.
124. Bough KJ, Wetherington J, Hassel B, Pare JF, Gawryluk JW, Greene JG, et al. Mitochondrial biogenesis in the anticonvulsant mechanism of the ketogenic diet. *Ann Neurol*. 2006;60(2):223-35.
125. Broom GM, Shaw IC, Rucklidge JJ. The ketogenic diet as a potential treatment and prevention strategy for Alzheimer's disease. *Nutrition*. 2019;60:118-21.
126. Kashiwaya Y, Takeshima T, Mori N, Nakashima K, Clarke K, Veech RL. D-beta-hydroxybutyrate protects neurons in models of Alzheimer's and Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(10):5440-4.
127. Alseghiani AS, Shah ZA. The influence of gut microbiota alteration on age-related neuroinflammation and cognitive decline. *Neural Regen Res*. 2022;17(11):2407-12.
128. Roager HM, Licht TR. Microbial tryptophan catabolites in health and disease. *Nat Commun*. 2018;9(1):3294.

129. Rios-Covian D, Ruas-Madiedo P, Margolles A, Gueimonde M, de Los Reyes-Gavilan CG, Salazar N. Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. *Front Microbiol.* 2016;7:185.
130. Kotani A, Miyaguchi Y, Kohama M, Ohtsuka T, Shiratori T, Kusu F. Determination of short-chain fatty acids in rat and human feces by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal Sci.* 2009;25(8):1007-11.
131. Levy M, Kolodziejczyk AA, Thaïss CA, Elinav E. Dysbiosis and the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(4):219-32.
132. Westfall S, Lomis N, Kahouli I, Dia SY, Singh SP, Prakash S. Microbiome, probiotics and neurodegenerative diseases: deciphering the gut brain axis. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74(20):3769-87.
133. Claesson MJ, Cusack S, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, de Weerd H, Flannery E, et al. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108 Suppl 1(Suppl 1):4586-91.
134. Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimaraes V, Sokol H, Dore J, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol.* 2009;9:123.
135. Gopalakrishnan V, Dozier EA, Glover MS, Novick S, Ford M, Morehouse C, et al. Engraftment of Bacteria after Fecal Microbiota Transplantation Is Dependent on Both Frequency of Dosing and Duration of Preparative Antibiotic Regimen. *Microorganisms.* 2021;9(7).
136. Nguyen TL, Vieira-Silva S, Liston A, Raes J. How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Dis Model Mech.* 2015;8(1):1-16.
137. Hoffman JD, Parikh I, Green SJ, Chlipala G, Mohny RP, Keaton M, et al. Age Drives Distortion of Brain Metabolic, Vascular and Cognitive Functions, and the Gut Microbiome. *Front Aging Neurosci.* 2017;9:298.
138. Spychala MS, Venna VR, Jandzinski M, Doran SJ, Durgan DJ, Ganesh BP, et al. Age-related changes in the gut microbiota influence systemic inflammation and stroke outcome. *Ann Neurol.* 2018;84(1):23-36.
139. Kim KA, Jeong JJ, Yoo SY, Kim DH. Gut microbiota lipopolysaccharide accelerates inflamm-aging in mice. *BMC Microbiol.* 2016;16:9.

140. Erny D, Hrabé de Angelis AL, Jaitin D, Wieghofer P, Staszewski O, David E, et al. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat Neurosci*. 2015;18(7):965-77.
141. Huang C, Feng S, Huo F, Liu H. Effects of Four Antibiotics on the Diversity of the Intestinal Microbiota. *Microbiol Spectr*. 2022;10(2):e0190421.
142. Luo S, Zhang H, Jiang X, Xia Y, Tang S, Duan X, et al. Antibiotics administration alleviates the high fat diet-induced obesity through altering the lipid metabolism in young mice. *Lipids*. 2023;58(1):19-32.
143. Frohlich EE, Farzi A, Mayerhofer R, Reichmann F, Jacan A, Wagner B, et al. Cognitive impairment by antibiotic-induced gut dysbiosis: Analysis of gut microbiota-brain communication. *Brain Behav Immun*. 2016;56:140-55.
144. Tirelle P, Breton J, Riou G, Dechelotte P, Coeffier M, Ribet D. Comparison of different modes of antibiotic delivery on gut microbiota depletion efficiency and body composition in mouse. *BMC Microbiol*. 2020;20(1):340.
145. Tan J, Gong J, Liu F, Li B, Li Z, You J, et al. Evaluation of an Antibiotic Cocktail for Fecal Microbiota Transplantation in Mouse. *Front Nutr*. 2022;9:918098.
146. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*. 1984;11(1):47-60.
147. Uysal N, Yuksel O, Kizildag S, Yuce Z, Gumus H, Karakilic A, et al. Regular aerobic exercise correlates with reduced anxiety and increased levels of irisin in brain and white adipose tissue. *Neurosci Lett*. 2018;676:92-7.
148. Zheng G, Hu BH. Cell-cell junctions: a target of acoustic overstimulation in the sensory epithelium of the cochlea. *BMC Neurosci*. 2012;13:71.
149. Ramos M, Burdon Bechet N, Battistella R, Pavan C, Xavier ALR, Nedergaard M, et al. Cisterna Magna Injection in Rats to Study Glymphatic Function. *Methods Mol Biol*. 2019;1938:97-104.
150. Potts EM, Coppotelli G, Ross JM. Histological-Based Stainings using Free-Floating Tissue Sections. *J Vis Exp*. 2020(162).
151. Roberts MN, Wallace MA, Tomilov AA, Zhou Z, Marcotte GR, Tran D, et al. A Ketogenic Diet Extends Longevity and Healthspan in Adult Mice. *Cell Metab*. 2017;26(3):539-46 e5.

152. Murray AJ, Knight NS, Cole MA, Cochlin LE, Carter E, Tchabanenko K, et al. Novel ketone diet enhances physical and cognitive performance. *FASEB J*. 2016;30(12):4021-32.
153. Zhou Z, Kim K, Ramsey JJ, Rutkowski JM. Ketogenic diets initiated in late mid-life improved measures of spatial memory in male mice. *Geroscience*. 2023.
154. Bussian TJ, Aziz A, Meyer CF, Swenson BL, van Deursen JM, Baker DJ. Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature*. 2018;562(7728):578-82.
155. Lee HJ, Lee KE, Kim JK, Kim DH. Suppression of gut dysbiosis by *Bifidobacterium longum* alleviates cognitive decline in 5XFAD transgenic and aged mice. *Sci Rep*. 2019;9(1):11814.
156. McGrattan AM, McGuinness B, McKinley MC, Kee F, Passmore P, Woodside JV, et al. Diet and Inflammation in Cognitive Ageing and Alzheimer's Disease. *Curr Nutr Rep*. 2019;8(2):53-65.
157. Morrison JH, Baxter MG. The ageing cortical synapse: hallmarks and implications for cognitive decline. *Nat Rev Neurosci*. 2012;13(4):240-50.
158. Zhang L, Chopp M, Jiang Q, Zhang Z. Role of the glymphatic system in ageing and diabetes mellitus impaired cognitive function. *Stroke Vasc Neurol*. 2019;4(2):90-2.
159. Newman JC, Covarrubias AJ, Zhao M, Yu X, Gut P, Ng CP, et al. Ketogenic Diet Reduces Midlife Mortality and Improves Memory in Aging Mice. *Cell Metab*. 2017;26(3):547-57 e8.
160. International Society on Oxygen Transport to Tissue. Meeting (36th : 2008 : Sapporo-shi Japan), Takahashi E, Bruley DF. Oxygen transport to tissue XXXI. New York: Springer; 2010. xxxviii, 552 p. p.
161. Balialetti M, Casoli T, Di Stefano G, Giorgetti B, Aicardi G, Fattoretti P. Ketogenic diets: an historical antiepileptic therapy with promising potentialities for the aging brain. *Ageing research reviews*. 2010;9(3):273-9.
162. Beckett TL, Studzinski CM, Keller JN, Murphy MP, Niedowicz DM. A ketogenic diet improves motor performance but does not affect β -amyloid levels in a mouse model of Alzheimer's disease. *Brain research*. 2013;1505:61-7.

163. Wang P, Tu K, Cao P, Yang Y, Zhang H, Qiu XT, et al. Antibiotics-induced intestinal dysbacteriosis caused behavioral alternations and neuronal activation in different brain regions in mice. *Mol Brain*. 2021;14(1):49.
164. Mantis JG, Fritz CL, Marsh J, Heinrichs SC, Seyfried TN. Improvement in motor and exploratory behavior in Rett syndrome mice with restricted ketogenic and standard diets. *Epilepsy Behav*. 2009;15(2):133-41.
165. Grigolon RB, Gerchman F, Schoffel AC, Hawken ER, Gill H, Vazquez GH, et al. Mental, emotional, and behavioral effects of ketogenic diet for non-epileptic neuropsychiatric conditions. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2020;102:109947.
166. Soto M, Herzog C, Pacheco JA, Fujisaka S, Bullock K, Clish CB, et al. Gut microbiota modulate neurobehavior through changes in brain insulin sensitivity and metabolism. *Mol Psychiatry*. 2018;23(12):2287-301.
167. Sherwin E, Sandhu KV, Dinan TG, Cryan JF. May the Force Be With You: The Light and Dark Sides of the Microbiota-Gut-Brain Axis in Neuropsychiatry. *CNS Drugs*. 2016;30(11):1019-41.
168. Bercik P, Denou E, Collins J, Jackson W, Lu J, Jury J, et al. The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotrophic factor and behavior in mice. *Gastroenterology*. 2011;141(2):599-609, e1-3.
169. Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. *Methods Mol Biol*. 2019;1916:99-103.
170. Sharma S, Fulton S. Diet-induced obesity promotes depressive-like behaviour that is associated with neural adaptations in brain reward circuitry. *Int J Obes (Lond)*. 2013;37(3):382-9.
171. Korte SM, De Boer SF. A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze. *Eur J Pharmacol*. 2003;463(1-3):163-75.
172. Ari C, Kovacs Z, Juhasz G, Murdun C, Goldhagen CR, Koutnik AP, et al. Exogenous Ketone Supplements Reduce Anxiety-Related Behavior in Sprague-Dawley and Wistar Albino Glaxo/Rijswijk Rats. *Front Mol Neurosci*. 2016;9:137.

173. Desbonnet L, Clarke G, Traplin A, O'Sullivan O, Crispie F, Moloney RD, et al. Gut microbiota depletion from early adolescence in mice: Implications for brain and behaviour. *Brain Behav Immun*. 2015;48:165-73.
174. Nunes-Souza V, Cesar-Gomes CJ, Da Fonseca LJ, Guedes Gda S, Smaniotto S, Rabelo LA. Aging Increases Susceptibility to High Fat Diet-Induced Metabolic Syndrome in C57BL/6 Mice: Improvement in Glycemic and Lipid Profile after Antioxidant Therapy. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:1987960.
175. Ziegler DR, Araujo E, Rotta LN, Perry ML, Goncalves CA. A ketogenic diet increases protein phosphorylation in brain slices of rats. *J Nutr*. 2002;132(3):483-7.
176. Plog BA, Dashnaw ML, Hitomi E, Peng W, Liao Y, Lou N, et al. Biomarkers of traumatic injury are transported from brain to blood via the glymphatic system. *J Neurosci*. 2015;35(2):518-26.
177. Singh-Bains MK, Linke V, Austria MDR, Tan AYS, Scotter EL, Mehrabi NF, et al. Altered microglia and neurovasculature in the Alzheimer's disease cerebellum. *Neurobiol Dis*. 2019;132:104589.
178. Shallie OF, Dalle E, Mabandla MV. Memory decline correlates with increased plasma cytokines in amyloid-beta (1-42) rat model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Learn Mem*. 2020;169:107187.
179. Wu X, Gao JF. [Involvement of aquaporin-4 in synaptic plasticity, learning and memory]. *Sheng Li Xue Bao*. 2017;69(3):335-43.
180. Hol EM, Pekny M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Curr Opin Cell Biol*. 2015;32:121-30.
181. Bondan EF, Cardoso CV, Martins MFM, Otton R. Memory impairments and increased GFAP expression in hippocampal astrocytes following hypercaloric diet in rats. *Arq Neuropsiquiatr*. 2019;77(9):601-8.

8 EKLER

EK-1 ETİK KURUL ONAYI

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

Toplantı Tarihi	Karar No	Proje Yürütücüsü
06/04/2020	46/2020	Prof. Dr. Nazan Uysal HARZADIN

“Ketojenik diyetin, yaşlı sıçanlarda Aquaporin-4 (AQP4) aracılı glimfatik sistem ve bağırsak mikrobiyotası üzerine etkilerinin araştırılması” isimli proje etik olarak uygun bulunmuştur.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 5 yıl

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

EK-2 ÖZGEÇMİŞ



RABİA ILGIN

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi

Telefon

E-posta

İnternet Sayfası

Öğrenim Bilgileri

08 Ağustos 2018 - Şu Anda (4 yıl 11 ay)
Doktora, Doktora, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, FİZYOLOJİ (DR)
Diploma Numarası: -

04 Eylül 2014 - 18 Eylül 2017 (3 yıl 1 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, FİZYOLOJİ (YL) (TEZLİ)
Diploma Numarası: 2016/93/0122
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.32 / 4.0

01 Eylül 2008 - 17 Haziran 2013 (4 yıl 10 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
BİYOLOJİ BÖLÜMÜ, BİYOLOJİ PR. (İNGİLİZCE)
Diploma Numarası: 2858
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 2.88 / 4.0

Deneyim / İşyeri Bilgileri

01 Mayıs 2010 - 01 Temmuz 2010 (3 ay) (Tam Zamanlı)
STAJYER, SAĞLIK BAKANLIĞI TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU
BAŞKANLIĞI İZMİR İLİ GÜNEY BÖLGESİ TÜRKİYE KAMU HASTANE BİRLİĞİ GENEL
SEKRETERLİĞİ İZMİR TEPECİK EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ

Yabancı Dil Bilgileri

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

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanları

Anahtar Kelimeler

Deney Hayvanları
ELİZA Kitleri
AQP 4
Bilişsel Sinirbilim
Davranış Fizyolojisi
Açık Alan Testi

Sayfa 1 / 3

Oluşturma Zamanı: 16 Haziran 2023 10:29:31

Morris Su Labirenti
Yükseltilmiş Artı Labirent
Bağırsak Mikrobiyotası
Biyostatistik
Diyet
İmmüno Floresans Boyama
Oksidatif Stres
Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Egzersiz Fizyolojisi
Nöroenflamasyon
Natürel Zeytinyağı

Ar-Ge Yetkinlik

Makaleler

F. HOSGORLER, E. C. AKKAYA, R. ILGİN, B. KOC, S. KIZILDAĞ, H. GUMUS & N. UYSAL, The ameliorative effect of midazolam on empathy-like behavior in old rats, NAUNYN-SCHMIEDEBERG ARCHIVES OF PHARMACOLOGY, 2023, 0028-1298.

H. GUMUS, R. ILGİN, B. KOC, O. YUKSEL, S. KIZILDAĞ, G. GUVENDİ, A. KARAKİLİCİ, S. KANDİS, F. HOSGORLER, M. ATEŞ, H. ALACAM & N. UYSAL, A combination of ketogenic diet and voluntary exercise ameliorates anxiety and depression-like behaviors in Balb/c mice, NEUROSCIENCE LETTERS, 2022, 0304-3940, 770.

A. KARAKİLİCİ, O. YUKSEL, S. KIZILDAĞ, F. HOSGORLER, B. TOPCUGİL, R. ILGİN, H. GUMUS, G. GUVENDİ, B. KOC, S. KANDİS, M. ATEŞ & N. UYSAL, Regular aerobic exercise increased VEGF levels in both soleus and gastrocnemius muscles correlated with hippocampal learning and VEGF levels, ACTA NEUROBIOLOGIAE EXPERIMENTALIS, 2021, 0065-1400, 81, 1, 1-9.

F. HOSGORLER, S. KIZILDAĞ, B. KOC, O. YUKSEL, A. B. T. KIRIK, R. ILGİN, S. KANDİS, G. GUVENDİ, M. ATEŞ & N. UYSAL, Mild-intensity Exercise Tract Via Both Hypoxic Triggers VEGF in the Digestive and Nonhypoxic Mechanisms, BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY, 2020, 1516-8913, 63.

F. HOSGORLER, S. KIZILDAĞ, M. ATEŞ, A. ARGON, B. KOC, S. KANDİS, G. GUVENDİ, R. ILGİN & N. UYSAL, The Chronic Use of Magnesium Decreases VEGF Levels in the Uterine Tissue in Rats, BIOLOGICAL TRACE ELEMENT RESEARCH, 2019, 0163-4984.

D. E. TAPINC, R. ILGİN, E. KAYA, O. GOZEN, M. UGUR, E. O. KOYLU, L. KANIT, A. KESER & B. BALKAN, Gene expression of pro-opiomelanocortin and melanocortin receptors is regulated in the hypothalamus and mesocorticolimbic system following nicotine administration, NEUROSCIENCE LETTERS, 2017, 0304-3940, 637, 75-79.

Bildiriler

R. ILGIN, M. ATEŞ, T. B. KOÇ, S. KIZILDAĞ, F. U. HOŞGÖRLER, G. GÜVENDİ, A. KARAKILIÇ, S. KANDİŞ & N. UYSAL HARZADIN, Erken hasat sızma zeytinyağı (EVOO) ve riviera zeytinyağının (ROO), adolesan sıçanlarda anksiyete benzeri davranışlar, kognitif fonksiyonlar ve nöroinflamasyon üzerine etkisi, Özet Bildiri, 47. ULUSAL FİZYOLOJİ KONGRESİ, 01 Kasım 2022, 04 Kasım 2022.

R. ILGIN, T. B. KOÇ, O. YÜKSEL, S. KIZILDAĞ, F. U. HOŞGÖRLER, G. GÜVENDİ, A. KARAKILIÇ, S. KANDİŞ, M. ATEŞ & N. UYSAL HARZADIN, Ketojenik diyet ve düzenli gönüllü egzersiz kombinasyonunun depresyon ve anksiyete benzeri davranışlar üzerine etkisi, Sözlü Sunum, 19. Ulusal Sinir Bilim Kongresi, 21 Kasım 2021, 23 Kasım 2021.

R. ILGIN, A. KARAKILIÇ, O. YÜKSEL, S. KIZILDAĞ, F. U. HOŞGÖRLER, B. TOPÇUGİL, H. GÜMÜŞ, G. GÜVENDİ, T. B. KOÇ, S. KANDİŞ, M. ATEŞ & N. UYSAL HARZADIN, Egzersizin Bellek ve Farklı Kas Tiplerinde VEGF Düzeylerine Etkisi, Sözlü Sunum, 18. ULUSAL SINIRBİLİM KONGRESİ, 06 Kasım 2020, 09 Kasım 2020, 114 - 114.

R. ILGIN, F. U. HOŞGÖRLER, S. KIZILDAĞ, M. ATEŞ, A. ARGON, T. B. KOÇ, S. KANDİŞ, G. GÜVENDİ & N. UYSAL HARZADIN, THE EFFECT OF CHRONIC MAGNESIUM USE ON THE LEVELS OF VEGF IN UTERINE , Sözlü Sunum, 2th Health Sciences and Innovation Congress, 27 Eylül 2020, 28 Eylül 2020, 55 - 57.

R. ILGIN, E. KAYA, O. GÖZEN, E. O. KOYLU, L. KANIT, A. KESER & B. BALKAN, Nikotin Uygulamasının Şçan Beyninde Pro-opiomelanokortin (POMC) ve mu Opioid Reseptör (MOR) mRNA Ekspresyonu Üzerine Etkileri, Poster Sunumu, 17. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 04 Nisan 2019, 07 Nisan 2019.

Projeler

BAP, ARAŞTIRMACI, Ketojenik Diyetin Yaşlı Şçanlarda Aquaporin-4 (AQP4) Aracılı Glimfatik Sistem Üzerindeki Etkisinde Bağırsak Mikrobiyotasının Rolünün Araştırılması, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ (Yurt İçi) (Devam ediyor) .

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

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

Orpheus Kapsamında Yapılan Yayınlar

[webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:000742672900004](#)

[Full text at publisher](#) [Export](#) [Add To Marked List](#)

A combination of ketogenic diet and voluntary exercise ameliorates anxiety and depression-like behaviors in Balb/c mice

By: Gumus, H (Gumus, Hikmet) ^[1], ^[2]; Ilgin, R (Ilgin, Rabia) ^[1], ^[3]; Koc, B (Koc, Basar) ^[1]; Yuksel, O (Yuksel, Oguz) ^[4]; Kizildag, S (Kizildag, Servet) ^[5]; Guvendi, G (Guvendi, Guven) ^[1]; Karakilic, A (Karakilic, Asli) ^[6]; Kandis, S (Kandis, Sevim) ^[1]; Hosgorler, F (Hosgorler, Ferda) ^[1]; Ates, M (Ates, Mehmet) ^[5]; ...More

[View Web of Science ResearcherID and ORCID](#) (provided by Clarivate)

NEUROSCIENCE LETTERS

Volume: 770
Article Number: 136443
DOI: 10.1016/j.neulet.2021.136443
Published: JAN 23 2022
Early Access: JAN 2022
Indexed: 2022-01-23
Document Type: Article
Jump to

[Enriched Cited References](#)

Abstract:

The positive effects of both ketogenic diet (KD) and regular voluntary exercise on anxiety and depression behavior have been recently reported in rodent animals, but the effects of pairing a KD with exercise on depression and anxiety are unknown. In this study, we aimed to investigate the effects of combination of KD and regular voluntary exercise on anxiety and depression-like behavior in Balb/c mice. We've demonstrated that anxiety and depression levels decreased in KD-exercised (KD-Ex) mice. beta-hydroxybutyrate (BHB) levels increased while glucose, insulin levels and LDL/HDL ratio decreased in KD-Ex mice. There was a negative correlation between BHB and the time spent in the closed arms of elevated plus maze (EPM) or the time spent in periphery walls of open field test (OFT) and the immobility time in forced swim test (FST) which all of them are indicators of low depression and anxiety levels. There was a positive correlation between LDL/HDL ratio and the time spent in the closed arms of EPM or the immobility time in FST. The immobility time in FST was positively correlated with insulin while the mobility time in FST was negatively correlated with glucose. In conclusion, these results suggest that decline in anxiety and depression-like behaviors resulted from KD with regular voluntary exercise may be associated with increased BHB levels and decreased LDL/HDL ratio and insulin or glucose levels. Further research is necessary for our understanding of the mechanisms by which pairing a KD with voluntary exercise influences brain and behavior.

Keywords:

Citation

In Web o

3

Citations

[Create](#)

3

Times Cit

Database

[+ See](#)

You ma

Sinha, S;

Amelioral

abilities c

supplem

malnouri

BRAIN BE

Dong, YJ;

Dental nc

phenotyp

MOLECU

TaheriCh

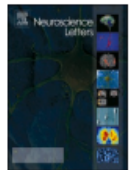
Abtahi-Ei

Comparir



Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neulet

A combination of ketogenic diet and voluntary exercise ameliorates anxiety and depression-like behaviors in Balb/c mice

Hikmet Gumus^{a,b,1}, Rabia Ilgin^{a,c,1}, Basar Koc^a, Oguz Yuksel^d, Servet Kizildag^e, Guven Guvendi^a, Asli Karakilic^f, Sevim Kandis^a, Ferda Hosgorler^a, Mehmet Ates^e, Hasan Alacam^g, Nazan Uysal^{a,*}

^a Dokuz Eylul University, Department of Physiology, School of Medicine, Izmir, Turkey

^b Dokuz Eylul University, School of Sport Sciences and Technology, Izmir, Turkey

^c Dokuz Eylul University, Department of Physiology, Graduate School of Health Sciences, Izmir, Turkey

^d Dokuz Eylul University, Department of Sports Medicine, School of Medicine, Izmir, Turkey

^e Dokuz Eylul University, College of Vocational School of Health Services, School of Medicine, Izmir, Turkey

^f Balikesir University, Department of Physiology, School of Medicine, Balikesir, Turkey

^g Ahenk Laboratory, Istanbul, Turkey

ARTICLE INFO

Keywords:

Ketogenic diet
Regular voluntary exercise
Anxiety and depression
 β -Hydroxybutyrate

ABSTRACT

The positive effects of both ketogenic diet (KD) and regular voluntary exercise on anxiety and depression behavior have been recently reported in rodent animals, but the effects of pairing a KD with exercise on depression and anxiety are unknown. In this study, we aimed to investigate the effects of combination of KD and regular voluntary exercise on anxiety and depression-like behavior in Balb/c mice. We've demonstrated that anxiety and depression levels decreased in KD-exercised (KD-Ex) mice. β -hydroxybutyrate (BHB) levels increased while glucose, insulin levels and LDL/HDL ratio decreased in KD-Ex mice. There was a negative correlation between BHB and the time spent in the closed arms of elevated plus maze (EPM) or the time spent in periphery walls of open field test (OFT) and the immobility time in forced swim test (FST) which all of them are indicators of low depression and anxiety levels. There was a positive correlation between LDL/HDL ratio and the time spent in the closed arms of EPM or the immobility time in FST. The immobility time in FST was positively correlated with insulin while the mobility time in FST was negatively correlated with glucose. In conclusion, these results suggest that decline in anxiety and depression-like behaviors resulted from KD with regular voluntary exercise may be associated with increased BHB levels and decreased LDL/HDL ratio and insulin or glucose levels. Further research is necessary for our understanding of the mechanisms by which pairing a KD with voluntary exercise influences brain and behavior.

1. Introduction

The ketogenic diet (KD) is a low-carbohydrate, high-fat and moderate protein diet that stimulates metabolic shift to the use of ketone bodies instead of glucose as alternative fuels for the body's energy requirements. This is because, metabolic changes occur when consuming a KD, containing an increase in ketone levels in the blood serum which known as ketosis [1,2]. For almost 100 years, KD has been used for

treatment against seizures induced by resistant-epilepsy in children, moreover, has been thought as alternative therapy for many other diseases [3,4]. Recent evidences have demonstrated that KD decreases the body weight of obesity patients despite it contains high fat and improves blood parameters of diabetes patients [5,6]. Additionally, KD impacts the functioning of brain in wild-type animals on many levels such as gene expression [7], neurotransmission [8] and the levels of neurotrophic factors [9]. All of these factors can potentially lead to behavioral

* Corresponding author at: Dokuz Eylul University, Medical Faculty, Physiology Department, Balçova, Izmir, Turkey.

E-mail addresses: gumus@hitstar.org (H. Gumus), rabia.ilgin@ogr.deu.edu.tr (R. Ilgin), basar.koc@deu.edu.tr (B. Koc), oguz.yuksel@deu.edu.tr (O. Yuksel), servet.kizildag@deu.edu.tr (S. Kizildag), guvendi@yandex.com (G. Guvendi), asli.karakilic@balikesir.edu.tr (A. Karakilic), sevimkandis@gmail.com (S. Kandis), ferdahosgorler@gmail.com (F. Hosgorler), m.ates@deu.edu.tr (M. Ates), hasanalacam@hotmail.com (H. Alacam), nazan.uysal@deu.edu.tr (N. Uysal).

¹ The contribution of Hikmet Gumus and Rabia Ilgin are equal and therefore they are co-first authors.

<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.136443>

Received 25 January 2021; Received in revised form 7 December 2021; Accepted 28 December 2021

Available online 3 January 2022

0304-3940/© 2021 Published by Elsevier B.V.

changes. Today, we know that KD has metabolic effects such as low blood glucose and insulin, ketonemia as well as several beneficial health effects on mood disorders like depression and anxiety [10]. Hence, many animal or clinical experiments have been conducted to assess the effect of KD on anxiety and depression-like behaviors. For example, Kasprowska-Liskiewicz et al. showed that KD decreased anxiety and increased locomotor activity behavior in rodent animals [11].

Exercise causes many health benefit. Studies have noted that exercise is related with improved physical health, cognitive functioning, and psychological well-being. We also know that exercise prevents and improves various metabolic diseases. Therefore, dietary is often accompanied by exercise training for the treatment of many metabolic diseases, involving obesity and diabetes [12]. Moreover, it has positive effect on the health of brain, improves cognitive functions and mood disorders [13,14]. In our previous studies, we have also shown that exercise decreased anxiety and depression-like behaviors in animals [15].

The effects of KD and exercise on some aspects of behavior such as anxiety and depression have been evaluated separately. However, the effects of the administration of KD with exercise training on depression and anxiety-like behaviors are not known. In this study, we aimed to investigate the effects of the combination of KD with regular voluntary exercise on anxiety and depression-related behaviors in male Balb/c mice. KD groups were fed with customized diet containing high fat and low carbohydrates contents for 6 weeks. The exercise groups were given free access to a running wheel for 6 week following one week adaptation time. Depression state and anxiety levels were evaluated with behavior tests. Additionally, we collected blood samples to evaluate metabolic effects of KD and exercise.

2. Material and methods

2.1. Animals

A total of 32 adult male Balb/c mice (Dokuz Eylul University School of Medicine, Experimental Animal Laboratory, Izmir, Turkey) were used in this study. All mice were housed in individual cages with free access to water and laboratory chow. They were maintained at constant room temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), humidity (60%) on a 12 h-light and 12 h-dark cycle. The study was approved by the Dokuz Eylul University School of Medicine Animal Care Committee (35\2018).

2.2. Experimental design

Mice were divided into four groups: (1) Ketogenic diet-Exercise group (KD-Ex), (2) KD-Sedentary (KD), (3) Control diet-Exercise group (Ex) and (4) Control diet-Sedentary group (Control) ($n = 8$ for each group). They were with *ad libitum* access to water and food during all parts of the experiment. The animals were weighed one time in every week. Following an one week adaptation period, the exercise groups had free access to a running wheel (11.5 cm diameter, connected to digital counter) which rotated by animal effort for 6 weeks [16,17]. Anxiety and depression-like behaviors was evaluated with elevated plus maze (EPM), open field test (OFT) and forced swim test (FST) at the end of the 6 week exercise and feeding period. Blood samples were collected under carbon dioxide anesthesia.

2.3. Experimental diet

A regular mouse diet is composed of 13% fat, 25% protein, and 62% carbohydrate was used for control mice. A very low-carbohydrate KD is composed of 81.4 % fat, 16.2% protein, and 1% carbohydrate was prepared based on a commercially available KD chow and composition of the KD diet is shown in Table 1.

Table 1

Percentage of three energy substances in diets.

	KD		Control	
	Gram (%)	Kcal (%)	Gram (%)	Kcal (%)
Protein	26.2	16.2	18.0	16.5
Carbohydrate	2.5	2.4	70.0	62.9
Fat	57.3	81.4	10.0	20.6
Total		100.0		100.0

2.4. Biochemical measurements of blood serum

Blood samples were stored at -80°C . Glucose, alanine aminotransferase (ALT), total cholesterol (TC), HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and triglyceride (TG) analyses were done by autoanalyzer (Beckman Coulter AU680). Results of glucose, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and TG were expressed as mg/dL, and ALT is expressed as U/L. Insulin level was measured with micro-ELISA method by using commercial kit (Bioassay Technology Laboratory, Catalogue number: E0062Mo) in accordance with the manufacturer's instructions. Insulin result was expressed as U/mL. β -Hydroxybutyrate (BHB) was measured as keton body. BHB levels were measured with colorimetric assay by using commercial kit (AAT Bioquest, Catalog number: 13830) in accordance with the manufacturer's instructions. Keton body result was expressed as $\mu\text{M/L}$.

2.5. Behavioral assessment

2.5.1. The open field test (OFT)

The open field test is generally used to assess anxiety-like behavior and locomotor activity in rodents [18]. The open field which composed of a 1×1 m area surrounded by a wall 50 cm in height. Each mouse was placed at the center of area then locomotor activity was recorded with a video camera which installed 2.5 m above open field apparatus for 5 min in soundproof observation room. In this test, the time spent in different parts of open field and the distance moved by mice were measured [19].

2.5.2. The elevated plus maze test (EPM)

Anxiety-like behavior was also investigated using the elevated plus maze test in rodents. The EPM which composed of central area (5 cm $\times$ 5 cm), two open arms (50 cm long, 10 cm wide and 0.5 cm high borders) and two closed arms (50 cm long, 10 cm wide with 40 cm high walls), each elevated 50 cm above the base [15]. Mice were put on the area facing open arm and then recorded with a video camera for 5 min. The time spent on the open and the closed arms and the number of entries into the open and the closed arms were evaluated.

2.5.3. The forced swim test (FST)

The forced swimming test (FST), which known as Porsolt test, was used to assess the depression-like behavior in mice [20]. Mice were put individually into glass cylinders (height 25 cm, diameter 10 cm) which contains 10 cm of water and stayed there for 6 min. The total immobility duration was measured. An increase in the immobility duration is assessed as a depressive-like state.

2.6. Statistical analysis

Results are presented as the means $\pm$ SEM. Statistical analysis was conducted using SPSS statistics (version 24; IBM, Tokyo, Japan). Two way-ANOVA was used to detect differences in body weight of animals between the groups defined by diet or exercise at each time point. For others, Two way-ANOVA and Bonferroni post-hoc tests were performed to determine differences between groups. For all statistics, significance was considered at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. The effects of different diet feeding and exercise on body weight

The body weight in KD mice reduced in first week after beginning the study ($p < 0.01$) (Fig. 1); hence, the decline in body weight of KD group improved afterwards. The body weight in KD group was significantly lower compared to control mice until 2 weeks. KD-Ex, KD and Ex mice had a significant difference when compared to control mice at 4 week ($p < 0.01$ for all of them). Also, KD and KD-Ex mice significantly decreased weight compared to control mice at 5 week ($p < 0.05$ for both of them). In addition, Ex mice decreased weight compared to control mice, regardless of diet ($p < 0.05$) (Fig. 1).

3.2. The evaluation of biochemical measurements of serum

The BHB levels of KD-Ex mice were greater than KD and control mice ($p < 0.01$ for both of them). In addition, BHB levels in Ex and KD mice significantly increased compared to control mice ($p < 0.01$ for both of them). However, no significant difference was observed between KD-Ex and Ex mice.

The glucose levels of KD-Ex mice significantly decreased compared to KD and control mice ($p < 0.01$ for both of them) while no significant difference in the glucose level was observed between KD-Ex and Ex mice. In addition, the glucose level in Ex mice significantly decreased when compared to control mice ($p < 0.01$). The insulin levels of KD-Ex and KD mice decreased compared to control mice ($p < 0.05$ for both of them). On the other hand, there were no significant differences between groups with regard to the insulin levels.

The TC levels of KD-Ex mice were not significantly change compared to the other groups. Yet, TC levels of KD mice significantly decreased compared to Ex and control mice (respectively, $p < 0.01$ and $p < 0.05$). In addition, there wasn't a significant difference between the TG levels of groups ($p > 0.05$). LDL/HDL ratio in KD-Ex, KD and Ex mice significantly reduced compared to control ($p < 0.01$) however, there wasn't significant difference between experimental groups.

There wasn't a significant difference between ALT levels of groups ($p > 0.05$). Moreover, uric acid levels significantly decreased in both KD-Ex ($p < 0.01$) and Ex ($p < 0.01$) mice compared to control (Table 2).

3.3. Behavioral and exercise measurements

KD-Ex mice in the running wheel cage; mean running distance is 5.21 ± 0.37 km/day whereas mean running distance of Ex mice is 1.73 ± 0.39 km/day ($p < 0.01$).

Table 2

The effects of KD and/or regular voluntary exercise on plasma biochemical markers.

Parameters	KD-Ex	KD	Ex	Control
BHB ($\mu\text{M/L}$)	226.76 $\pm$ 3.06**	189.07 $\pm$ 10.15**	215.22 $\pm$ 6.43**	131.71 $\pm$ 1.83
Glucose (mg/dl)	148.5 $\pm$ 6.79**	165.40 $\pm$ 24.69**	132.50 $\pm$ 6.02**	177 $\pm$ 12.16
Insulin ($\mu\text{U/mL}$)	1.28 $\pm$ 0.09*	1.24 $\pm$ 0.15*	1.42 $\pm$ 0.10	1.60 $\pm$ 0.05
TC (mg/dl)	164 $\pm$ 14.52	128.67 $\pm$ 9.19**	196 $\pm$ 18.93**	183 $\pm$ 28
TG (mg/dl)	104.16 $\pm$ 8.87	132.17 $\pm$ 20.04	140.42 $\pm$ 15.79	104.33 $\pm$ 5.95
LDL/HDL ratio	0.31 $\pm$ 0.08**	0.27 $\pm$ 0.06**	0.34 $\pm$ 0.07**	0.74 $\pm$ 0.05
ALT (mg/dl)	35.83 $\pm$ 2.41	41.63 $\pm$ 6.09	28.18 $\pm$ 2.81	37.55 $\pm$ 2.14
Uric Acid (mg/dl)	1.38 $\pm$ 0.22*	1.67 $\pm$ 0.17	1.48 $\pm$ 0.13**	2.05 $\pm$ 0.11

Values are shown as means $\pm$ SEM, BHB, β -hydroxybutyrate; HDL, high density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; ALT, alanine transaminase; TC, total cholesterol; TG, triglyceride. Significant differences are shown by * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ versus control group; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ versus KD group; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ versus Ex group. ($n = 6-8$ for each group).

Results of OFT showed that the total moving distance in open field arena in KD mice increased compared to control mice (Fig. 2A1), the time spent in the periphery walls of open field arena significantly decreased in KD-Ex or Ex mice compared to control mice ($p < 0.05$ for both of them) (Fig. 2A2). There wasn't a significant difference between the spent time in the center of open field arena of groups ($p > 0.05$) (Fig. 2A3).

Results of EPM showed that Ex mice spent more time on the open arms of EPM compared to KD-Ex, KD and control mice ($p < 0.01$ for all of them) (Fig. 2B1). In addition to this, Ex group spent lower time in the closed arms of EPM compared to other groups. However, there wasn't significant difference between the time spent of open arms of EPM of the other groups (Fig. 2B2).

Results of FST demonstrated that, the immobility time in KD-Ex mice was lower compared to control mice ($p < 0.01$) while no significant difference between KD-Ex, KD and Ex mice. (Fig. 2C).

3.4. Correlation analysis

A moderate negative correlation was found between BHB levels and the time spent in periphery walls of open field arena (Fig. 3. A) and in

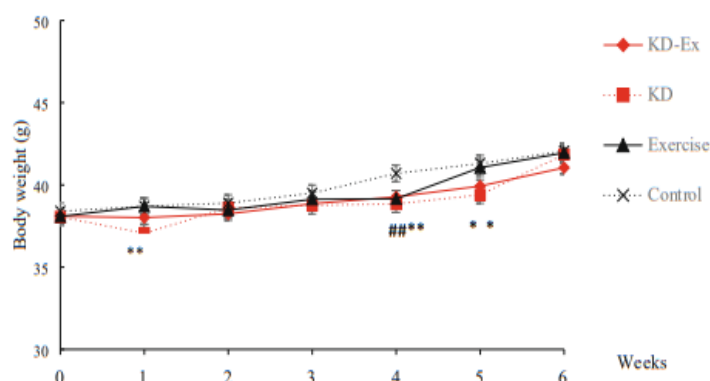


Fig. 1. Effects of 6-week KD feeding and exercise training on body weight in Balb/c mice. Mice were divided into KD (KD-Ex and KD) group and Control (Ex and Control) group. Mice were individually weighed weekly. Data indicated are means $\pm$ SEM, $n = 8$ for each group. (* $p < 0.05$ KD-Ex compared to control; ** $p < 0.01$ KD compared to control; ** $p < 0.01$ Ex compared to control.) ($n = 6-8$ for each group).

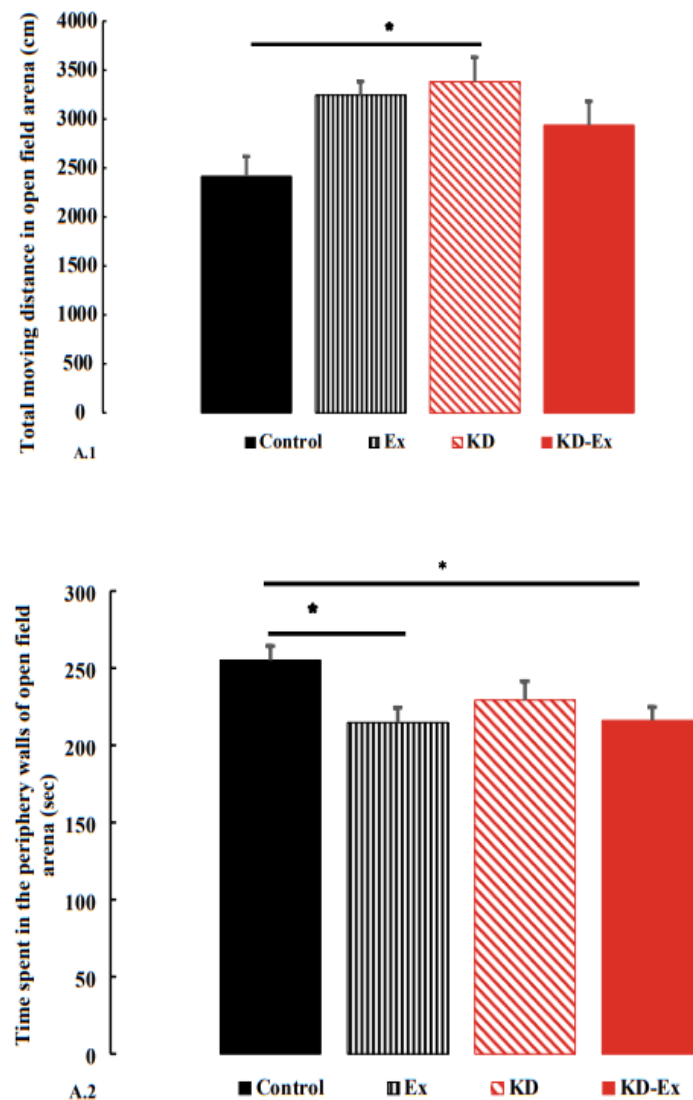


Fig. 2. Behavioral test results. (A) Open field test (OPT) results; (A1) the total moving distance in open field arena in KD mice increased compared to control mice (A2) the time spent in the periphery walls of open field arena in KD-Ex and Ex mice decreased compared to control mice and (A3) there were not significant differences in the spent time in the center of open field arena. (B) Elevated plus maze (EPM) test results; (B1) Ex group spent lower time in the closed arms of EPM compared to KD-Ex, KD and control mice, (B2) Ex group spent more time on the open arms of EPM compared to KD-Ex, KD and control mice. (C) Forced swim test results; the immobility time decreased in KD-Ex compared to control group. (Significant differences are shown by * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$). (n = 6–8 for each group).

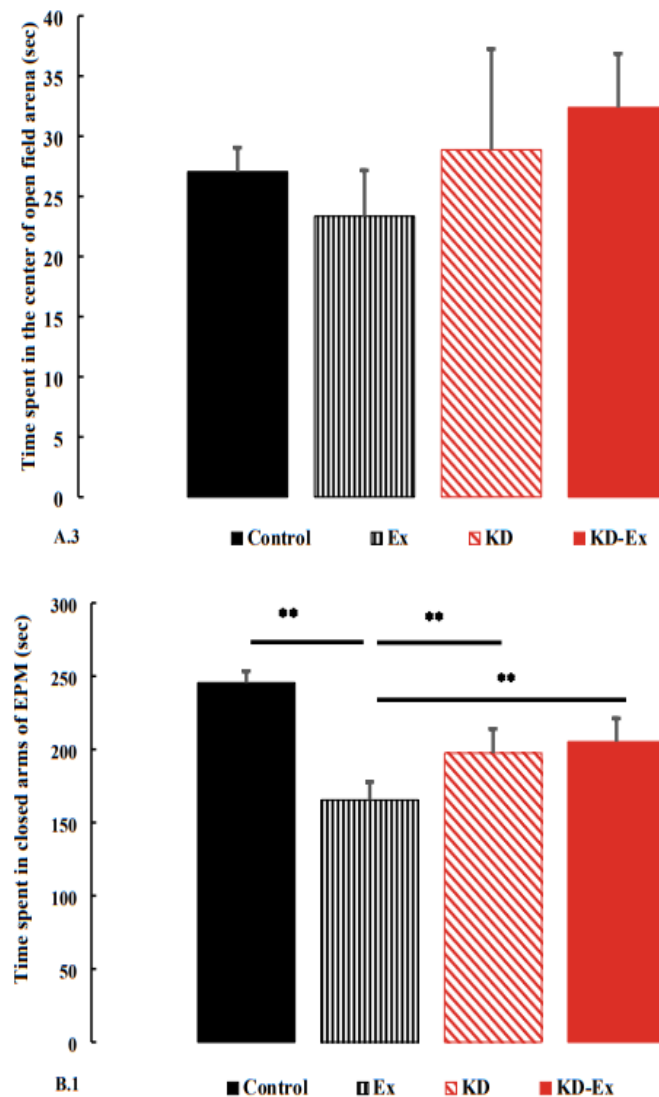
the closed arms of EPM (Fig. 3. B) ($r = -0.572$, $p = 0.004$ and $r = -0.511$ and $p = 0.013$). In addition, a moderate positive correlation between LDL/HDL ratio and the time spent in the periphery walls of open field arena (Fig. 3. C) and in the closed arms of EPM (Fig. 3. D) ($r = 0.553$, $p = 0.008$ and $r = 0.456$ and $p = 0.033$). However, there was a moderate negative correlation between LDL/HDL ratio and the total moving distance in open field arena ($r = -0.587$, $p = 0.004$) (Fig. 3. E).

Another moderate negative correlation was found between BHB and the immobility time in the FST ($r = -0.616$, $p = 0.002$) (Fig. 3. F). However, a moderate positive correlation was found between LDL/HDL ratio & insulin and the immobility time in FST ($r = 0.468$, $p = 0.032$ and $r = -0.488$, $p = 0.025$) (Fig. 3. G & Fig. 3. H). Furthermore, there was a moderate negative correlation between the glucose levels and the mobility time in FST ($r = -0.524$, $p = 0.010$) (Fig. 3. I).

4. Discussion

The popularity of KD or exogenous ketone supplements which consist of low carbohydrate and high fat rises not only among researchers, but also in society, especially in the context of weight loss and improving exercise performance. The potential of KD for weight loss has been commonly notified worldwide for decades. In literature there are a couple of studies that report KD leads to increase weight loss in rodents. Especially the short-term effects of KD for weight loss are significant in variety of experimental subject, containing human and rodent animals [21,22]. In our study, we observed that KD-Ex, KD and Ex mice showed significant weight loss when compared to control mice at second week. The role of KD in weight loss is multifactorial, involving a decreased appetite brought about by hormonal changes stimulated by ketosis.

Fig. 2. (continued).

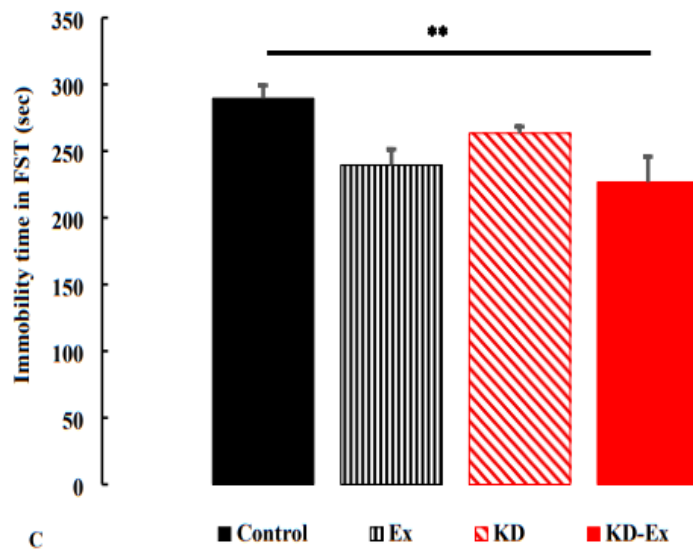
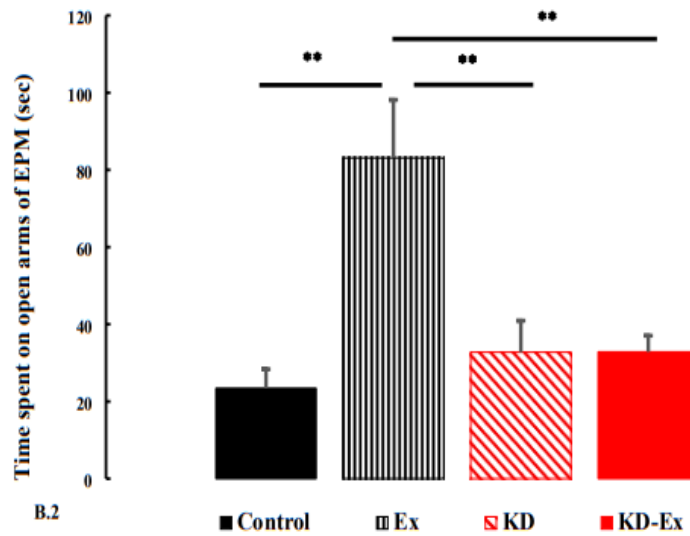


However, the weight of KD, KD-Ex and Ex mice increased at the last weeks of experiment. The KD and/or exercise may have caused to increase weight as a result of the increasing of energy need or protein synthesis.

Studies in rodent animals which fed KD may provide some supplementary mechanistic understanding into the effects of KD on exercise performance, especially whereby the diet can be well controlled and the capability of performing bio-molecular measures is not limited. We observed that Balb/c mice with feeding KD improved exercise performance compared to control mice in our study. Similarly, Huang and Miller et al. [23,24] reported that KD ameliorated exercise treadmill durations and also molecular markers of recovery in C57BL/6J male mice, suggest the mechanism to be an increased fat utilization. Moreover, Holland et al. [2] notified that voluntary running distance wasn't different during 6 weeks of KD fed to Sprague-Dawley rats. On the other hand, Nilsson et al. [25] found that a low-carbohydrate high fat diet

decreased maximum aerobic capacity and physical performance in female C57BL/6J mice at the end of 4 week of diet. Further studies are required in animal models to help derive precise conclusions.

We investigated the effects of diet-exercise interaction on the levels of BHB, glucose, insulin, TG, LDL, HDL, TC, uric acid, and ALT. Ketone bodies are produced naturally in the liver under physiological conditions that are related to the suppression of insulin: fasting, long-term starvation, prolonged exercise or the consumption of KD (high fat and low carbohydrates diet). An increase in serum level of ketone bodies is the most certain biochemical consequence of KD [26]. In our study, we observed that BHB level increased in KD-Ex, KD and Ex mice compared to control mice. However there were not significant differences between KD-Ex and other experimental groups. Although the difference was not significant, the level of BHB of KD-Ex group was higher than KD and Ex mice, suggesting that BHB was used first energetic source by KD-Ex mice. These results showed that the administration of 6 week KD



improves ketolysis, and force to utilize ketone bodies. Similarly to our results, Holland et al. [2] showed that Sprague-Dawley rats which fed KD presented high level of BHB compared to control rats. On the other hand, Sihui Ma et al. [21] reported that the increase of BHB indicated that mice were exercised to exhaustion, while after exhaustion exercise, KD decreased the BHB level significantly, showing the capacity of keto-adapted mouse to use ketone bodies. The ability of KD feeding to decrease glucose and insulin levels has been well-known [22,27]. In accordance with literature, we observed that glucose level decreased in KD-Ex and Ex mice compared to control mice. In addition, the glucose level of KD mice was higher than Ex mice although there was a slight decrease in the glucose level of KD mice compared to control, suggesting that ketone bodies might be used by Ex mice as energy source. Similarly to our results, Sihui Ma et al. [21] reported that glucose level considerably decreased in Ex mice (C57BL/6J mice) however not in KD mice,

recommended that this might be attributed to the low coefficient of using in KD mice which mainly maintained a supply system generally powered by fat. Moreover, we demonstrated that insulin level significantly decreased in KD-Ex and KD mice compared to control mice. Likewise, Holland et al. [2] presented that the administration of both KD and KD-Ex reduced insulin level in male Sprague Dawley rats. Recent evidences reported that KD positively changed blood lipids, reduced in serum TG and TC levels in rodents and it could be associated with KD-induced decreases in insulin which, in turn, reduces liver fatty acid and cholesterol biosynthesis [2,28]. Recent studies have investigated how exercise could decrease TC and LDL [29,30]. Firstly, exercise induces enzymes which help transport LDL from the blood to liver. After that, cholesterol is turned into bile or excreted. Secondly, exercise improves the size of the lipoproteins and then LDL is converted into HDL. Some studies presented that KD caused to increase in cholesterol

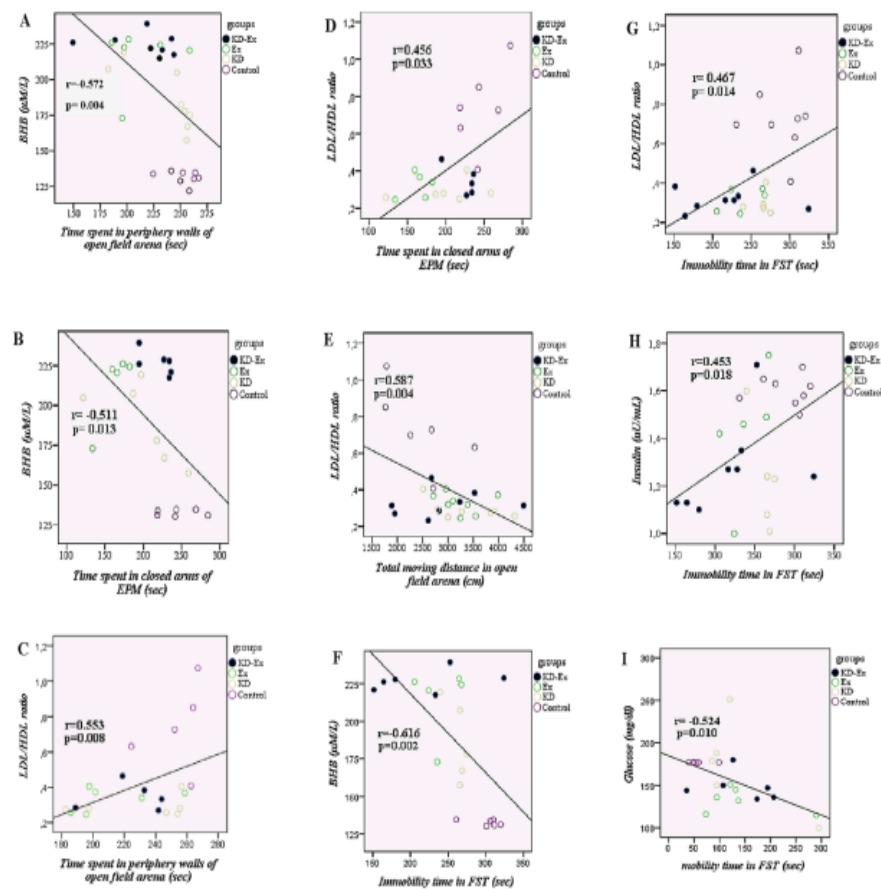


Fig. 3. Correlation Analysis Results. (A) Correlation scatterplot between BHB levels and time spent in the periphery of open field arena. (B) Correlation scatterplot between BHB levels and time spent in the closed arms of EPM. (C) Correlation scatterplot between LDL/HDL ratio levels and time spent in the periphery of open field arena. (D) Correlation scatterplot between LDL/HDL ratio and time spent in the closed arms of EPM. (E) Correlation scatterplot between LDL/HDL ratio and total moving distance in the open field arena. (F) Correlation scatterplot between BHB levels and the immobility time in FST. (G) Correlation scatterplot between LDL/HDL ratio and the immobility time in FST. (H) Correlation scatterplot between the insulin levels and the immobility time in FST. (I) Correlation scatterplot between the glucose levels and the mobility time in FST.

[31,32]. We also showed that the TC levels of KD mice decreased compared to Ex and control mice. In addition, the TC level increased in Ex mice compared to KD mice. That's why, exercise might increase HDL level and decrease and/or not change LDL level. However, no difference was observed between control and other experimental mice in the level of TG in our study. Also, we observed that the LDL/HDL ratio reduced in KD-Ex, KD and Ex mice when compared with control which suggesting KD and exercise improved blood lipids. Supporting this suggestion, the administration of oral BHB decreased LDL/HDL ratio and increased HDL levels in Wistar rats [33]. In addition, ALT was employed as hepatic damage marker. Some studies reported that exercise causes hepatic damage because of increasing ALT however ALT level was reduced by KD, indicating KD may protect the liver from exercise-induced liver damage [34,35]. However, in our study, no significant difference in the ALT levels was observed between KD-Ex, KD, Ex and control mice. Furthermore, elevated uric acid level is used as liver damage marker [36]. In the current study, uric acid levels reduced significantly in both KD-Ex and Ex mice whereas there was a slight decrease in the uric acid level in KD mice when compared with control. These results suggested that KD did not adverse liver responses. However, further research is necessary for the effects of KD-Ex on some tissues such as brain, liver or

muscle.

In recent years, many studies have been shown that KD has beneficial health effects and therapeutic potential for a broad range of disorders, containing central nervous system disorder and stress induced situations such as anxiety and depression disorders. In literature, there are a couple of studies that report KD leads to a decrease in anxiety and depression behaviors [37–39] whereas other studies report that the levels of anxiety and depression are not affected following KD therapy [40,41]. In the last years, several studies investigated effects of exercise on anxiety and depression behavior in rodent animals, however, findings are quite contradictory. Some studies report that regular voluntary exercise causes to decrease anxiety and depression-like behavior [42,43]. While other studies report that anxiety and depression-like behavior are not influenced or rise following exercise [44,45]. However, the effects of pairing a KD with voluntary exercise on anxiety and depression are not known clearly. In the current study, we found that the combining of KD with exercise varied neurobehaviors in adult male mice. Some behavioral experiments demonstrated that KD-Ex mice decreased depression and anxiety levels when compared to control mice. In the OFT, we observed that the total moving distance in open field arena significantly increased in KD mice compared to control whereas KD-Ex and Ex mice

had a slight increase in total moving distance although the difference was not significant compared to control mice, which suggesting reduced anxious behavior. However, there weren't significant differences in this behavior between KD-Ex and KD or Ex mice. Therefore, this difference cannot be attributed to only the ketogenic diet or exercise. On the other hand, we observed that the time spent in the periphery walls of open field arena significantly decreased in KD-Ex and Ex mice compared to control mice which suggesting reduced anxious behavior. However, there wasn't a significant difference between the time spent in the center of open field arena of groups. Sussman et al. [38] reported that mice prenatally exposed to KD indicated a slight rise in the spent time in the center of open field arena, which suggesting decreased anxiety-level. In EPM, spent lower time on the open arms or spent more time in the closed arms are used as an indicator of anxiety behavior. We demonstrated that KD-Ex, KD and Ex mice spent more time on the open arms when compared to control mice. However, Ex mice spent more time on the open arms of EPM compared to KD-Ex and KD, suggesting that exercise effects on this behavior may be decreased by administration of KD. Furthermore, the spent time in the closed arms of EPM decreased in Ex mice when compared with KD-Ex, KD and control mice. KD-Ex and KD mice spent lower time in the closed arms of EPM compared to control mice although the difference was not significant. In contrast to our results, Ziegler et al. [41], Peres et al. [40] and Murphy and Burnham [46] did not observe any differences between KD and control mice in the EPM test. In our study, both the results of EPM and OFT showed that not only Ex but also a pairing KD with exercise decreased anxiety level. Moreover, the FST was used to evaluate the potential effects of pairing KD with exercise on depression behavior. In the FST, the immobility time decreased in KD-Ex mice merely when compared to control mice and also there was a slight difference in terms of the immobility time between KD-Ex, KD and Ex mice although it wasn't significant. Murphy et al. [37] reported that the rats of KD group spent lower the immobility time than the rats of control mice. Our findings suggest that KD-Ex may have antidepressant effects.

We found that there was a negative correlation between BHB and anxiety and depression-like behaviors. The time spent in the periphery walls of open field arena was moderate negatively correlated with BHB levels. An increase of time spent in the closed arms of EPM which known as anxious behavior was moderate negative correlated with BHB level. In a conflicting report, Murphy et al. [37] demonstrated that the presence of ketosis wasn't needed to observe a behavioral change, suggesting the therapeutic effects of KD are not just linked its potential to stimulate ketosis. The immobile duration was moderate negatively correlated with BHB levels while insulin or glucose were moderate positively correlated with depression behaviors in FST. Otherwise we demonstrated that the time spent both in the closed arms of EPM and in the periphery walls of open field arena were moderate positively correlated with LDL/HDL ratio. KD-Ex, KD and Ex mice had lower LDL/HDL ratio when compared to control mice. Furthermore, There was a moderate positive correlation between LDL/HDL ratio and depression behavior. Similarly with our study, Tiao-LaiHuang et al. [47] examined that the relationships between lipid and lipoprotein concentrations and anxious or depression symptoms or disorder in human studies, suggesting that the level of HDL cholesterol and the ratios of TC/HDL and LDL/HDL (atherogenic index) might be markers of the possible association between serum lipids and anxiety or depression. These result suggested that the effects of KD-Ex on anxiety levels might depend on decrease of LDL/HDL ratio. To summarize, pairing a KD with regular voluntary exercise may reduce depression behavior by means of decrease insulin, glucose or LDL/HDL ratio and increase BHB levels.

5. Conclusion

In conclusion, the present study demonstrated that a pairing KD with regular voluntary exercise decreases anxiety and depression-like behavior in rodent animals. The administration of KD with voluntary

exercise increases BHB level while decreases not only glucose and insulin but also LDL/HDL ratio. KD increases exercise performance as a result of high BHB level. These data suggest that high BHB level and low glucose or insulin level and LDL/HDL ratio may directly or indirectly contributes to the positive effects on anxiety and depression behavior. Further research is necessary for elucidating the exact mechanism by which a pairing KD with exercise on anxiety and depression influences the organs such as brain.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

Rabia Ilgin has a fellowship from the 100/2000 YÖK Program.

References

- [1] K. Politi, L. Shemer-Meiri, A. Shuper, S. Aharoni, The ketogenic diet 2011: how it works, *Epilepsy Res. Treat.* 2011 (2011) 1–4, <https://doi.org/10.1155/2011/963637>.
- [2] A.M. Holland, W.C. Kephart, P.W. Mumford, C.B. Mobley, R.P. Lowery, J.J. Shake, R.K. Patel, J.C. Healy, D.J. McCullough, H.A. Klues, K.W. Huggins, A.N. Kavazis, J. M. Wilson, M.D. Roberts, Effects of a ketogenic diet on adipose tissue, liver, and serum biomarkers in sedentary rats and rats that exercised via resisted voluntary wheel running, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 311 (2) (2016) R337–R351, <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00156.2016>.
- [3] B.A. Zupec-Kania, E. Spellman, An overview of the ketogenic diet for pediatric epilepsy, *Nutr. Clin. Pract.* 23 (6) (2008) 589–596, <https://doi.org/10.1177/0884533608326138>.
- [4] C.E. Stafstrom, J.M. Rho, The ketogenic diet as a treatment paradigm for diverse neurological disorders, *Front. Pharmacol.* 3 (2012) 59, <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00059>.
- [5] K. Shmizu, H. Saito, K. Sumi, Y. Sakamoto, Y. Tachi, K. Iida, Short-term and long-term ketogenic diet therapy and the addition of exercise have differential impacts on metabolic gene expression in the mouse energy-consuming organs heart and skeletal muscle, *Nutr. Res.* 60 (2018) 77–86, <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2018.09.004>.
- [6] F.F. Samaha, N. Iqbal, P. Seshadri, K.L. Chicano, D.A. Daily, J. McGrou, T. Williams, M. Williams, E.J. Gracely, L. Stern, A low-carbohydrate as compared with a low-fat diet in severe obesity, *N. Engl. J. Med.* 348 (21) (2003) 2074–2081, <https://doi.org/10.1056/NEJMo022637>.
- [7] Cheng, C.M., et al., A ketogenic diet increases brain insulin-like growth factor receptor and glucose transporter gene expression, *Endocrinology* 2003, 144(6), 2676–82. DOI: 10.1210/en.2002.0057.
- [8] P.A. Lima, L.P. Sampaio, N.R. Damasceno, Neurobiochemical mechanisms of a ketogenic diet in refractory epilepsy, *Clinics (Sao Paulo)* 69 (10) (2014) 699–705, <https://doi.org/10.6061/clinics/2014/10/09>.
- [9] A.F. Vizuete, D.F. de Souza, M.C. Guerra, C. Batassini, M.F. Dutra, C. Bernardi, A. P. Costa, C.-A. Gonçalves, Brain changes in BDNF and S100B induced by ketogenic diets in Wistar rats, *Life Sci.* 92 (17–19) (2013) 923–928, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.03.004>.
- [10] E. Brietzke, R.B. Mansur, M. Subramaniam Pillai, V. Balanzá-Martínez, M. Vinberg, A. González-Pinto, J.D. Rosenblatt, R. Ho, R.S. McIntyre, Ketogenic diet as a metabolic therapy for mood disorders: Evidence and developments, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 94 (2018) 11–16, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.07.020>.
- [11] D. Kasprowska-Likiewicz, A.D. Likiewicz, M.M. Nowacka-Chmielewska, J. Nowicka, A. Malecki, J.J. Barski, The ketogenic diet affects the social behavior of young male rats, *Physiol. Behav.* 179 (2017) 168–177, <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.06.007>.
- [12] S. Joshi, R.J. Ostfeld, M. McMacken, The ketogenic diet for obesity and diabetes-enthusiasm outpaces evidence, *JAMA Intern. Med.* 179 (9) (2019) 1163–1164, <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2019.2633>.
- [13] C. Knöchel, V. Oertel-Knöchel, L. O'Dwyer, D. Prulovik, G. Alves, B. Kollmann, H. Hampel, Cognitive and behavioural effects of physical exercise in psychiatric patients, *Prog. Neurobiol.* 96 (1) (2012) 46–68, <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.11.007>.
- [14] P.J. Carek, S.E. Laibstein, S.M. Carek, Exercise for the treatment of depression and anxiety, *Int. J. Psychiatry Med.* 41 (1) (2011) 15–28, <https://doi.org/10.2190/PM.41.1.c>.
- [15] N. Uysal, O. Yuksel, S. Kizildag, Z. Yuce, H. Gumus, A. Karakilic, G. Guvendi, B. Koc, S. Kandis, M. Ates, Regular aerobic exercise correlates with reduced anxiety and increased levels of irisin in brain and white adipose tissue, *Neurosci. Lett.* 676 (2018) 92–97, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.04.023>.
- [16] N. Uysal, M. Kiray, A.Z. Sisman, U.M. Camsari, C. Gencoglu, B. Baykara, C. Cetinkaya, I. Aksu, Effects of voluntary and involuntary exercise on cognitive

- functions, and VEGF and BDNF levels in adolescent rats, *Biotech. Histochem.* 90 (1) (2015) 55–68, <https://doi.org/10.3109/10520295.2014.946968>.
- [17] J. Goh, W. Ladiges, Voluntary wheel running in mice, *Curr. Protoc. Mouse Biol.* 5 (4) (2015) 283–290, <https://doi.org/10.1002/9780470942390.mo140295>.
 - [18] M.L. Seibenhener, M.C. Wooten, Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice, *J. Vis. Exp.* 96 (2015), e52434, <https://doi.org/10.3791/52434>.
 - [19] M. Casarubaea, F. Sorbera, G. Crescimanno, Multivariate data handling in the study of rat behavior: an integrated approach, *Behav. Res. Methods* 41 (3) (2009) 772–781, <https://doi.org/10.3758/BRM.41.3.772>.
 - [20] R.D. Porsolt, A. Bertin, M. Jalfre, Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants, *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 229 (2) (1977) 327–336. PMID: 596982.
 - [21] S. Ma, Q. Huang, K. Yada, C. Liu, K. Suzuki, An 8-week ketogenic low carbohydrate, high fat diet enhanced exhaustive exercise capacity in mice, *Nutrients* 10 (6) (2018) 673, <https://doi.org/10.3390/nu10060673>.
 - [22] A. Paoli, A. Rubini, J.S. Volek, K.A. Grimaldi, Beyond weight loss: a review of the therapeutic uses of very-low-carbohydrate (ketogenic) diets, *Eur. J. Clin. Nutr.* 67 (8) (2013) 789–796, <https://doi.org/10.1038/ejcn.2013.116>.
 - [23] Q. Huang, S. Ma, T. Tominaga, K. Suzuki, C. Liu, An 8-week, low carbohydrate, high fat, ketogenic diet enhanced exhaustive exercise capacity in mice part 2: effect on fatigue recovery, post-exercise biomarkers and anti-oxidation capacity, *Nutrients* 10 (10) (2018) 1339, <https://doi.org/10.3390/nu10101339>.
 - [24] W.C. Miller, G.R. Bryce, R.K. Conlee, Adaptations to a high-fat diet that increase exercise endurance in male rats, *J. Appl. Physiol. Respir Environ. Exerc. Physiol.* 56 (1) (1984) 78–83, <https://doi.org/10.1152/jappl.1984.56.1.78>.
 - [25] J. Nilsson, M. Ericsson, M.M. Jolani, F. Anderson, L. Carlsson, S.K. Nilsson, A. Sjödin, J. Buren, A low-carbohydrate high-fat diet decreases lean mass and impairs cardiac function in pair-fed female C57BL/6J mice, *Nutr. Metab. (Lond)* 13 (2016), <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0132-8>.
 - [26] C.D. Withrow, The ketogenic diet: mechanism of anticonvulsant action, *Adv. Neurol.* 27 (1980) 635–642. PMID: 6990715.
 - [27] R.D. Feinman, W.K. Pogozelski, A. Astrup, R.K. Bernstein, E.J. Fine, E.C. Westman, A. Accurso, L. Frassetto, B.A. Gower, S.I. McFarlane, J.V. Nielsen, T. Krarup, L. Saslow, K.S. Roth, M.C. Vernon, J.S. Volek, G.B. Wilshire, A. Dahlqvist, R. Sundberg, A. Childers, K. Morrison, A.H. Manninen, H.M. Dashti, R.J. Wood, J. Wortman, N. Worm, Dietary carbohydrate restriction as the first approach in diabetes management: critical review and evidence base, *Nutrition* 31 (1) (2015) 1–13, <https://doi.org/10.1016/j.nut.2014.06.011>.
 - [28] A.R. Kennedy, P. Piskos, H. Otu, B. Xue, K. Asakura, N. Furukawa, F.E. Marino, F.-F. Liu, B.B. Kahn, T.A. Libermann, E. Maratos-Flier, A high-fat, ketogenic diet induces a unique metabolic state in mice, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292 (6) (2007) E1724–E1739, <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00717.2006>.
 - [29] Y. Wang, D. Xu, Effects of aerobic exercise on lipids and lipoproteins, *Lipids Health Dis.* 16 (1) (2017) 132, <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0515-5>.
 - [30] S. Mann, C. Beedie, A. Jimenez, Differential effects of aerobic exercise, resistance training and combined exercise modalities on cholesterol and the lipid profile: review, synthesis and recommendations, *Sports Med.* 44 (2) (2014) 211–221, <https://doi.org/10.1007/s40279-013-0110-5>.
 - [31] C. Couillard, J.-P. Després, B. Lamarche, J. Bergeron, J. Gagnon, A.S. Leon, D. C. Rao, J.S. Skinner, J.H. Wilmore, C. Bouchard, Effects of endurance exercise training on plasma HDL cholesterol levels depend on levels of triglycerides: evidence from men of the Health, Risk Factors, Exercise Training and Genetics (HERITAGE) Family Study, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21 (7) (2001) 1226–1232, <https://doi.org/10.1161/hq0701.092137>.
 - [32] A. Halverson, D.A. Phares, K.R. Wilund, A.P. Goldberg, J.M. Hagberg, Endurance exercise training raises high-density lipoprotein cholesterol and lowers small low-density lipoprotein and very low-density lipoprotein independent of body fat phenotypes in older men and women, *Metabolism* 56 (4) (2007) 444–450, <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2006.10.019>.
 - [33] R.O. Caminhoto, et al., Oral beta-hydroxybutyrate increases ketonemia, decreases visceral adipocyte volume and improves serum lipid profile in Wistar rats, *Nutr. Metab. (Lond)* 14 (2017) 31, <https://doi.org/10.1186/s12986-017-0184-4>.
 - [34] M.K. Badman, et al., Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states, *Cell Metab* 5 (6) (2007) 426–437, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.05.002>.
 - [35] T.H. Herdt, Ruminant adaptation to negative energy balance. Influences on the etiology of ketosis and fatty liver, *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 16 (2) (2000) 215–230, [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30102-X](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30102-X).
 - [36] C.M. Fernández Rodríguez, R. Alier, M.L. Gutiérrez García, J. Ampuero, J. Gómez-Camarero, R.M. Martín-Mateos, D. Burgos-Santamaría, J.M. Rosales, P. Aspichuea, X. Buque, M. Latorre, R.J. Andrade, M. Hernández-Guerra, M. Romero-Gómez, Higher levels of serum uric acid influences hepatic damage in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 111 (2019), <https://doi.org/10.17235/reed.2019.5965/2018>.
 - [37] P. Murphy, S. Likhodii, K. Nylen, W.M. Burnham, The antidepressant properties of the ketogenic diet, *Biol. Psychiatry* 56 (12) (2004) 981–983, <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.09.019>.
 - [38] D. Sussman, J. Germann, M. Henkelman, Gestational ketogenic diet programs brain structure and susceptibility to depression & anxiety in the adult mouse offspring, *Brain Behav.* 5 (2) (2015), e00300, <https://doi.org/10.1002/brb3.330>.
 - [39] C. Ari, Z. Kovács, G. Juhász, C. Múrdun, C.R. Goldkugel, A.M. Koutnik, A.M. Poff, S.L. Kesli, D.P. D'Agostino, Exogenous ketone supplements reduce anxiety-related behavior in sprague-dawley and wistar albino glaxo/rijswijk rats, *Front. Mol. Neurosci.* 9 (2016), <https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00137>.
 - [40] R.C. Peres, D.B. Nogueira, G. de Paula Guimarães, E.L. da Costa, D.A. Ribeiro, Implications of ketogenic diet on weight gain, motor activity and cistatization in Wistar rats, *Toxicol. Mech. Methods* 23 (2) (2013) 144–149, <https://doi.org/10.3109/15376516.2012.735276>.
 - [41] D.R. Ziegler, G.D. Gamero, E. Araujo, M.G. Bassani, M.L.S. Perry, C. Dalmaz, C.-A. Gonçalves, Nociception and locomotor activity are increased in ketogenic diet fed rats, *Physiol. Behav.* 84 (3) (2005) 421–427, <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.01.003>.
 - [42] C.H. Duman, L. Schlesinger, D.S. Russell, R.S. Duman, Voluntary exercise produces antidepressant and anxiolytic behavioral effects in mice, *Brain Res.* 1199 (2008) 148–158, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.12.047>.
 - [43] J. Salam, J. Fox, E. Detroy, M. Guignon, D. Wohl, W. Falls, Voluntary exercise in C57 mice is anxiolytic across several measures of anxiety, *Behav. Brain Res.* 197 (1) (2009) 31–40, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.07.036>.
 - [44] J. Fuss, N.-B. Ben Abdallah, M.A. Vogt, C. Touna, P.G. Pacifici, R. Palme, V. Witzemann, R. Hellweg, P. Gass, Voluntary exercise induces anxiety-like behavior in adult C57BL/6J mice correlating with hippocampal neurogenesis, *Hippocampus* (2009), <https://doi.org/10.1002/hipo.20634>.
 - [45] S. Pietropaolo, J. Feldon, E. Alleve, F. Cirulli, B.K. Yee, The role of voluntary exercise in enriched rearing: a behavioral analysis, *Behav. Neurosci.* 120 (4) (2006) 787–803, <https://doi.org/10.1037/0735-7044.120.4.787>.
 - [46] P. Murphy, W.M. Burnham, The ketogenic diet causes a reversible decrease in activity level in Long-Evans rats, *Exp. Neurol.* 201 (1) (2006) 84–89, <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.03.024>.
 - [47] T.-L. Huang, S.-C. Wu, Y.-S. Chiang, J.-F. Chen, Correlation between serum lipid, lipoprotein concentrations and anxious state, depressive state or major depressive disorder, *Psychiatry Res.* 118 (2) (2003) 147–153, [https://doi.org/10.1016/S0165-1781\(03\)00071-4](https://doi.org/10.1016/S0165-1781(03)00071-4).

Master Journal List

Search Journals

Match Manuscript

Downloads

Help Center

Login

Create Free Account

Already have a manuscript?

Use our Manuscript Matcher to find the most relevant journals!

Find a Match

filters

Clear All

Web of Science Coverage

Open Access

Category

Country / Region

Language

Frequency

Refine Your Search Results

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology

Search

Sort By: Relevancy

Search Results

Found 681 results (Page 1)

Share These Results

Journals Relevant To "Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology"

NAUNYN-SCHMIEDEBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY

Publisher: SPRINGER , ONE NEW YORK PLAZA, SUITE 4600 , NEW YORK, United States, NY, 10004

ISSN / eISSN: 0028-1298 / 1432-1912

Web of Science Core Collection: Science Citation Index Expanded

Additional Web of Science Indexes: Biological Abstracts | BIOSIS Previews | Current Contents Life Sciences | Essential Science Indicators

Share This Journal

View profile page

* Requires free login

117



The ameliorative effect of midazolam on empathy-like behavior in old rats

Ferda Hosgorler¹ · Erhan Caner Akkaya¹ · Rabia Ilgin¹ · Basar Koc¹ · Servet Kizildag² · Hikmet Gumus³ · Nazan Uysal¹

Received: 12 March 2023 / Accepted: 9 May 2023

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2023

Abstract

Although studies suggest that cognitive functions in the elderly are impaired, elderly people tend to be more successful and wiser in solving emotional problems. In empathy-like behavior models, the observer rat rescues the distressed cage mate by displaying emotional and cognitive ability. The aim of the study was to investigate the changes in empathy-like behavior in older rats in comparison to adult rats. In addition, we wanted to determine the effects of alterations in neurochemicals (such as corticosterone, oxytocin, vasopressin, and their receptor levels) and emotional situations on this behavior. In our study, we initially completed empathy-like behavior tests and emotional tests (open field, elevated plus maze) and performed neurochemical examinations in the serum and brain tissues. In the second step of research, we applied a midazolam (benzodiazepine) treatment to examine the effect of anxiety on empathy-like behavior. In the old rats, we observed that empathy-like behavior deteriorated, and anxiety signs were more pronounced. We detected a positive correlation between the latency in empathy-like behavior and corticosterone levels and v1b receptor levels. The midazolam effect on empathy-like behavior was attenuated by flumazenil (a benzodiazepine receptor antagonist). The recordings of ultrasonic vocalization showed frequencies around 50 kHz emitted by the observer and this was associated with the expectation of social contact. Our results state that compared to adult rats, old rats were more concerned and failed during empathy-like behavior. Midazolam may improve this behavior by anxiolysis.

Keywords Empathy · Prosocial behavior · Anxiety · v1b vasopressin receptor · Corticosterone · Elderly · Midazolam

✉ Ferda Hosgorler
ferda.hosgorler@deu.edu.tr
Erhan Caner Akkaya
erhancaner.akkaya@deu.edu.tr
Rabia Ilgin
rabia.ilgin@ogr.deu.edu.tr
Basar Koc
basar.koc@deu.edu.tr
Servet Kizildag
servet.kizildag@deu.edu.tr
Hikmet Gumus
hikmet.gumus@deu.edu.tr
Nazan Uysal
nazan.uysal@deu.edu.tr

¹ Department of Physiology, School of Medicine, Dokuz Eylül University, Balçova, İzmir, Turkey

² College of Vocational School of Health Services, Dokuz Eylül University, İzmir, Turkey

³ School of Sport Sciences and Technology, Dokuz Eylül University, İzmir, Turkey

Introduction

Empathy is comprised of emotional and cognitive skills and can be defined as the capacity to understand and respond to the emotional experiences of others. Empathy enables humans to establish social relationships and adapt to their community (Lamm et al. 2007). The emotional physiological reactions instilled in humans which are based on the situations of other people in distress are labeled “emotional empathy.” Understanding others’ emotions and acquiring perspectives is described as “cognitive empathy.” Finally, the responses created as a result of these processes have been ascribed the label of “prosocial behavior” (helping behavior) (Kollmuss and Agyeman 2002; Baron-Cohen and Wheelwright 2004).

Studies propose that cognitive empathy decreases with advancing age (Bailey et al. 2008; Ruffman et al. 2008; Hühnel et al. 2014). It has been suggested that cognitive empathy associated with the loss of attention, memory and perception, structural deteriorations in the brain, slowing in process speed, and reduced reasoning ability

may be diminished in the elderly (Glisky 2007; Ruffman et al. 2008; Hühnel et al. 2014). The assessment of emotional changes is more ambiguous than cognitive changes. A study has indicated the elderly are generally more successful in solving emotional problems than the young, and they are sage (Ebner et al. 2013). In a large-scale study involving individuals from different ethnic roots and communities, in comparison to young people, it was reported that self-reported negative emotional experiences (such as fear, anger, and sadness) decreased, positive emotions (such as happiness) increased, and the control of negative emotions was overall more successful for the elderly (Gross et al. 1997). On the other hand, research has indicated that emotional functions are related to cognition levels; the emotional empathy levels of the elderly with high cognitive empathy are higher and prosocial behaviors (helping behavior) are more motivated (Beadle et al. 2015). When compared to young people, the elderly experience failures in cognitive functions and may also display a decrease in emotional empathy and helping behavior. In order to study and examine empathy, it is possible to focus on the processes of cognitive and emotional empathy which can impact one another and consequently induce helping behavior.

In our previous studies in rats, we observed helping behavior (empathy-like behavior) and detected changes related to oxytocin and vasopressin levels in the prefrontal cortex and amygdala regions. These may have exhibited a useful model for understanding the neurochemical processes of empathy (Kandis et al. 2018; Karakilic et al. 2018; Yuksel et al. 2019; Hosgorler et al. 2020). The alterations in emotional situations and the levels of oxytocin, vasopressin, and their receptors in the brains of aged subjects may affect empathy-like behavior. The mechanisms of how empathy in the elderly changed and the relationships of these alterations with the brain's neurochemicals are still unclear. Therefore, the empathy-like behavior model in rats may provide some insight into these changes. The aim of this study was to investigate the possible changes in empathy-like behaviors of old rats and the subsequent effects of emotions and neurochemicals.

Material and methods

In the present study, Sprague-Dawley male old rats (26–28 months, 380–430 g weight) and male adult rats (9–10 months, 280–320 g weight) were obtained from the institutional animal laboratory. All rats were housed in a 12-h light/12-h dark cycle at constant room temperature (22 ± 1 °C) and humidity (60%) with free access to water and laboratory chow.

Groups, experiments, and sample collection

In the first step of experiments, the rats were separated and examined in four groups: old rats (OR, $n = 6$); adult rats (AR, $n = 6$); naive old rats (NOR, $n = 4$); naive adult rats (NAR, $n = 4$). Empathy-like behavior tests were implemented to the rats in the OR and AR groups. The naive rat groups were subjected to the behavioral tests (open field test and elevated plus maze test). The AR and OR groups were subjected to these tests immediately after the empathy-like behavior test and all were eventually sacrificed. In this step, the relationships between empathy-like behavior, emotional situations, and biochemical parameters were evaluated.

In the second step, old rats were separated and examined in four groups. Negative control group (NC, $n = 6$): rats were subjected to empathy-like behavior tests without subcutaneous injection; sham control group (SC, $n = 4$): rats were subjected to the empathy test following a 0.9% NaCl injection; the midazolam group (MDZ, $n = 5$): rats were subjected to an empathy test after midazolam injection; midazolam plus flumazenil group (MDZ-FLU, $n = 5$): rats were subjected to an empathy test following midazolam and flumazenil injections. In this step, the ameliorative effect of anxiolysis on empathy-like behavior in old rats was analyzed. After the learning period, all rats in these groups were subjected to empathy tests and behavioral tests. Ultrasonic vocalizations of old rats were recorded during empathy-like behavior tests. The old rats that completed the experiments were sacrificed and blood samples were collected for corticosterone analysis.

For a period of 30 days prior to the experiments, the rats were housed in the same cages with randomly selected pairs to get accustomed to one another. In previous studies, we observed that rats demonstrated helping behavior only with familiar cage mates. Similarly, in other prosocial behavior tests, only familiar rats were used (Carvalho et al. 2019). The rats were subjected to handling and then placed in the empathy apparatus for 7 days (5 min) to enable them to adapt to the experimental environment. Following the adaptation period, for a duration of 12 days, all the rats were placed in the empathy apparatus to learn to rescue their cage mate.

An empathy-like behavior measurement was performed on the 13th day. Following the end of the empathy-like behavior and other behavior tests, all rats underwent thoracotomy under CO₂ anesthesia; blood and tissue samples were collected.

Blood samples were collected via 25-gauge needles by right heart ventricle puncture. After decapitation, the brain was removed by craniotomy en bloc, and the prefrontal cortex and amygdala regions were separated. Tissue samples were stored at -80 °C until homogenization and

measurement. Blood samples were centrifuged at 1000 g for 10 min; serums were collected and stored at -80°C .

The experiments on behavioral measurements were recorded using a video camera and video tracking system device equipped with EthoVision XT Software (Noldus Information Technology Inc., Leesburg, VA, USA). All experiments were performed at the same time interval.

Drug administration

In the second step of experiments, the empathy-like behavior experiment was performed with 0.9% NaCl (Poliflex İzotonik, Polifarma İlaç, Tekirdağ, Turkey; 1 ml/kg, subcutaneously), with midazolam (Midaject, Tüm Ekip İlaç, İstanbul, Turkey; 0.5 mg/kg, subcutaneously), and with midazolam plus flumazenil (Anexate; Cenexi SAS, Fontenay, France; 3 mg/kg, subcutaneously) injections. The subcutaneous injection of MDZ was administered 30 min before the empathy-like behavior experiment. FLU administration to block the benzodiazepine receptor was completed 15 min before the MDZ injection.

Empathy-like behavior experiments

In this study, an apparatus similar to the one described previously was used to test the empathy-like behavior in rats (Sato et al. 2015). The apparatus is a black plexiglass rectangular box ($450 \times 450 \times 900$ mm) separated in the middle by a transparent section which divides the box into two equal compartments: one a pool area, the other a dry area. The transparent section contains a transparent door which allows passage between the two areas. The door was a round shape made of plastic and could be opened by the rats when they pushed it with their noses. The observer rat in the dry compartment can open the door and rescue his cage mate immersed in the pool (Fig. 1a, b). After a period of drying out and reconnecting with the environment, the roles were reversed (approximately 10 min later). The experimental period

was 300 s and the duration of rescue time for the opening of the door for each rat was recorded manually. Each behavioral experiment was conducted by the same investigator and controlled by a second observer investigator. If the observer rat opened the door and saved its cage mate within 300 s, this was accepted as being indicative of empathy-like behavior.

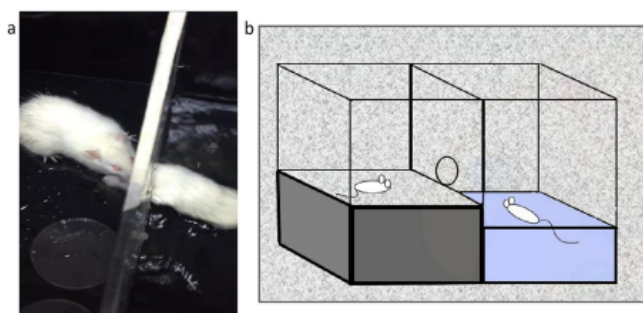
Elevated plus maze test

This is a test used to determine anxiety behavior in rodents (Xia et al. 2018). The elevated plus maze apparatus is elevated 50 cm above the ground and consists of a central platform (5×5 cm) with two open and two closed arms (both 50 cm long, 10 cm wide). The rats were placed on the central platform and recorded via a video system for 300 s. The time the rats spent upon the center area, open and closed arms, and the frequency of entry to these arms were recorded. On the platform raised above the ground, if the animal avoided entry onto the open arms and showed decreased exploration, these behaviors were taken as indicative of anxiety.

Open field test

The locomotor activity, exploratory behavior and emotional behavior of the rodents were evaluated in the open field test (Rodrigues-Alves et al. 2009). A black plexiglass box with a height of 50 cm and dimensions of 100×100 cm was used. The floor of the box was divided into equal squares (75% at the edges, 25% at the center) and illuminated with a light source (100 lx). The rats were placed in the center of the field and the durations spent at the edges and in the center area of the field were recorded with the video tracking system for a period of 300 s. In this test, total distance traveled, time spent in the center area, and margin areas were recorded. Increased amounts of time spent in the edges area or immobility were accepted as signs of anxiety.

Fig. 1 **a** The rat rescues the cage mate by opening the door. **b** The empathy-like behavior experiment



Ultrasonic vocalization measurements

The empathy box was placed in the sound-isolated room. The empathy box cover was drilled at both compartments and microphones were implanted into the holes. The microphones were connected to a data acquisition device. The calls emitted by the observer rat and the distressed rat were recorded separately and the calls of the observer rats were evaluated.

Avisoft-SASLab Pro software and Avisoft UltraSound-Gate 1216H²⁰⁰ device were used for vocalization recordings. Following data collection, all evaluations were performed using the DeepSqueak scripts in Matlab. This software enabled the detection of ultrasonic vocalizations within the sound sequences. The identified vocalization data was manually verified and confirmed by the researcher. The number of calls, call type, peak frequency of vocalization, and frequency change (bandwidth) were determined. Call duration, slope, sinusity, average power, and average tonality were detected by recording.

In order to accurately classify distinct vocalizations, the algorithm applied in this interface leverages acoustic features such as spectral gradients, tonal characteristics, and contour patterns. The graphical representation provides a comprehensive visualization of classified samples, mapping frequency, and time domains, with color-coded amplitudes corresponding to the intensity of the acoustic signals. Spectral gradients provide information about the change in frequency content over time, while tonality measurements capture the harmonic structure of the sound. Contour patterns provide insights into the temporal dynamics and fluctuations in frequency, which are critical for distinguishing between different vocalization types. The color-coded scheme represents the amplitude of the sound, with variations in color intensity corresponding to fluctuations in the acoustic signal's amplitude. This intuitive visualization allows researchers to quickly assess the distribution and characteristics of the classified vocalizations, facilitating further analysis and interpretation.

Biochemical measurements

Frozen samples of brain tissue were weighed and homogenized with steel beads using BioSpec Mini-Beadbeater-16 (BioSpec Products Inc., USA) in 10 volumes of PBS (pH:7.4) and centrifuged at 3500 g for 15 min at 4 °C. The supernatants and serums were used for biochemical analyses.

Tissue and serum ELISA measurements were performed according to kit protocols. We implemented rat-specific Oxytocin ELISA Kit (Catalog Number E1216Ra, Bioassay Technology Laboratory, China), rat-specific Arginine Vasopressin ELISA Kit (Cat. No: E1873Ra, Bioassay

Technology Laboratory, China), rat-specific Oxytocin Receptor Elisa Kit (Cat No: E1476Ra, Bioassay Technology Laboratory, Shanghai, China), rat-specific Vasopressin V1a Receptor Elisa Kit (Cat No: E1477Ra, Bioassay Technology Laboratory, Shanghai, China), rat-specific Vasopressin V1b Receptor Elisa Kit (Cat No: E1478Ra, Bioassay Technology Laboratory, Shanghai, China), and rat-specific Corticosterone ELISA Kit (Cat. No E0496Ra, Bioassay Technology Laboratory, China). All results were calculated as mg protein per tissue. Protein analyses were performed according to the manufacturer guide of the BCA protein Assay kit (Catalog Number 23227, Pierce™ BCA Protein Assay Kit, USA). Absorbency changes were measured using a microplate reader (ELx800, Biotec Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) at 450 nm for ELISA kits and at 560 nm for protein assay kits.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS 24.0 (IBM, Turkey). The Kolmogorov-Smirnov normality test was applied. The one-way ANOVA test was implemented for variables in normal distribution and the Kruskal–Wallis test was used when the variables were not normally distributed. To compare two groups, the Student's *t*-test was applied for variables in normal distribution and the Mann-Whitney *U* test was used when the variables were not normally distributed. Correlations among the parameters of neurochemical tests and empathy-like behavior test were calculated by Pearson correlation analysis. *p* values < 0.05 were considered statistically significant. The differences among the groups were displayed in a graph. The results of the statistical test analysis, mean ± standard error mean (SEM), *F* values, *t* values, and *p* values are presented in Table 1.

Results

Latency in empathy-like behavior in the adult and old rats and alterations in oxytocin and vasopressin levels

The door opening durations following the learning experiments demonstrated significant differences between the OR and AR groups. Compared with AR, OR displayed a latency in opening the door in the empathy box (*p* = 0.002, Fig. 2a, b). Compared to the NAR and NOR groups, in the AR and OR groups, there were no differences in oxytocin and vasopressin levels in the amygdala and prefrontal cortex. There was also no significant difference between oxytocin receptor levels of the amygdala and prefrontal cortex. The v1a receptor levels in

Table 1 Statistical findings of biochemical analysis and behavioral tests

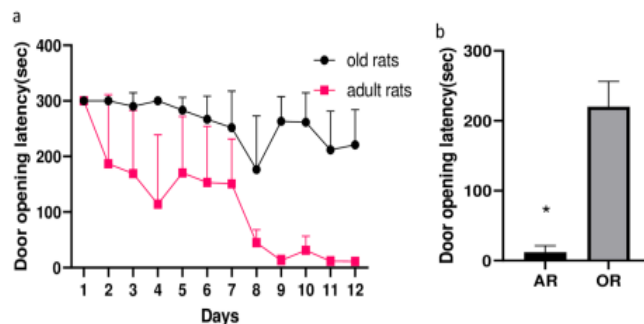
Parameter	Groups	Mean $\pm$ SEM	<i>p</i> value	<i>p</i> value for subgroups	<i>F</i> value	<i>t</i> value
Door opening durations	AR	11.83 $\pm$ 3.92	<i>p</i> = 0.002	MDZ-NC <i>p</i> = 0.007 MDZ-SC <i>p</i> = 0.016 MDZ-MDZFLU <i>p</i> = 0.038	<i>F</i> (3.16) = 6.52	<i>t</i> (5.1) = -5.72
	OR	220 $\pm$ 36				
	NC	220 $\pm$ 36	<i>p</i> = 0.04			
	SC	220 $\pm$ 42				
	MDZ	34 $\pm$ 15				
	MDZ-FLU	189 $\pm$ 88				
Corticosterone	NAR	2.77 $\pm$ 0.44	<i>p</i> < 0.0001	OR-NAR <i>p</i> < 0.0001 OR-AR <i>p</i> = 0.001 OR-NOR <i>p</i> < 0.001	<i>F</i> (3.16) = 17.89	
	AR	4.65 $\pm$ 0.64				
	NOR	3.57 $\pm$ 0.48				
	OR	8.48 $\pm$ 0.63				
	NC	8.48 $\pm$ 0.63	<i>p</i> = 0.002	MDZ-NC <i>p</i> = 0.009 MDZ-SC <i>p</i> = 0.004	<i>F</i> (3.16) = 7.47	
	SC	9.25 $\pm$ 1.49				
	MDZ	4.72 $\pm$ 0.31				
	MDZ-FLU	6.62 $\pm$ 0.24				
Amygdala v1b	NAR	0.47 $\pm$ 0.18	<i>p</i> = 0.002	OR-NAR <i>p</i> = 0.03	<i>F</i> (3.16) = 7.48	
	AR	0.63 $\pm$ 0.17				
	NOR	1.63 $\pm$ 0.38				
	OR	2.48 $\pm$ 0.48				
Prefrontal cortex v1b	NAR	1.54 $\pm$ 0.19	<i>p</i> < 0.001	OR-NAR <i>p</i> = 0.004 OR-AR <i>p</i> = 0.001 OR-NOR <i>p</i> = 0.004	<i>F</i> (3.16) = 10.46	
	AR	1.13 $\pm$ 0.36				
	NOR	1.35 $\pm$ 0.41				
	OR	16.30 $\pm$ 3.97				
Elevated plus maze total distance traveled (cm)	NAR	1.324 $\pm$ 227	<i>p</i> = 0.002	OR-NAR <i>p</i> = 0.001	<i>F</i> (3.16) = 8.07	
	AR	761 $\pm$ 175				
	NOR	665 $\pm$ 97				
	OR	295 $\pm$ 31				
Open field total distance traveled (cm)	NAR	3.050 $\pm$ 2.43	<i>p</i> = 0.003	OR-NAR <i>p</i> = 0.002	<i>F</i> (3.16) = 7.06	
	AR	2.393 $\pm$ 278				
	NOR	2.105 $\pm$ 179				
	OR	1.616 $\pm$ 126				

the amygdala and prefrontal cortex did not change in the groups. The v1b receptor levels in the amygdala and in the prefrontal cortex showed significant differences between the groups ($p = 0.002$, $p < 0.001$, respectively). The levels of v1b receptor were significantly higher in the OR group than in the NAR groups ($p = 0.03$ for amygdala; $p = 0.004$ for the prefrontal cortex, Figure 3a). Compared to the AR and NOR groups, v1b receptor levels were higher in the prefrontal cortex ($p = 0.001$, $p = 0.004$, respectively) of the OR group.

Corticosterone levels and the results of behavioral tests in the adult and old rats

Serum corticosterone levels varied significantly among the groups ($p < 0.0001$). In comparison to the AR, NAR, and NOR groups, corticosterone levels increased significantly in the OR group ($p = 0.001$, $p < 0.0001$, $p < 0.001$, respectively, Figure 3b). The open field test demonstrated a significant difference amid the groups in terms of total

Fig. 2 **a** Learning period in the adult and in the old rats. **b** Door opening durations in the groups. The door opening duration in the OR group was significantly increased compared to in the AR group (data are reported as mean $\pm$ SEM. AR, adult rat; OR, old rat, $p = 0.002$)



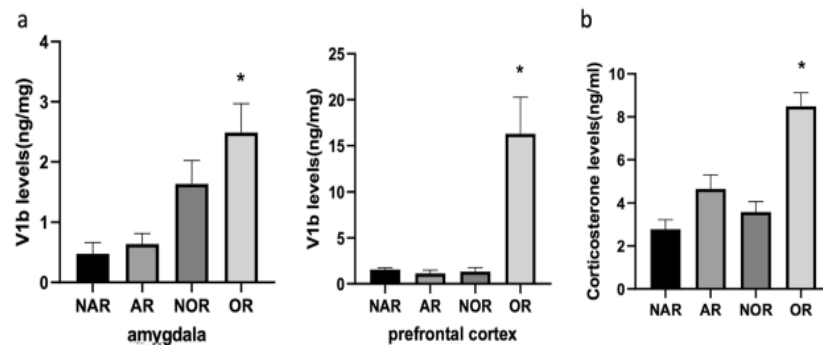


Fig. 3 **a** v1b receptor levels in the amygdala and in the prefrontal cortex. In the amygdala, v1b receptor levels were significantly increased in the OR group than NAR group ($p=0.003$). Compared to the other groups, v1b receptor levels significantly increased in the OR group in the prefrontal cortex ($p=0.004$ for NAR, $p=0.001$ for AR, $p=$

0.004 for NOR). **b** Serum corticosterone measurements. Corticosterone levels were higher in the OR group compared to the other groups ($p < 0.0001$ for NAR, $p = 0.001$ for AR, $p < 0.001$ for NOR) (data are reported as mean $\pm$ SEM. AR, adult rat; OR, old rat; NAR, naive adult rat; NOR, naive old rat; v1b, vasopressin 1b receptor)

distance traveled ($p=0.003$). The total distance traveled measurements of the OR group were significantly lower than the NAR group ($p=0.002$, Figure 4a). The periods of time spent in the center and margin areas were not different. In the elevated plus maze test, the total distance traveled varied in the groups ($p=0.002$). Compared to the OR group, the total distance traveled was longer in the NAR group ($p=0.001$, Fig. 4b). The entry frequency and time spent on closed and open arms indicated no differences among the groups.

The relationship of corticosterone and v1b levels with door opening times

The v1b levels and corticosterone levels were found to be moderately and strongly correlated with the door opening times ($r=0.894$, $p<0.0001$ for v1b of the amygdala, $r=0.591$,

$p=0.043$ for v1b of prefrontal cortex, $r=0.792$, $p=0.002$ for corticosterone levels in serum, Fig. 5a–c, respectively).

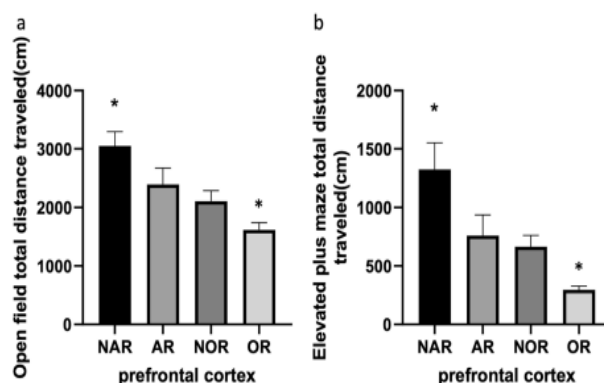
The effect of midazolam on latency in empathy-like behavior

In the old rat groups, door opening times were markedly different ($p=0.04$). The latency in empathy-like behavior was shorter in the MDZ group when compared to the other experimental groups ($p=0.007$ for NC group, $p=0.016$ for SC group, $p=0.038$ for MDZ-FLU, Fig. 6a).

The midazolam effect on corticosterone levels

In the old rat groups, corticosterone levels varied significantly with MDZ treatment ($p=0.002$). When compared to other control groups, the MDZ treatment significantly

Fig. 4 Behavior experiments in the groups. **a** In the open field test, total distance traveled decreased in the OR group compared to the NAR group ($p=0.002$). **b** In the elevated plus maze test, total distance traveled was shorter in the OR group in comparison to the NAR group ($p=0.001$). Data are reported as mean $\pm$ SEM



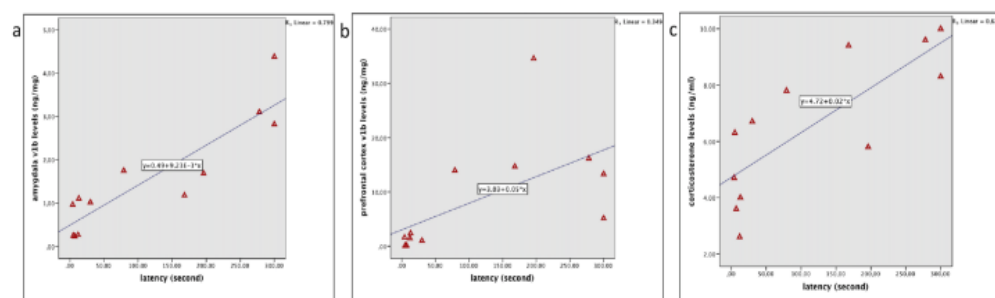


Fig. 5 Correlation analysis between door opening latency and biochemical measurements. **a** There was a positive correlation between door opening times and v1b receptor levels in the amygdala. **b** There was a posi-

tive correlation between door opening times and prefrontal v1b receptor levels. **c** A positive correlation was found regarding corticosterone levels and door opening time ($p < 0.0001$, $p = 0.043$, $p = 0.002$, respectively)

reduced serum corticosterone levels in the MDZ group ($p = 0.009$ for NC group, $p = 0.004$ for SC group, Fig. 6b).

was recorded in the range of 51–67 kHz in each group. The bandwidth of the calls was in the range of 3–9 kHz.

The midazolam effect on behavioral tests

In the open field and elevated plus maze tests, the total distance traveled did not vary among the groups ($p > 0.05$). In the open field test, there were no differences in the time spent in the center and margin areas ($p > 0.05$). In the elevated plus maze test, there were also no significant differences amid the groups in the time spent on the open and closed arms ($p > 0.05$).

The midazolam effect on ultrasonic vocalization

In the old rat groups, because there were only a small number of calls detected, we performed a qualitative assessment. The characteristics of the calls are presented in Table 2. The call type we detected was flat and step-up. Peak frequency

Discussion

In this study, we examined empathy-like behavior in aged subjects and observed that compared to the AR group, the OR group either did not open the door or opened it later. In the OR and AR groups, we investigated the neurochemical changes that could be the results or reasons of the empathy-like behaviour. The neurochemical changes in the AR and OR groups were compared with the NAR and NOR groups which had not been subjected to the empathy-like behavior tests. In earlier studies, we had observed changes in oxytocin and vasopressin levels associated with empathy-like behavior in the amygdala and prefrontal cortex (Kandis et al. 2018; Karakilic et al. 2018; Yuksel et al. 2019). We did not detect them in the present study. Oxytocin is a neuromodulator whose positive effects

Fig. 6 Door opening latency and corticosterone levels under the influence of anxiolysis.

a Door opening latency was lower in the MDZ group than in the other groups ($p = 0.04$). **b** Corticosterone levels were lower in the MDZ group compared to the NC and SC groups ($p = 0.002$) (data are reported as mean $\pm$ SEM. NC, naive control group; SC, sham control group; MDZ, midazolam; MDZ-FLU, midazolam plus flumazenil)

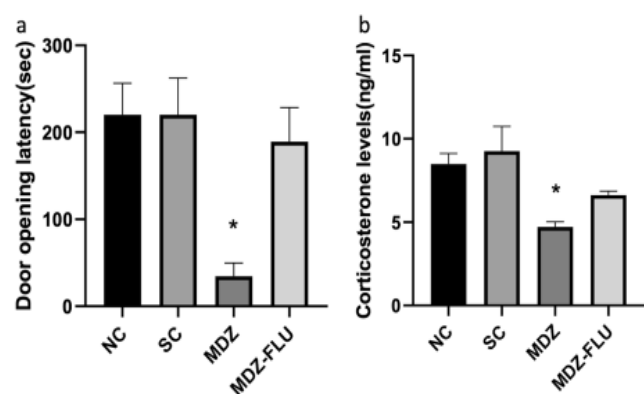


Table 2 Ultrasonic vocalization recordings in the groups

Groups	Peak frequency (kHz)	Duration (ms)	Slope (kHz/s)	Sinuosity	Average power (dB/Hz)	Average tonality	Bandwidth (kHz)
NC	55.8	101	-77.472	1.9089	-87.0221	0.4785	3;10
	65.2	81	297.525	1.7884	-85.1557	0.5254	7;5
	60.3	71	107.881	1.3532	-86.3424	0.5281	9
	51.2	53	122.235	1.1000	-74.3745	0.7374	6
	53.6	52	200.544	1.1315	-76.9538	0.7278	10
	53.3	150	-80.101	1.2594	-79.4583	0.6146	2;6
SC	62	19	1212.758	1.4805	-87.336	0.4475	8
	52.6	33	131.703	1.4268	-87.753	0.5195	9
	54.1	23	147.126	1.0546	-91.4806	0.4459	7
	55.7	35	52.903	1.0086	-90.0769	0.3777	5
	74.9	42	419.132	1.9103	-89.7992	0.3689	3;4;3
MDZ	67.2	62	266.372	2.3209	-84.7868	0.5453	5;8
MDZ-FLU	64.6	71	153.978	2.3564	-91.864	0.3950	6
	54.4	17	-206.553	1.4374	-82.667	0.6274	3

in the sense of trust, social convergence, and attachment processes have been reported (Kosfeld et al. 2005; Bar-raza and Zak 2009; Lee et al. 2009). Vasopressin has been shown to play an important role in regulating emotional and cognitive brain functions such as memory, stress, fear, and depression (Corbani et al. 2018). Oxytocin and vasopressin receptors are found in the brain regions associated with empathy where oxytocin and vasopressin produce central effects via direct projection from the hypothalamus (Gimpl and Fahrenholz 2001; Knobloch et al. 2012; Pisansky et al. 2017; Corbani et al. 2018). The behavioral effects of alterations in central levels of oxytocin, vasopressin, and their receptors with advancing age are not clear. Smith et al. and Arsenijevic et al. recorded that oxytocin and v1a binding were different in the social behavior regions of brains in juvenile, adult, and old rats (Arsenijevic et al. 1995; Smith et al. 2017). It has been observed that for v1a knockout rats, and in situations in which v1a expression decreased, there were resulting changes in social interaction, cognitive dysfunctions, and the emergence of symptoms similar to schizophrenia (Potasiewicz et al. 2020; Broniarczyk-Czarniak et al. 2022). Research conducted on young adults indicated that oxytocin was related to emotional empathy, while v1a receptors were involved in cognitive empathy (Uzefovsky et al. 2015). Nevertheless, the oxytocin receptor and v1a receptor binding density varied according to age and gender (Smith et al. 2017). No clear indications of changes in the behavioral effects of these receptors were observed in the amygdala and prefrontal cortex of old male rats. In old male subjects, oxytocin receptors and v1a receptors may not be effective in this behavior.

We could not determine any alterations in oxytocin and vasopressin levels in the amygdala and prefrontal cortex

regions. Compared to the NAR, AR, and NOR groups, the v1b receptor and corticosterone levels increased significantly in the OR group. The levels of corticosterone and v1b receptor increased in the aged rats in association with empathy-like behavior tests, but were not affected in the adult rats. There was a positive correlation between v1b receptor levels, corticosterone levels, and door opening times. Some studies indicated that v1b receptor levels were affected in the brain in relation to stress and ACTH axis (Thomson and Napier 2015; Katz et al. 2017; Corbani et al. 2018).

In our study, the higher levels of v1b in the amygdala and prefrontal cortex, and higher levels of corticosterone in the serum in the OR group than the AR group, enabled us to consider the concept that stress and anxiety levels in the old rats were higher during empathy-like behavior experiments. We thought that the experiences on the empathy-like behavior tests were a stress factor for the aged rats.

In our behavior experiments, the anxiety tests of the old rats and adult rats exhibited changes consistent with corticosterone and v1b receptor levels. In the open field test, and elevated plus maze test, the total distance traveled in the OR group was shorter than other groups and this difference was significant between the OR and NAR groups. These consequences may be related to the reduced locomotor activity levels of the OR group. In these tests, old rats displayed immobility and freezing behavior. When facing a threatening situation, the behavior inhibition system can be activated in the limbic system regions of the brain yielding anxiety responses such as freezing and immobilization (Steimer 2011). In the OR group, we considered these reduced mobility findings to be associated with a high degree of anxiety. We perceived that the OR group demonstrated increased self-grooming and defecation behaviors. Similar to freezing, self-grooming and defecation behaviors are known to

be associated with fear and anxiety in rats (Song et al. 2016). These findings were observational and were not recorded as they had not been included in the experimental design. However, they may support our anxiety evidence.

Stress is an important factor which can impact cognitive and emotional ability both positively or negatively (Jung et al. 2019; Langer et al. 2020). Previous research of anxiety experiments demonstrated that aged rats were more anxious (Shoji and Mizoguchi 2011; Lomidze et al. 2020; Sotoudeh et al. 2020). To confirm the inhibitory effect of stress on helping behavior, we examined empathy-like behavior with the use of an anxiolytic drug. The anxiolytic effects of MDZ are related with an increased GABA_A-GABA_A receptor interaction, opening of Cl⁻ channels, and, consequently, neuronal suppression (Oikkola and Ahonen 2008). MDZ is administered to rats in behavior experiments as a positive control. The effectiveness of MDZ has been demonstrated in various studies such as light/dark test (Chaouloff et al. 1997), post-traumatic stress disorder model (Miao et al. 2014), elevated plus maze and zero maze test (Shepherd et al. 1994; Cavaliere et al. 2020). In our recent study, MDZ treatment decreased corticosterone levels and accelerated helping behavior in the aged rats. In contrast to the old rats which did not open the rescue door or did it late, the rats that received MDZ provided help more rapidly. To examine whether this effect was linked with the GABA_A receptor, prior to MDZ, flumazenil was administered to the rats. Flumazenil is a GABA_A receptor antagonist and abolishes the anxiolytic effect of benzodiazepines (Pitsikas and Tarantilis 2020). We showed that the ameliorative efficacy of MDZ was canceled by flumazenil. Yanping et al. reported that MDZ was effective on cognitive reinforcement in short-term use (Duan et al. 2019). Cognitive reinforcement may also play a role in the ameliorative effect of MDZ on helping behavior in the elderly. We did not detect a significant effect of MDZ in the open field and elevated plus maze tests in old rats. Therefore, we can state that this ameliorative effect of MDZ on empathy-like behavior is independent of motor function.

Compared to the control groups, the evaluation of ultrasonic vocalization indicated the number of calls was less in the MDZ group. The latency for door opening times was longer in the NC and SC groups than in the MDZ group; therefore, more calls were emitted. All rats produced 50-kHz calls during the empathy-like behavior experiment. In some studies, 50-kHz calls have been associated with the expectation of social contact in rats (Panksepp 2010; Davidson and Hurst 2019). These studies reported that isolated rats display a seeking behavior towards 50-kHz calls emitted by the cage mate. In our study, the rats may have emitted these calls to direct their cage mates towards the rescue door. We also observed that the observer rat rescued the distressed cage

mate if the distressed rat came to the rescue door. Therefore, the redirect call may have facilitated helping behavior.

Behavior test results are susceptible to external or internal stimuli. Ben-Ami Bartal et al. showed that MDZ impaired helping behavior in young rats and the corticosterone levels of observer rats affected helping behavior (Ben-Ami Bartal et al. 2016). In this study, the researchers suggested that high corticosterone delayed helping behavior and this finding is consistent with our study. Obviously, the effect of stress on helping behavior changes in old age. Compared to adults, the old rats experienced a stronger fearful condition during empathy-like behavior tests. Empathy box, social isolation, and call for help from cage mate may provoke anxiety in the old rats. The high level of anxiety in the old rats during the empathy experiments may have led to failure to rescue the cage mate or latency in recovery behavior. We surmised this implication as rescue latency is correlated with corticosterone and v1b receptor levels. According to our results, in old subjects, anxiety seems to be a preventive factor when considering empathy-like behavior. The relationship between anxiety and empathy has been studied frequently in human studies. The indirect interaction of anxiety and empathy processes in the brain has been demonstrated by functional magnetic resonance imaging in regions involving the prefrontal cortex and amygdala (Knight et al. 2019). High corticosterone levels and anxiety may have rendered the animals immobile (Steimer 2011). The behavior inhibition system against external threats is an evolutionarily conserved adaptive behavior which ensures survival of the animals (Porges 2003). Research has demonstrated that threat-related behavior inhibition in rodents occurs with anxiety and disappears with anxiolytic drugs (Qi et al. 2010). It may be that old rats were motivated in helping behavior but may have failed to help as a result of freezing and inactivity. MDZ may accelerate empathy-like behavior by removing behavioral inhibitions.

Conclusion

Cognitive and perceptual deficiencies in the elderly cause difficulties in their lives. Additionally, if there is a decrease in empathy levels, this may lead to other social problems such as a decrease in social interactions, an increase in loneliness, and difficulties in maintaining personal care and needs. To our knowledge, empathy changes in the elderly compared to the adult have not been investigated in accordance with the neurochemical processes of the brain. In this recent study, although empathy-like behavior was reduced in the old subjects, we could not suggest that there was a loss of empathy in the elderly. Emotional arousal is high in old rats and anxiety levels affect their behavior. Since mobility was restricted, the empathy-like behavior model could not

clearly reveal the empathy levels of the elderly subjects. In this study, we suggest that older subjects are more sensitive than adults when a familiar subject is in trouble.

Our limitations in this study were to focus on older healthy subjects. Subjects with sensory loss such as vision and hearing, diseases, and very low motor performance were not included in the study. Unfortunately, some subjects died during the experiment and the number of subjects was quite small. Although the sample size was small, we were able to demonstrate that anxiolysis improved helping behavior in aged rats. It would be appropriate to work with different models for empathy in old rats. The negative effect of anxiety on behavioral tests in elderly subjects should be taken into account.

Author contribution Conceptualization: Ferda Hosgorler. Data curation: Ferda Hosgorler, Erhan Caner Akkaya, Rabia Ilgin, Servet Kizildag, Basar Koc. Formal analysis: Ferda Hosgorler, Erhan Caner Akkaya, Rabia Ilgin, Hikmet Gumus. Funding acquisition: Nazan Uysal. Investigation: Ferda Hosgorler, Erhan Caner Akkaya, Rabia Ilgin, Basar Koc, Servet Kizildag. Methodology: Ferda Hosgorler, Nazan Uysal. Resources: Nazan Uysal. Validation: all authors. Writing — original draft: Ferda Hosgorler. Writing — review and editing: all authors. The authors declare that all data were generated in-house and that no paper mill was used.

Data availability The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Declarations

Ethical approval The study was approved by the Experimental Animals Ethics Committee (approval number: 05.04.2018-40/2018). The rats' care and experimental procedures were performed by the experimental study team in accordance with the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" guide.

Competing interests The authors declare no competing interests.

References

- Arsenijevic Y, Dreifuss JJ, Vallet P et al (1995) Reduced binding of oxytocin in the rat brain during aging. *Brain Res* 698:275–279
- Bailey PE, Henry JD, Von Hippel W (2008) Empathy and social functioning in late adulthood. *Aging Ment Health* 12:499–503
- Baron-Cohen S, Wheelwright S (2004) The empathy quotient: an investigation of adults with Asperger syndrome or high functioning autism, and normal sex differences. *J Autism Dev Disord* 34:163–175
- Barraza JA, Zak PJ (2009) Empathy toward strangers triggers oxytocin release and subsequent generosity. *Ann NY Acad Sci* 1167:182–189
- Beadle JN, Sheehan AH, Dahlben B et al (2015) Aging, empathy, and prosociality. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci* 70:213–222
- Ben-Ami Bartal I, Shan H, Molasky NM et al (2016) Anxiolytic treatment impairs helping behavior in rats. *Front Psychol* 7:850
- Broniarczyk-Czarniak M, Szemraj J, Śmigielski J et al (2022) The role of OXT, OXTR, AVP, and AVPR1a gene expression in the course of schizophrenia. *Curr Issues Mol Biol* 44:336–349
- Carvalho J, Seara-Cardoso A, Mesquita AR et al (2019) Helping behavior in rats (*Rattus norvegicus*) when an escape alternative is present. *J Comp Psychol* 133:452–462
- Cavaliere DR, Maisonneuve S, Krahe TE et al (2020) High- and low-conditioned behavioral effects of midazolam in cariorca high- and low-conditioned freezing rats in an ethologically based test. *Neurosci Lett* 715:134632
- Chaouloff F, Durand M, Mormède P (1997) Anxiety- and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light/dark and dark/light tests. *Behav Brain Res* 85:27–35
- Corbani M, Marir R, Trueba M et al (2018) Neuroanatomical distribution and function of the vasopressin V1B receptor in the rat brain deciphered using specific fluorescent ligands. *Gen Comp Endocrinol* 258:15–32
- Davidson NB, Hurst JL (2019) Testing the potential of 50 kHz rat calls as a species-specific rat attractant. *PLoS ONE* 14:e0211601
- Duan Y, Wei J, Geng W et al (2019) The effect of short-term use of benzodiazepines on cognitive function of major depressive disorder patients being treated with antidepressants. *J Affect Disord* 256:1–7
- Ebner NC, Maura GM, MacDonald K et al (2013) Oxytocin and socioemotional aging: current knowledge and future trends. *Front Human Neurosci* 7:487
- Gimpl G, Fahrenholz F (2001) The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev* 81:629–683
- Glisky EL (2007) Changes in cognitive function in human aging. In: Riddle DR (ed) *Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms* (1st edn). CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton, p 18. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3885/>
- Gross JJ, Carstensen LL, Pasupathi M et al (1997) Emotion and aging: experience, expression, and control. *Psychol Aging* 12:590–599
- Hosgorler F, Koc B, Kizildag S et al (2020) Magnesium acetyl taurate prevents tissue damage and deterioration of prosocial behavior related with vasopressin levels in traumatic brain injured rats. *Turk Neurosurg* 30:723–733
- Hühnel I, Fölster M, Werheid K et al (2014) Empathic reactions of younger and older adults: no age related decline in affective responding. *J Exp Soc Psychol* 50:136–143
- Jung YH, Shin NY, Jang JH et al (2019) Relationships among stress, emotional intelligence, cognitive intelligence, and cytokines. *Medicine* 98:e15345
- Kandis S, Ates M, Kizildag S et al (2018) Acetaminophen (paracetamol) affects empathy-like behavior in rats: dose-response relationship. *Pharmacol Biochem Behav* 175:146–151
- Karakilic A, Kizildag S, Kandis S et al (2018) The effects of acute foot shock stress on empathy levels in rats. *Behav Brain Res* 349:31–36
- Katz DA, Locke C, Greco N et al (2017) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis and depression symptom effects of an arginine vasopressin type 1B receptor antagonist in a one-week randomized phase 1b trial. *Brain Behav* 7:e00628–e00628
- Knight LK, Stoica T, Fogleman ND et al (2019) Convergent neural correlates of empathy and anxiety during socioemotional processing. *Front Hum Neurosci* 13:94. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2019.00094>
- Knobloch HS, Charlet A, Hoffmann LC et al (2012) Evoked axonal oxytocin release in the central amygdala attenuates fear response. *Neuron* 73:553–566
- Kollmuss A, Agyeman J (2002) Mind the gap: why do people act environmentally and what are the barriers to pro-environmental behavior? *Environ Educ Res* 8:239–260
- Kosfeld M, Heinrichs M, Zak PJ et al (2005) Oxytocin increases trust in humans. *Nature* 435:673–676

- Lamm C, Batson CD, Decety J (2007) The neural substrate of human empathy: effects of perspective-taking and cognitive appraisal. *J Cogn Neurosci* 19:42–58
- Langer K, Hagedorn B, Stock L-M et al (2020) Acute stress improves the effectivity of cognitive emotion regulation in men. *Sci Rep* 10:11571
- Lee HJ, Macbeth AH, Pagani JH et al (2009) Oxytocin: the great facilitator of life. *Prog Neurobiol* 88:127–151
- Lomidze N, Zhvania MG, Tizabi Y et al (2020) Age-related behavioral and ultrastructural changes in the rat amygdala. *Dev Neurobiol* 80:433–442
- Miao Y-L, Guo W-Z, Shi W-Z et al (2014) Midazolam ameliorates the behavior deficits of a rat posttraumatic stress disorder model through dual 18 kDa translocator protein and central benzodiazepine receptor and neurosteroidogenesis. *PLoS ONE* 9:e101450–e101450
- Olkola KT, Ahonen J (2008) Midazolam and other benzodiazepines. In: Schüttler J, Schwilden H (eds) *Modern anesthetics*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 335–360
- Panksepp J (2010) Chapter 6.1 - Emotional causes and consequences of social-affective vocalization. In: Brudzynski SM (ed) *Handbook of behavioral neuroscience*. Elsevier, London, pp 201–208. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374593-4.00020-6>
- Pisansky MT, Hanson LR, Gottesman II et al (2017) Oxytocin enhances observational fear in mice. *Nat Commun* 8:2102
- Pitsikas N, Tarantilis PA (2020) The GABA(A)-benzodiazepine receptor antagonist flumazenil abolishes the anxiolytic effects of the active constituents of *Crocus sativus* L. crocins in rats. *Molecules* 25(23):5647. <https://doi.org/10.3390/molecules25235647>
- Porges SW (2003) Social engagement and attachment: a phylogenetic perspective. *Ann NY Acad Sci* 1008:31–47
- Potasiewicz A, Holuj M, Litwa E et al (2020) Social dysfunction in the neurodevelopmental model of schizophrenia in male and female rats: behavioural and biochemical studies. *Neuropharmacology* 170:108040
- Qi C, Roseboom PH, Nanda SA et al (2010) Anxiety-related behavioral inhibition in rats: a model to examine mechanisms underlying the risk to develop stress-related psychopathology. *Genes Brain Behav* 9:974–984
- Rodrigues-Alves PDSEB, Flório JC, Lebrun I et al (2009) Moxidectin interference on motor activity of rats %. *J Braz Arch Biol Technol* 52:883–891
- Ruffman T, Henry JD, Livingstone V et al (2008) A meta-analytic review of emotion recognition and aging: implications for neuropsychological models of aging. *Neurosci Biobehav Rev* 32:863–881
- Sato N, Tan L, Tate K et al (2015) Erratum to: Rats demonstrate helping behavior toward a soaked conspecific. *Anim Cogn* 18:1049
- Shepherd JK, Grewal SS, Fletcher A et al (1994) Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated “zero-maze” as an animal model of anxiety. *Psychopharmacology* 116:56–64
- Shoji H, Mizoguchi K (2011) Aging-related changes in the effects of social isolation on social behavior in rats. *Physiol Behav* 102:58–62
- Smith CJW, Poehlmann ML, Li S et al (2017) Age and sex differences in oxytocin and vasopressin V1a receptor binding densities in the rat brain: focus on the social decision-making network. *Brain Struct Funct* 222:981–1006
- Song C, Berridge KC, Kalueff AV (2016) ‘Stressing’ rodent self-grooming for neuroscience research. *Nat Rev Neurosci* 17:591–591
- Sotoudeh N, Namavar MR, Zarifkar A et al (2020) Age-dependent changes in the medial prefrontal cortex and medial amygdala structure, and elevated plus-maze performance in the healthy male Wistar rats. *IBRO Rep* 9:183–194
- Steimer T (2011) Animal models of anxiety disorders in rats and mice: some conceptual issues. *Dialogues Clin Neurosci* 13:495–506
- Thomson F, Napier S (2015) Arginine-vasopressin. In: Stolerman IP, Price LH (eds) *Encyclopedia of psychopharmacology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 195–202
- Uzefovsky F, Shalev I, Israel S et al (2015) Oxytocin receptor and vasopressin receptor 1a genes are respectively associated with emotional and cognitive empathy. *Horm Behav* 67:60–65
- Xia Y, Ye S, Shi J, Huang H (2018) Relationship between the anxious symptoms and the neurotransmitter in Parkinson's mice with different dosages of MPTP. *Braz Arch Biol Technol* 61:e18160721. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2018160721>
- Yuksel O, Ates M, Kizildag S, Yuce Z, Koc B, Kandis S, Guvendi G, Karakilic A, Gumus H, Uysal N (2019) Regular aerobic voluntary exercise increased oxytocin in female mice: cause to decrease anxiety and increase empathy-like behaviors. *Balkan Med J* 36(5):257–262. <https://doi.org/10.4274/balkanmedj.galenos.2019.2018.12.87>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

Already have a manuscript?

Use our Manuscript Matcher to find the best relevant journals!

[Find a Match](#)

Filters [Clear All](#)

- Web of Science Coverage
- Open Access
- Category
- Country / Region
- Language
- Frequency

Refine Your Search Results

[Search](#)

Sort By: Relevancy

Search Results

Found 270 results (Page 1) [Share These Results](#)

Exact Match Found

JOURNAL OF NUTRITION

Publisher: ELSEVIER SCIENCE INC, STE 800, 230 PARK AVE, NEW YORK, USA, NY, 10169

ISSN / eISSN: 0022-3166 / 1541-6100

Web of Science Core Collection: Science Citation Index Expanded

Additional Web of Science Indexes: Biological Abstracts | BIOSIS Previews | Current Contents Agriculture, Biology & Environmental Sciences | Current Contents Life Sciences | Essential Science Indicators

[Share This Journal](#)
[View profile page](#)

* Requires free login.

The Journal of Nutrition

The relationship between high or low polyphenol content extra virgin olive oil, and decreased anxiety and depression-like behaviors, and/or increased cognitive functions in adolescent rats may depend on blood lipids, and neuroinflammation.

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	The relationship between high or low polyphenol content extra virgin olive oil, and decreased anxiety and depression-like behaviors, and/or increased cognitive functions in adolescent rats may depend on blood lipids, and neuroinflammation.
Short Title:	The effects of extravirgin olive oil
Article Type:	Original Research Article
Section/Category:	Nutrition and Disease
Keywords:	high polyphenol extra virgin olive oil; TNF- α /IL-10 ratio; triglyceride; anxiety; cognitive function
Corresponding Author:	Rabia Iglın, Ph.D. Student Dokuz Eylul Universitesi Tıp Fakultesi İzmir, İzmir TURKEY
Corresponding Author's Institution:	Dokuz Eylul Universitesi Tıp Fakultesi
First Author:	Rabia Iglın, Ph.D. Student
Order of Authors:	Rabia Iglın, Ph.D. Student Guven Guvendi Asli Karakilic Ferda Hosgorler Basar Koc Sevim Kandis Servet Kizildag Mehmet Ates Nazan Uysal
Abstract:	Background and aim High polyphenol content extra virgin olive oil (HP-EVOO) has positive effects on cognitive functions and anxiety or depression, especially aged. However, the underlying mechanism of how HP-EVOO eases cognitive functions and depression or anxiety behaviors is not known exactly. In the current study, we compared the effects of high and low polyphenol content olive oils on blood lipids and neuroinflammation, cognitive functions, anxiety, and depression-like behaviors in adolescent rats. Methods 6-week male rats were fed with standard chow (SD) with HP-EVOO or LP-EVOO (n=8, 10gr HP-EVOO or LP-EVOO/ 100g SD) for 8 weeks. Neuroinflammation markers in the hippocampus (HC) and prefrontal cortex (PFC), and blood lipids were measured, and anxiety levels and cognitive functions were evaluated. Pearson correlation analysis was used. Results HP-EVOO decreased both triglyceride (TG) and LDL/HDL ratio while LP-EVOO decreased only TG levels in plasma. While TG levels were positively correlated with anxiety levels and negatively correlated with cognitive functions. HP-EVOO decreased

The Journal of Nutrition

The relationship between high or low polyphenol content extra virgin olive oil, and decreased anxiety and depression-like behaviors, and/or increased cognitive functions in adolescent rats may depend on blood lipids, and neuroinflammation.

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	The relationship between high or low polyphenol content extra virgin olive oil, and decreased anxiety and depression-like behaviors, and/or increased cognitive functions in adolescent rats may depend on blood lipids, and neuroinflammation.
Short Title:	The effects of extravirgin olive oil
Article Type:	Original Research Article
Section/Category:	Nutrition and Disease
Keywords:	high polyphenol extra virgin olive oil; TNF- α /IL-10 ratio; triglyceride; anxiety; cognitive function
Corresponding Author:	Rabia Ilgin, Ph.D. Student Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi Izmir, Izmir TURKEY
Corresponding Author's Institution:	Dokuz Eylul Universitesi Tip Fakultesi
First Author:	Rabia Ilgin, Ph.D. Student
Order of Authors:	Rabia Ilgin, Ph.D. Student Guvenc Guvendi Asli Karakilic Ferda Hosgorler Basar Koc Sevim Kandis Servet Kizildag Mehmet Ates Nazan Uysal
Abstract:	Background and aim High polyphenol content extra virgin olive oil (HP-EVOO) has positive effects on cognitive functions and anxiety or depression, especially aged. However, the underlying mechanism of how HP-EVOO eases cognitive functions and depression or anxiety behaviors is not known exactly. In the current study, we compared the effects of high and low polyphenol content olive oils on blood lipids and neuroinflammation, cognitive functions, anxiety, and depression-like behaviors in adolescent rats. Methods 6-week male rats were fed with standard chow (SD) with HP-EVOO or LP-EVOO (n=8, 10gr HP-EVOO or LP-EVOO/ 100g SD) for 8 weeks. Neuroinflammation markers in the hippocampus (HC) and prefrontal cortex (PFC), and blood lipids were measured, and anxiety levels and cognitive functions were evaluated. Pearson correlation analysis was used. Results HP-EVOO decreased both triglyceride (TG) and LDL/HDL ratio while LP-EVOO decreased only TG levels in plasma. While TG levels were positively correlated with anxiety levels and negatively correlated with cognitive functions. HP-EVOO decreased

necessary for our understanding of the mechanisms by which HP-EVOO or LP-EVOO influences brain inflammation, behavior, and cognitive functions. Therefore, we believe that the findings presented in our paper will appeal to the nutritional cognitive neuroscience and behavioral scientists who subscribe to "The Journal of Nutrition".

Sincerely,

Rabia Ilgin

Corresponding author at: Rabia Ilgin

Dokuz Eylül University, Department of Physiology, School of Medicine, Graduate

School of Health Sciences, Izmir, Turkey, e-mail address: rabia.ilgin@ogr.deu.edu.tr

[Click here to view linked References](#)

The relationship between high or low polyphenol content extra virgin olive oil, and decreased anxiety and depression-like behaviors, and/or increased cognitive functions in adolescent rats may depend on blood lipids, and neuroinflammation.

Rabia Ilgin^{a,b*}, Guven Guvendi^b, Asli Karakilic^c, Ferda Hosgorler^b, Basar Koc^b, Sevim Kandis^b, Servet Kizildag^d, Mehmet Ates^d, Nazan Uysal^b

^aDepartment of Physiology, Graduate School of Health Sciences, Dokuz Eylul University, Izmir, Turkey.

^bDepartment of Physiology, School of Medicine, Dokuz Eylul University, Izmir, Turkey.

^cDepartment of Physiology, School of Medicine, Balikesir University, Balikesir, Turkey.

^dCollege of Vocational School of Health Services, School of Medicine, Dokuz Eylul University, Izmir, Turkey.

*Correspondence to: Department of Physiology, School of Medicine, Dokuz Eylul University, Balcova, Izmir, Turkey, rabia.ilgin@ogr.deu.edu.tr (R. Ilgin)

E-mail addresses: guvendi@yandex.com (G. Guvendi), asli.karakilic@balikesir.edu.tr (A. Karakilic), ferda.hosgorler@deu.edu.tr (F. Hosgorler), basar.koc@deu.edu.tr (B. Koc), sevim.kandis@gmail.com (S. Kandis), servet.kizildag@deu.edu.tr (S. Kizildag), m.ates@deu.edu.tr (M. Ates), nazan.uysal@deu.edu.tr (N. Uysal)

Introduction

Behavior and cognitive functions are significantly changed in adolescence. In addition to this, exposure to neuroinflammation during the brain developmental process of adolescence may affect negatively behavior and cognitive functions [1-3]. The brain undergoes development that is supported by the ongoing maturation of the prefrontal cortex (PFC) and hippocampus (HC), which are involved in the regulation of behavior and cognitive functions in adolescence [3]. Inflammation and cytokines are involved in both cognitive dysfunction and depression behavior. Therefore, pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis- α (TNF- α) factors impair hippocampal memory [4, 5]. In addition to this, pro-inflammatory cytokines cause depression-like behaviors in rodents [6, 7]. Otherwise, anti-inflammatory cytokines such as interleukin-10 (IL-10) decrease the negative effects of cytokines on cognitive functions [8].

Dietary guidelines lay emphasis on the importance of plant-based diets for a healthy life [9]. The mediterranean diet (MD) includes a plant-based diet and the use of high amounts of olive and olive oil [10]. As reported by a great number of studies published over the past decades, most of the beneficial effects of MD on human healthy can be attributed to extra virgin olive oil HP-EVOO that includes monosaturated and polysaturated fatty acids and polyphenols [11-13]. A polyphenol can produce most of the different active metabolites. It reacts with different cellular structures and molecular pathways due to its chemical structure [14, 15]. Actually, the consumption of olive oil can reduce lipid and DNA oxidation, recover insulin-resistance and blood lipid profile, and inflammation [16-18].

HP-EVOO is one of the most important components of MD [19]. HP-EVOO has been used in the prevention and treatment of diseases for centuries. HP-EVOO is olive oil, which is obtained from olives by mechanical and physical preparation under conditions that do not alter its natural composition. Another olive oil is Riviera olive oil (LP-EVOO) that is obtained by refining olive oil [20]. Olive oil that can not be consumed directly and processed into as refined olive oil. The process of refining may cause it to the removal of its aroma and resin and decrease the free acidity level under 0.3%. This type of olive oil is called refined olive oil. Although unwanted properties are removed, the olive oil lost its specific aroma during the refining process. LP-EVOO is a mixture of extra virgin olive oil and refined olive oil that may change the ratios. However, LP-EVOO is also known as cooking-type olive oil due to be more suitable for frying. Therefore, LP-EVOO may be consumed more than HP-EVOO. Moreover, HP-EVOO contains a more phenol content than refined virgin olive oil or LP-EVOO [21]. Polyphenol levels of LP-EVOO or refined olive oils are approximately 5 times lower than HP-

EVOO obtained using only mechanical extraction methods [20]. Although it is thought that HP-EVOO may have more positive effects than LP-EVOO by using its higher polyphenol content, there is no information in the literature about the effect of this difference. There are limited publications on the main effects of polyphenols and peripheral effects. Studies have shown that HP-EVOO has beneficial effects on memory and learning, anxiety, and depression behaviors, especially aged [22, 23]. However, the effects of both HP-EVOO and LP-EVOO are not completely known, particularly in adolescence. This study compares the effects of HP-EVOO and LP-EVOO on blood lipids and also TNF- α and IL-10 levels, which were related to inflammation in the hippocampus and prefrontal cortex, which are associated with memory and learning, anxiety, and depression-like behaviors in adolescent rats.

2. Materials and methods

2.1 Experimental desing

Six-week-old male Sprague-Dawley rats were housed under constant temperature (22 ± 1 °C) and humidity (60%) on a 12 h-light/12 h-dark cycle. They were with *ad libitum* access to water and food during all parts of the experiment. The animal procedures were approved by Dokuz Eylul University of School of Medicine Animal Care Commity (20/2017).

The rats were divided into two groups as extra virgin olive oil HP-EVOO and riviera olive oil (LP-EVOO) ($n=8$ for each groups). The rats were fed a standard chow diet (SD), which is composed of is composed of 13% fat, 25% protein, and 62% carbohydrate, for eight weeks. Turkey Memecik olives were used for olive oil production (Cardiolive, Turgut Anadolu Yatırım). HP-EVOO at a dose of 775 mg/kg (polyphenol content) and LP-EVOO at a dose of 120 mg/kg (polyphenol content) was added to the chow. (10gr HP-EVOO or LP-EVOO/ 100g SD). The rats were weighed one time in every week With the feeding procedure, each rat completed learning and memory and anxiety and depression behaviors tests (Morris Water Maze (MWM), elevated plus maze (EPM), open field test (OFT), and forced swim test (FST)). At the end of the behavior tests, blood samples were collected and the rats were sacrificed via cardiac puncture under carbon dioxide (CO₂) anesthesia for biochemical measurements. Brain tissues were removed and dissected the hippocampus (HC) and the prefrontal cortex (PFC).

2.2 Biochemical measurements of the brain regions (HC and PFC) and the blood plasma

Blood and brain tissue samples were stored at -80°C until analysis. Triglyceride (TG), total cholesterol (TC), HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST) analyses were performed using an autoanalyzer (Beckman Coulter AU680). Total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, and TG were expressed as mg/dL, and ALT and AST were expressed as U/L.

The levels of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin-10 (IL-10) in HC and PFC were measured using commercial ELISA kits according to the manufacturer's instructions (Bioassay Technology Laboratory, Shanghai, China).

2.3 Behavioral tests

2.3.1 Morris water maze (MWM)

The MWM is a pool (75-cm height and 140-cm diameter) filled with water up to 50 cm. It has a hidden platform, which was placed one cm below the surface. Each rat was tested in MWM for four days and also tested on the fifth day for the probe trial, consecutively. The hidden platform was pulled out. The experimental design was similar to our previous investigations. Behavioral data that the latency period to find the platform and time spent in the opposite and the target quadrants were evaluated using the Noldus Ethovision video tracking system [24].

2.3.2. Open field test (OFT)

The open field test is generally useful for evaluating of anxiety-like behavior and locomotor activity in rodents [25]. The open field is composed of a $1 \times 1\text{-m}$ area surrounded by a wall 50 cm in height. Each rat was placed in the middle of the OFT and then the movement of the rat was recorded with a video camera that was installed 2,5 m above the open field apparatus for 5 min in a soundproof area. In the OFT, the time spent in different parts of the open field and the distance moved by the rats were recorded and measured.

2.3.3. The elevated plus maze (EPM)

The elevated plus maze test (EPM) was used to evaluate anxiety-like behavior in rats [26]. EPM that composed of a central area (5 cm $\times$ 5 cm), two open arms (50 cm long, 10 cm wide and 0,5 cm high borders) and two closed arms (50 cm long, 10 cm wide with 40 cm high walls), each elevated 50 cm above the base. Mice were placed on the middle of the EPM and the area facing the open arm, and then the movement of rats was recorded with a video camera for 5 min. The time spent in the open and the closed arms and the number of entries into the open

and the closed arms were evaluated. An increase in the time spent in the open arms of the EPM was evaluated as decreased anxiety.

2.3.4. Forced swim test (FST)

The forced swimming test (FST), known as the Porsolt test, was useful for evaluating the depression-like behavior in rodents [26]. Rats were placed individually into glass cylinders (height 25 cm, diameter 10 cm), which filled with 10 cm water and stayed there for 6 min. Both the immobility and mobility times of the rats in FST were measured. An increase in the immobility time or a decrease in the mobility time was evaluated as a depressive-like state.

2.4 Statistical analysis

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 9.0.0. The differences in learning days between the experimental groups in the MWM test were evaluated using One-way ANOVA- repeated measure. Two-way ANOVA and post hoc Bonferroni were performed to compare the differences in biochemical measurements between the groups. Pearson correlation analysis was used. Data are demonstrated as mean $\pm$ S.E.M.; $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. The effects of HP-EVOO and LP-EVOO feeding on the body weight

All groups gradually gained weight during eight weeks. Additionally, the results showed that there were no significant differences between the weight of the groups (Fig. 1.).

3.2. Behavioral measurements

The results of MWM showed that the mean latency to find the platform decreased gradually for all rats. Although the results were not significant statistically, the time to find the platform for four days decreased in the HP-EVOO and LP-EVOO groups compared to the control group ($p > 0.05$) (Fig. 2. A.1). In addition to this, the time spent in both the target and opposite quadrants in the probe trial for all rats was evaluated. While the time spent in the target quadrant significantly increased in the HP-EVOO groups compared to the control group ($p < 0.01$), the time spent in the opposite quadrant significantly decreased in the HP-EVOO group compared to the control group ($p < 0.05$). There was not a significant difference between HP-EVOO and LP-EVOO in terms of time spent in both opposite and target quadrants ($p > 0.05$) (Fig. 2. A.2.).

The results of OFT showed that there was not significant between the groups in time spent in the middle area ($p>0.05$). However, the time spent in the periphery walls of the open field arena decreased in both the HP-EVOO and LP-EVOO compared with the control group ($p<0.01$ for both of them) (Fig. 3.B.1).

The results of EPM demonstrated that the time spent in the open arms increased significantly in HP-EVOO compared to the control group ($p<0.05$), while there was no significant difference between the HP-EVOO and LP-EVOO groups ($p>0.05$). In addition to this, the time spent in the closed arms decreased in the HP-EVOO and LP-EVOO groups compared with the control group ($p<0.01$ for both of them) (Fig. 3.B.2). There was no significant difference between any groups in terms of immobility duration in FST (Fig.3.B.3).

3.3. Biochemical measurements of blood plasma and brain regions

TG levels of the HP-EVOO and LP-EVOO groups were significantly decreased compared with the control group ($p<0.001$ for both). However, TG levels were not significant statistically between the HP-EVOO and LP-EVOO groups. There were no significant differences between any groups in terms of TC level. LDL/HDL ratio in the HP-EVOO groups significantly reduced compared to the control ($p<0.05$); however, there were no significant differences compared within the HP-EVOO and LP-EVOO groups. There were no significant differences in ALT and AST levels between the experimental groups and control (Table 1.).

Neuroinflammation in the hippocampus (HC) and prefrontal cortex (PFC) was evaluated as TNF- α /IL-10 ratio in this study. TNF- α /IL-10 ratio was significantly decreased in the HC of the HP-EVOO group compared with the LP-EVOO and control groups ($p<0.01$ for control and $p<0.05$ for LP-EVOO). Interestingly, TNF- α /IL-10 ratio in the PFC of both HP-EVOO and LP-EVOO groups decreased compared with the control group ($p<0.05$ for both of them) (Fig. 4.).

3.4. Correlation analysis

A strong negative correlation was found between TG levels and the time spent on the open arms of EPM (Fig. 5. A) ($r=-0.84$, $p<0.01$). There was a moderate positive correlation between TG levels and both the time spent in the closed arms of EPM and the time spent in the periphery walls of OFT ($r=0.48$, $p<0.05$ and $r=0.58$, $p<0.01$, respectively) (Fig. 5.B and 5. C). A moderate negative correlation was found between TG levels and time spent in the target

quadrant in the probe trial in the MWM ($r = -0.60$, $p < 0.01$) (Fig. 5. D). Addition, TG levels were positively correlated with TNF- α /IL-10 ratio in PFC ($r = 0.64$, $p < 0.01$) (Fig. 5. E).

TNF- α /IL-10 ratio in both HC and PFC was a moderate negatively correlated with the time spent on the open arms of EPM ($r = -0.73$, $p < 0.01$ (for HC) and $r = -0.57$, $p < 0.01$ (for PFC)) (Fig. 5. F and 5. G). However, TNF- α /IL-10 ratio in HC was a moderate positively correlated with the time spent in the periphery walls of OFT ($r = 0.60$, $p < 0.01$) (Fig. 5. H). TNF- α /IL-10 ratio in HC was a weak positively correlated with TG levels, although the correlation was not statistically significant ($r = 0.434$, $p > 0.05$) (Fig. 5. I).

4. Discussion

In this study, we investigated the effects of HP-EVOO and LP-EVOO on learning and spatial memory, anxiety, and depression-like behaviors in adolescence. In addition to this, we investigated the effects of HP-EVOO and LP-EVOO changes inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-10 in the prefrontal cortex (PFC) and hippocampus (HC) of adolescent male rats. Moreover, we assessed the effects of HP-EVOO and LP-EVOO on triglyceride (TG), total cholesterol (TC), HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST).

In the literature, it is well-known the positive effects of HP-EVOO on learning and memory functions. In the current study, we used to evaluate learning and spatial memory via the Morris water maze (MWM). The results of MWM showed that the mean latency to find the platform decreased progressively for four days in all groups. The mean latency to find the platform in the HP-EVOO group decreased compared with the other groups in the first and second days, although the differences were not statistically significant. Therefore, HP-EVOO or LP-EVOO consumption may decrease the learning duration. In addition to this, we showed that the time spent in the opposite quadrant of MWM decreased in the HP-EVOO group compared to the control group, while there was no significant difference between the HP-EVOO and LP-EVOO groups. Moreover, the time spent in the target quadrant in the MWM increased in the HP-EVOO group compared to the control. Although, no significant difference was found between the HP-EVOO and LP-EVOO groups, the HP-EVOO group found less time than LP-EVOO in the opposite quadrant, and there was no considerable difference between the LP-EVOO and control. However, we found that HP-EVOO had a more positive effect than LP-EVOO in terms of learning and memory. Similar to our results, Luceri et al. showed that HP-EVOO rich in phenols improved spatial memory and learning in MWM in both aged and young

mice [27]. In addition to this, Cheema MAR et al. demonstrated that the oral administration of 0.1 ml/kg HP-EVOO improved cognitive performance in MWM and they suggested that the long term of HP-EVOO increases cognitive functions [28]. However, the effects of LP-EVOO on memory were not as significant as the HP-EVOO, and the results of MWM showed that HP-EVOO consumption may improve spatial memory in our study.

We also evaluated the effects of HP-EVOO and LP-EVOO on anxiety and depression-like behaviors. In OFT, we showed that there was not significant between the groups in the time spent in the middle area of OFT, whereas HP-EVOO decreased in the time spent in the periphery walls of OFT compared with the control; however, there was not a significant between LP-EVOO and HP-EVOO. In addition to this, the LP-EVOO decreased in the time spent in the periphery walls of OFT compared to control, while the difference between the HP-EVOO and LP-EVOO was insignificant statistically in the time spent in the periphery walls of OFT. Similarly, one study has reported that the HP-EVOO total phenolic content made a significant treatment effect for center entries in OFT and low or high dose of the HP-EVOO by intraperitoneally administration increased anxiolytic-like effect [29]. Furthermore, we used an elevated plus maze (EPM) for evaluating of anxiety levels. Some studies have suggested that an increase in the time spent on the open arms in EPM following long-term administration of HP-EVOO or olive oil that HP-EVOO has an anxiolytic effect [28, 30]. However, the effects of the LP-EVOO on anxiety behavior are not known clearly, In accordance with the literature, we demonstrated that the time spent on open arms of EPM increased in both the HP-EVOO and LP-EVOO groups compared with the control. However, no difference was found between the HP-EVOO and LP-EVOO groups. On the other hand, we found that the time spent in the closed arms of EPM decreased in both the HP-EVOO and LP-EVOO groups when compared with the control group. We suggest that both the HP-EVOO and LP-EVOO decreased anxiety-like behavior in rats. One study has indicated that repeated administration of HP-EVOO diminishes depression behavior because of decreased the levels of brain 5-HT (5-hydroxytryptamine), 5-HIAA (5-hydroxyindoleacetic acid), and levels of DA (dopamine); these findings suggest that HP-EVOO decreases behavioral impairment by changing 5-HT and DA metabolism [30]. Therefore, HP-EVOO could be used as a therapeutic substance for treating depression and anxiety behaviors. In this study, the FST was used to evaluate the potential effects of HP-EVOO and LP-EVOO consumption on depression-like behavior. The immobility time spent in the FST was not a significantly different between the HP-EVOO, LP-EVOO, or control. We observed that neither HP-EVOO nor LP-EVOO had effects on depression-like behaviors because of our

findings. Therefore, further research is necessary for the effects of both the HP-EVOO and LP-EVOO on some brain regions related to depression or anxiety-like behavior amygdala, PFC, striatum, or hippocampus.

In this study, we investigated the effects of HP-EVOO and LP-EVOO on blood biomarkers such as triglyceride (TG), total cholesterol (TC), AST, and ALT levels and LDL/HDL ratio. We found that TG levels decreased in both the HP-EVOO and LP-EVOO groups compared to the control. The LDL/HDL ratio of HP-EVOO rats decreased in comparison to the control. In addition to this, there was an insignificant difference between the LDL/HDL ratio of HP-EVOO and LP-EVOO. Santangelo et al. showed that LDL/HDL ratio in patients with type 2 diabetes mellitus was not significantly different between HP-EVOO and LP-EVOO [31]. TC level increased in the HP-EVOO and LP-EVOO compared with the control, although the differences were not significant statistically. That's why, HP-EVOO or LP-EVOO might increase the HDL level and decrease and/or does not change the LDL level. Similar to our results, Mousavi et al. reported that a diet with low or high dose containing HP-EVOO decreased the levels of both TG and TC in eight weeks old female C57BL/6 mice, suggesting that HP-EVOO improves lipid profiles [32]. ALT and AST were used as hepatic damage markers. ALT levels decreased in the HP-EVOO and LP-EVOO groups, while AST levels increased in HP-EVOO compared with the LP-EVOO and control groups. However, these differences in ALT and AST levels were insignificant between all groups. In contrast to our results, Santangelo indicated that HP-EVOO reduced ALT and AST levels in blood plasma in patients with type 2 diabetes mellitus compared with the LP-EVOO [31].

In this study, we investigated how the HP-EVOO and LP-EVOO affect pro-inflammatory (TNF- α) and anti-inflammatory cytokines (IL-10) in brain regions such as PFC and HC, which are associated with anxiety, depression, or cognitive functions. TNF- α has been associated with the deficiency of memory and plasticity. In particular, overexpression of TNF α in neurons or glial cells decreases memory, synaptic plasticity, and cerebellar learning [33]. It is well-known that pro-inflammatory cytokines may lead to change hippocampal learning and the decrease in the levels of pro-inflammatory cytokines in the hippocampus were found to improve learning, while the increase in the levels of pro-inflammatory cytokines (such as IL-1 β and TNF- α) may cause to impair memory [33]. We observed that TNF- α levels in the HC of the HP-EVOO group decreased compared to the LP-EVOO and control, while IL-10 levels of HC increased in both the HP-EVOO and LP-EVOO groups compared to the control. However, there was no significant difference in TNF- α levels in PFC between all group while IL-10 levels

of PFC in the HP-EVOO group increased compared to both the LP-EVOO and control. In addition to these findings, we evaluated the effects of HP-EVOO and LP-EVOO on TNF- α /IL-10 ratio in PFC and HC. We found that HP-EVOO decreased TNF- α /IL-10 ratio in both PFC and HC compared to control groups. Interestingly, HP-EVOO decreased this ratio in HC compared to LP-EVOO however both the HP-EVOO and LP-EVOO decreased TNF- α /IL-10 ratio in PFC compared to the control. These findings suggest that HP-EVOO reduces inflammation in both PFC and HC that improves learning and spatial memory in line with the results of MWM, as well as decreases anxiety-like behaviors in the EPM and OFT. However, the decrease in TNF- α /IL-10 ratio in the PFC of the LP-EVOO group may reduce the anxiety levels in the EPM and OFT. The limitations of our study are that we evaluated only two cytokines (TNF- α and IL-10) in two brain regions, and could have evaluated anxiety and memory impairment in stress rat models instead of natural anxiety behaviour of adolescent rodents. Therefore, further research is needed to investigate more pro- and anti-inflammatory cytokines that evaluate the effects of LP-EVOO and HP-EVOO in terms of anxiety-like behaviors in adolescent stress rat models

We found that both TNF- α /IL-10 ratio in PFC and HC and TG levels were negatively correlated with the time spent on the open arms of EPM, while TG levels were positively correlated with the time spent in the closed arms of EPM. However, there was a positive correlation between TG levels and the time spent in the periphery walls in OFT. Similarly, we indicated that TNF- α /IL-10 ratio in HC was positively correlated with the time spent in the periphery walls in OFT. We observed that there was a positive correlation between TNF- α /IL-10 ratio in PFC and HC and TG levels. Therefore, these findings showed that both HP-EVOO and LP-EVOO consumption decreased anxiety-like behavior because of the decrease in TG levels and TNF- α /IL-10 ratio in PFC in adolescence rats. Finally, we also found that the time spent in the target quadrant in the MWM was negatively correlated with TG levels. Our findings showed that HP-EVOO improved learning and memory because of decreasing of TG levels. Although LP-EVOO improved learning and memory, HP-EVOO was more effective than LP-EVOO for memory because of decreasing TG levels and TNF- α /IL-10 ratio in HC.

5. Conclusion

In conclusion, the current study demonstrated that both HP-EVOO and LP-EVOO decrease anxiety levels but not depression in adolescent rats. The administration of HP-EVOO and LP-EVOO decreases both TNF- α /IL-10 ratio in PFC and TG levels in plasma. The decrease in anxiety levels is associated with a decrease in TG levels and TNF- α /IL-10 ratio in both the

HC and PFC following HP-EVOO and LP-EVOO administration. Additionally, we found that HP-EVOO improved memory than LP-EVOO, and the increase in memory functions was related to the decrease in TG levels in blood serum and TNF- α /IL-10 ratio in HC. Further research is necessary for elucidating the exact inflammation mechanism by which the HP-EVOO and LP-EVOO on anxiety, depression, and cognitive functions, especially to use more inflammatory cytokines. Furthermore, the polyphenols of olive oil may be used to investigate on anxiety and memory impairment in adolescent rat models.

Acknowledgments

This work was supported financially by Dokuz Eylul University Scientific Research Projects Commission (Research Fund Grant TDK-2022-2753). The funding source was not involved in the study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report, and in the decision to submit the article for publication.

Author contribution

N.U., M.A. and R.I. conceived the original idea, designed, and supervised the experiments, analysis and writing. R.I., B.K., G.G., A.K. designed and performed experiment, and supervised the writing. S.Kizildag, B.K., S.Kandis, A.K., G.G., R.I. performed behavioral tests, and biochemical analysis. F.H., M.A., N.U., R.I., B.K., G.G., S.Kandis, A.K. worked at animal sacrifice. R.I., G.G. collected the data. R.I. and N.U. performed the statistical analysis. R.I. and M.A. wrote the manuscript, all authors read, and approved the final draft submitted.

Conflicts of interest

All authors declare that there are no actual or potential conflicts of interest from this study. This study described has not been submitted for publication elsewhere, and all authors have approved the manuscript.

References

1. Yahfoufi, N., C. Matar, and N. Ismail, Adolescence and Aging: Impact of Adolescence Inflammatory Stress and Microbiota Alterations on Brain Development, Aging, and Neurodegeneration. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2020. 75(7): p. 1251-1257.
2. Steinberg, L., Cognitive and affective development in adolescence. *Trends Cogn Sci*, 2005. 9(2): p. 69-74.

3. Lowe, C.J., J.B. Morton, and A.C. Reichelt, Adolescent obesity and dietary decision making-a brain-health perspective. *Lancet Child Adolesc Health*, 2020. 4(5): p. 388-396.
4. Marin, I. and J. Kipnis, Learning and memory and the immune system. *Learn Mem*, 2013. 20(10): p. 601-6.
5. Yirmiya, R. and I. Goshen, Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav Immun*, 2011. 25(2): p. 181-213.
6. Dantzer, R., et al., From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci*, 2008. 9(1): p. 46-56.
7. Raison, C.L., L. Capuron, and A.H. Miller, Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol*, 2006. 27(1): p. 24-31.
8. Richwine, A.F., et al., Cognitive deficits in interleukin-10-deficient mice after peripheral injection of lipopolysaccharide. *Brain Behav Immun*, 2009. 23(6): p. 794-802.
9. Macready, A.L., et al., Flavonoid-rich fruit and vegetables improve microvascular reactivity and inflammatory status in men at risk of cardiovascular disease--FLAVURS: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*, 2014. 99(3): p. 479-89.
10. Babio, N., et al., Mediterranean diets and metabolic syndrome status in the PREDIMED randomized trial. *CMAJ*, 2014. 186(17): p. E649-57.
11. Martinez-Gonzalez, M.A., et al., Benefits of the Mediterranean Diet: Insights From the PREDIMED Study. *Prog Cardiovasc Dis*, 2015. 58(1): p. 50-60.
12. Bravo, L., Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*, 1998. 56(11): p. 317-33.
13. Trichopoulou, A., C. Bamia, and D. Trichopoulos, Anatomy of health effects of Mediterranean diet: Greek EPIC prospective cohort study. *BMJ*, 2009. 338: p. b2337.
14. Bahadoran, Z., P. Mirmiran, and F. Azizi, Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. *J Diabetes Metab Disord*, 2013. 12(1): p. 43.
15. Lancon, A., J.J. Michaille, and N. Latruffe, Effects of dietary phytochemicals on the expression of microRNAs involved in mammalian cell homeostasis. *J Sci Food Agric*, 2013. 93(13): p. 3155-64.

16. Fabiani, R., et al., Oxidative DNA damage is prevented by extracts of olive oil, hydroxytyrosol, and other olive phenolic compounds in human blood mononuclear cells and HL60 cells. *J Nutr*, 2008. 138(8): p. 1411-6.
17. Foshati, S., A. Ghanizadeh, and M. Akhlaghi, The effect of extra virgin olive oil on anthropometric indices, lipid profile, and markers of oxidative stress and inflammation in patients with depression, a double-blind randomised controlled trial. *Int J Clin Pract*, 2021. 75(7): p. e14254.
18. Lama, A., et al., Polyphenol-rich virgin olive oil reduces insulin resistance and liver inflammation and improves mitochondrial dysfunction in high-fat diet fed rats. *Mol Nutr Food Res*, 2017. 61(3).
19. Mirabelli, M., et al., Mediterranean Diet Nutrients to Turn the Tide against Insulin Resistance and Related Diseases. *Nutrients*, 2020. 12(4).
20. Aparicio-Soto, M., et al., Extra virgin olive oil: a key functional food for prevention of immune-inflammatory diseases. *Food Funct*, 2016. 7(11): p. 4492-4505.
21. Tuck, K.L. and P.J. Hayball, Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *J Nutr Biochem*, 2002. 13(11): p. 636-644.
22. Pitozzi, V., et al., Long-term dietary extra-virgin olive oil rich in polyphenols reverses age-related dysfunctions in motor coordination and contextual memory in mice: role of oxidative stress. *Rejuvenation Res*, 2012. 15(6): p. 601-12.
23. Pitozzi, V., et al., Effects of dietary extra-virgin olive oil on behaviour and brain biochemical parameters in ageing rats. *Br J Nutr*, 2010. 103(11): p. 1674-83.
24. Karakilic, A., et al., Regular aerobic exercise increased VEGF levels in both soleus and gastrocnemius muscles correlated with hippocampal learning and VEGF levels. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 2021. 81(1): p. 1-9.
25. Seibenhener, M.L. and M.C. Wooten, Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp*, 2015(96): p. e52434.
26. Gumus, H., et al., A combination of ketogenic diet and voluntary exercise ameliorates anxiety and depression-like behaviors in Balb/c mice. *Neurosci Lett*, 2022. 770: p. 136443.

27. Luceri, C., et al., A nutrigenomics approach for the study of anti-aging interventions: olive oil phenols and the modulation of gene and microRNA expression profiles in mouse brain. *Eur J Nutr*, 2017. 56(2): p. 865-877.
28. Cheema, M.A.R., et al., Neurochemical and behavioral effects of *Nigella sativa* and *Olea europaea* oil in rats. *Nutr Neurosci*, 2018. 21(3): p. 185-194.
29. Kokras, N., et al., Behavioral and Neurochemical Effects of Extra Virgin Olive Oil Total Phenolic Content and Sideritis Extract in Female Mice. *Molecules*, 2020. 25(21).
30. Perveen, T., et al., Role of monoaminergic system in the etiology of olive oil induced antidepressant and anxiolytic effects in rats. *ISRN Pharmacol*, 2013. 2013: p. 615685.
31. Santangelo, C., et al., Consumption of extra-virgin olive oil rich in phenolic compounds improves metabolic control in patients with type 2 diabetes mellitus: a possible involvement of reduced levels of circulating visfatin. *J Endocrinol Invest*, 2016. 39(11): p. 1295-1301.
32. Mousavi, S.N., et al., Effects of Maternal Isocaloric Diet Containing Different Amounts of Soy Oil and Extra Virgin Olive Oil on Weight, Serum Glucose, and Lipid Profile of Female Mice Offspring. *Iran J Med Sci*, 2017. 42(2): p. 161-169.
33. Donzis, E.J. and N.C. Tronson, Modulation of learning and memory by cytokines: signaling mechanisms and long term consequences. *Neurobiol Learn Mem*, 2014. 115: p. 68-77.

Figures and Tables

Table 1.: The effects of HP-EVOO and LP-EVOO on biochemical markers of blood plasma					
Parameters	TG (mg/dl)	TC (mg/dl)	LDL/HDL ratio	ALT(U/L)	AST (U/L)
HP-EVOO	43.09±4.34**	79.83±3.70	0.26±0.03*	38.19±5.18	136.48±11.65
LP-EVOO	44.52±4.14**	83.60±5.12	0.31±0.06	37.73±4.62	111.79±3.41
CoN	86.31±3.72	66.00±6.53	0.34±0.01	51.10±1.50	111.88±4.59
Values are shown as means ± SEM, HDL, high density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; ALT, alanine transaminase; TC, total cholesterol; TG, triglyceride. Significant differences are shown by *p<0.05 and **p<0.01 vs control group; #p<0.05 and ##p<0.01 vs LP-EVOO group.					

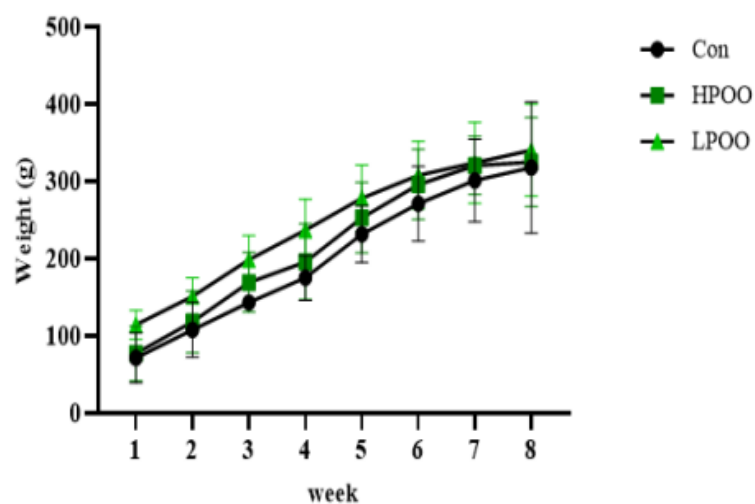


Fig.1. The effects of 8-week feeding with HP-EVOO and LP-EVOO on body weight in adolescent rats (Significant differences are presented by * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$). (n = 6–8 for each group).

A.1

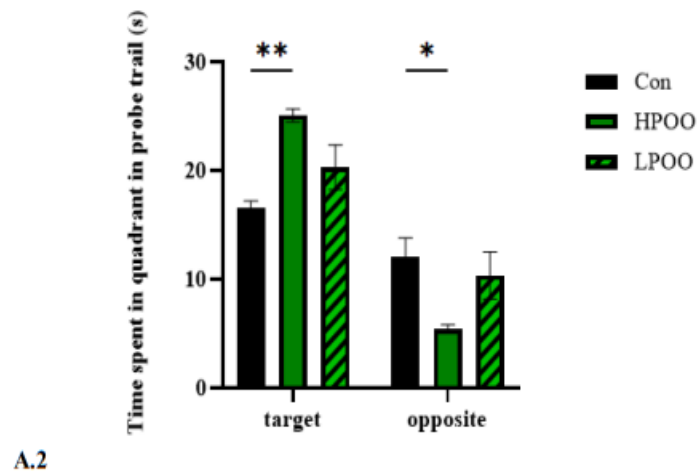
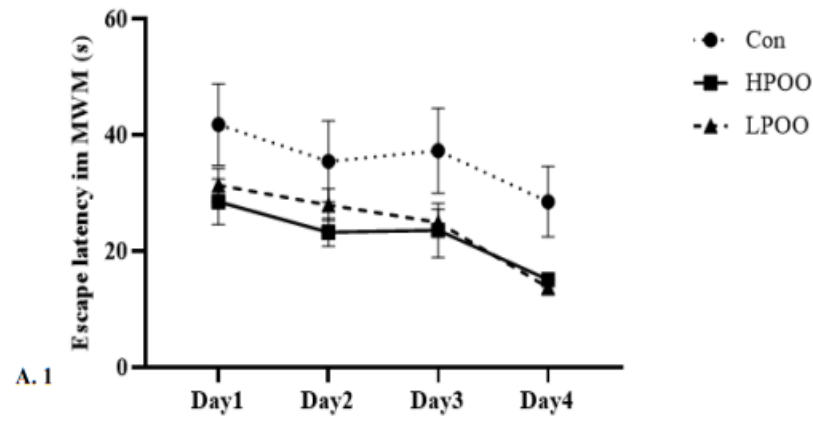
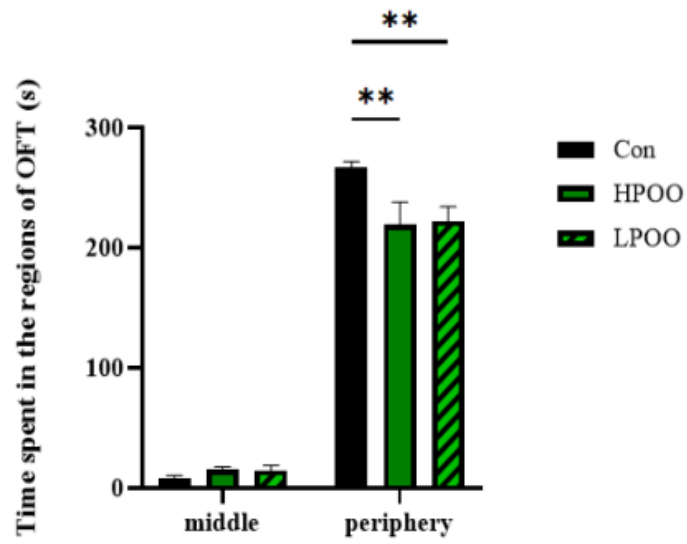
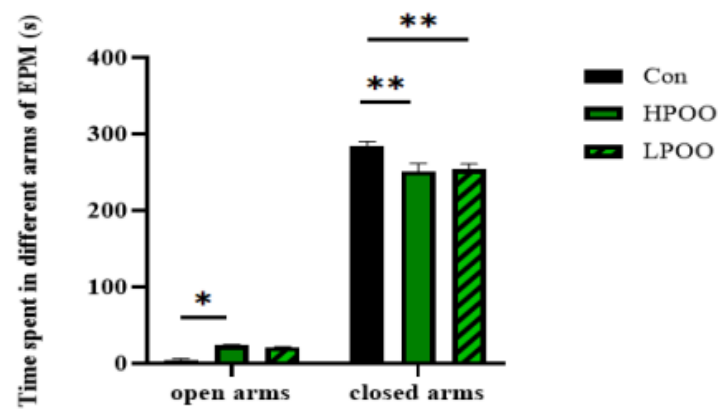


Fig.2. The effects of HP-EVOO and LP-EVOO on learning and memory task. (A.1) Latency period to find the platform during four consecutive training days. **(A.2)** Time spent in target and opposite quadrants in the probe trial. (Significant differences are presented by * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$). ($n = 6-8$ for each group).



B. 1



B. 2

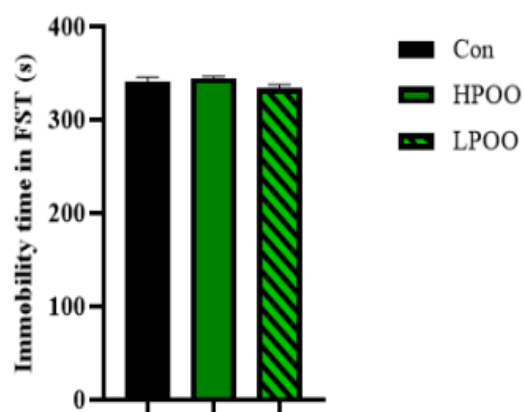


Fig. 3.: Behavioral test results. *Open field test (OFT) results; (B.1)* The effects of HP-EVOO and LP-EVOO on time spent in the middle and the periphery walls of OFT . ***Elevated plus maze (EPM) results; (B.2)*** The effects of HP-EVOO and LP-EVOO on time spent in the open and closed arms of EPM. ***Forced swim test results (FST); (B.3)*** The effects of HP-EVOO and LP-EVOO on immobility time in FST. (Significant differences are presented by * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$). (n = 6–8 for each group).

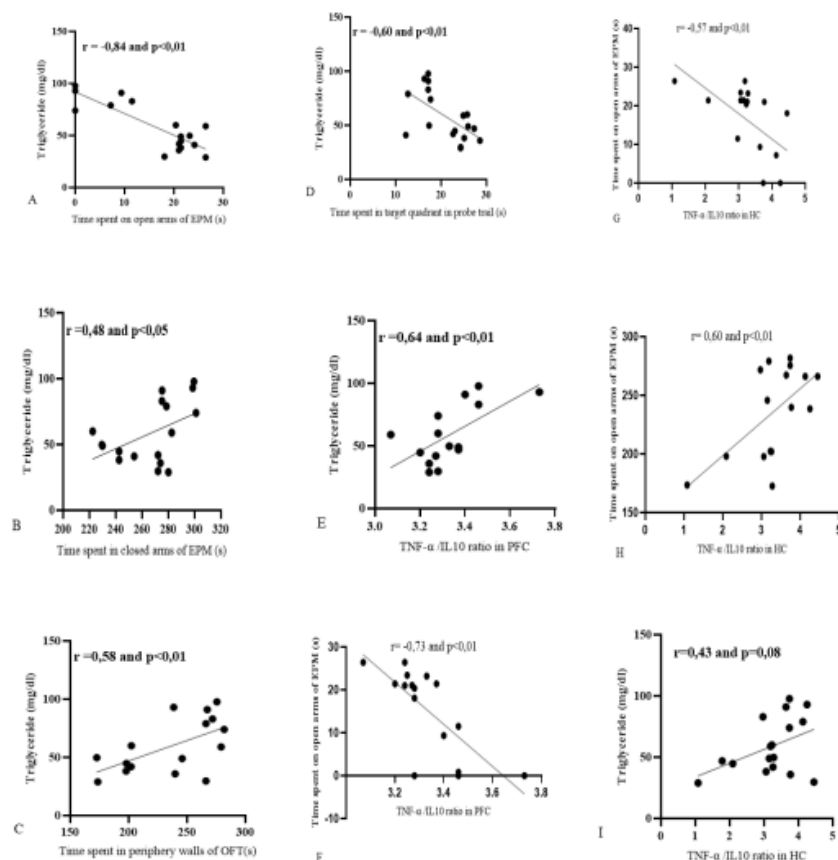


Fig. 5.: Correlation Analysis Results. Correlation scatterplot between TG levels and time spent in the open arms of EPM (A). Correlation scatterplot between TG levels and time spent in the closed arms of EPM (B). Correlation scatterplot between TG levels and time spent in the periphery walls of OFT (C). Correlation scatterplot between TG levels and time spent in the target quadrant in probe trail (D). Correlation scatterplot between TG levels and TNF- α /IL10 ratio in PFC (E). Correlation scatterplot between the time spent on open arms of EPM and TNF- α /IL10 ratio in PFC (F). Correlation scatterplot between between the time spent on open arms of EPM and TNF- α /IL10 ratio in HC (G). Correlation scatterplot between between the time spent on open arms of EPM and TNF- α /IL10 ratio in HC (H). Correlation scatterplot between between TG levels and TNF- α /IL10 ratio in HC (I).