T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇANLARDA DOĞUM STRESİ VE BELLEK PERFORMANSI ÜZERİNDE ÇİNKO EKSİKLİĞİ VE DESTEĞİNİN ETKİSİ

Fatma Sare TAŞTEPE

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİZYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Abdülkerim Kasım BALTACI

KONYA-2021

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇANLARDA DOĞUM STRESİ VE BELLEK PERFORMANSI ÜZERİNDE ÇİNKO EKSİKLİĞİ VE DESTEĞİNİN ETKİSİ

Fatma Sare TAŞTEPE

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİZYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Abdülkerim Kasım BALTACI

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 20202016 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2021

ÖNSÖZ

"Sıçanlarda Doğum Stresi ve Bellek Performansı Üzerinde Çinko Eksikliği ve Desteğinin Etkisi" başlıklı tez çalışmamın planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve bir bütün haline getirilmesinde her türlü bilimsel desteğini ve katkısını esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Abdülkerim Kasım BALTACI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans eğitimim esnasında öğrenimime katkı veren Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri sayın Prof. Dr. Rasim MOĞULKOÇ, Prof. Dr. Nilsel OKUDAN ve Prof. Dr. Muaz BELVİRANLI'ya, deney hayvanlarının uygulama kısmında ve analizlerin yapılması sırasında yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Elif GÜLBAHÇE MUTLU, Arş. Gör. Ömer ÜNAL ve Arş Gör. Saltuk Buğra BALTACI'ya, eğitim hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **iv**

ÖZET ..... **ixx**

SUMMARY ..... **xii**

1.GİRİŞ **1**

1.1. Amaç 1

1.2. Çinko Araştırmaları ve Tarihçesi 3

1.3. Çinko 4

1.4. Çinko ve Öğrenme 6

1.5. ZnT3 9

1.6. ZnT3, Hipokampus ve Öğrenme 10

1.7. Çinko ve Üreme Sistemi 11

1.8. Östrojen ve Öğrenme İlişkisi 13

1.9. Çinko Östrojen İlişkisi 19

2.GEREÇ VE YÖNTEM **21**

2.1. Hayvan Materyali ve Gruplar 21

2.1.1. Deney Grupları 21

2.2. Davranış ve Öğrenme testleri 22

2.2.1. Morris Su Tankı Deneyleri I. Aşama 22

2.2.2. Morris Su Tankı Deneyleri II. Aşama 22

2.3. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması 23

2.4. Biyokimyasal Analizler 23

2.4.1. Hipokampus Dokusunda Östrojen Reseptör Alfa Analizi 23

2.4.2. Hipokampus Dokusunda Östrojen Reseptör Beta Analizi 24

2.4.3. Serum çinko analizleri 26

2.5. Hipokampus dokusunda RNA İzolasyonu 26

2.5.1. mRNA Örneklerinden Revers Transkriptaz PCR (RT-PCR) Yöntemi ile cDNA eldesi..... 27

2.5.2. ZNT3 Geninin İfade Düzeyinin belirlenmesi 28

2.6. İstatistiksel Analiz 29

3.BULGULAR 30

3.1. Davranış Testleri 30

3.2. Biyokimyasal Parametreler 33

4.TARTIŞMA 35

4.1. Davranış Testlerinin Tartışılması 35

4.2. Biyokimyasal Parametrelerin Tartışılması 38

4.2.1. Serum Çinko Seviyelerinin Tartışılması..... 38

4.2.2. Hipokampus dokusundaki ERα ve ERβ Seviyelerinin Tartışılması..... 38

4.2.3. Hipokampus dokusundaki ZnT3 gen ekspresyon düzeylerinin tartışılması…..... 40

5.SONUÇ ve ÖNERİLER..... 43

6.KAYNAKLAR 44

7.EKLER 50

EK-B: TURNİTİN RAPORU……...…….50

SİMGELER VE KISALTMALAR

AD: Alzheimer hastalığı

AGS: Arenaya giriş sıklığı

AMPA: α-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit

BDNF: Beyin kaynaklı nörotrofik faktör

cDNA: Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit

CREB: cAMP yanıt elemanı bağlayıcı proteini

DNA: Deoksiribonükleik asit

E2: 17β-Estradiol

ENS: Enterik sinir sistemi

ER: Östrojen reseptörü

ERK: Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz

FSH: Folikül uyarıcı hormon

GluR1: Glutamat reseptörü 1

GPER: G-protein bağlı östrojen reseptörü

GPR39: G-protein bağlı reseptör 39

HRT: Hormon replasman tedavisi

KKGirişS: Kuzeydoğu kadranına giriş sıklığı

KKİGAKGS: Kuzeydoğu kadranına ilk gelinen ana kadar geçen süre

KKKS: Kuzeydoğu kadranında kalınan süre

LH: Luteinizan hormon

MAPK: Mitojenler tarafından aktive edilen protein kinaz

Mt: Metallotiyonin

NAC: n-asetilsistein

PFC: medial prefrontal korteks

PGS: Platformdan geçiş sıklığı

PGSü: Platformda geçirilen süre

PI3K: Fosfoinositid 3-kinaz

PIGAKGS: Platforma ilk geldiği ana kadar geçen süre (kaçış gecikmesi)

PSD-95: Postsinaptik yoğunluk 95

PZGSı: Platfrom zonuna giriş sıklığı

PZGSü: Platform zonunda geçen süre

PZIGAKGS: Platform zonuna ilk gelinen ana kadar geçen süre

RDA: Önerilen diyet alım değeri

RNA: Ribonükleik asit

SLC30: Çözünen bağlantılı taşıyıcı

TrkB: Tropomiyozin reseptör kinaz B

TYM: Toplam yüzme mesafesi

TYS: Toplam yüzme süresi

WHIMS: Kadın Sağlığı Girişimi Çalışması

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

YH: Yüzme hızı

ZN: $ZnCl_2$ artı 2NAC

ZnT3: Çinko taşıyıcı protein-3

ZnT3KO: Çinko taşıyıcı protein nakavt

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Çinko ve kadın üreme sistemi. 20

TABLOLAR

Tablo 3.1. Çalışma Gruplarının Probe 1 Düzeylerinin Karşılaştırılması…….30

Tablo 3.2. Çalışma Gruplarının Probe 1 Düzeylerinin Karşılaştırılması…….30

Tablo 3.3. Çalışma Gruplarının Probe 1 Düzeylerinin Karşılaştırılması…….31

Tablo 3.4. Çalışma Gruplarının Probe 2 Düzeylerinin Karşılaştırılması…….32

Tablo 3.5. Çalışma Gruplarının Probe 2 Düzeylerinin Karşılaştırılması…….32

Tablo 3.6. Çalışma Gruplarının Probe 2 Düzeylerinin Karşılaştırılması……...…..33

Tablo 3.7. Çalışma Gruplarının Hipokampus dokusunda ERα ve ERβ seviyeleri (ng/ml)……...34

Tablo 3.8. Çalışma Gruplarının Hipokampal ZnT3 (2-ΔΔ CT) ve serum çinko seviyeleri (µg/dl)……34

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Sıçanlarda Doğum Stresi ve Bellek Performansı Üzerinde Çinko Eksikliği ve Desteğinin Etkisi

Fatma Sare TAŞTEPE

Fizyoloji(Tıp)Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2021

Çinko sinaptik plastisite, öğrenme ve hafıza için önemli bir eser elementtir. Çinko eksikliği, hem hamilelik sırasında hem de doğumdan sonra, bilişsel performansı bozar ve hafıza açıklarına ek olarak, dikkat, nöropsikolojik davranış ve motor gelişimde değişikliklere neden olur. Çinko takviyesinin biliş üzerindeki etkileri, özellikle yetişkinlerde, daha az açıktır. Bu çalışmanın amacı da gebelik döneminde çinko eksik diyetle beslenen sıçanlarda, doğum stresi, çinko eksikliği ve desteğinin hipokampal östrojen reseptör ve ZnT3 gen ekspresyonu ile bilişsel fonksiyonlar üzerindeki etkilerinin araştırılmasıdır.

Çalışma Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edilen Wistar cinsi dişi sıçanlar üzerinde gerçekleştirildi. Çalışma protokolü aynı merkezin etik kurulu tarafından onaylandı.

Çalışmada 15 adet dişi sıçan gebelik başlangıcından doğum sonrası yavrularından ayrılacakları 21. güne kadar çinko eksik (0,650 ppm/g çinko) diyetle ve 5 adet sıçan da normal diyetle beslendiler. Yavru sıçanlar ayrıldıktan sonra anne sıçanlar aşağıdaki şekilde gruplara ayrıldılar:

Grup 1 Çinko eksik diyetle beslenen grup: Yavrularından ayrıldıktan sonra, çalışmanın sonlandırılacağı zamana kadar çinko eksik diyetle (0,650 ppm/g çinko) beslenen grup.

Grup 2 Çinko takviyeli diyetle beslenen grup: Yavrularından ayrıldıktan sonra, standart sıçan yemine ilave olarak çalışmanın sonlandırılacağı zamana kadar (66-70 günlük) çinko takviyeli (5 mg/kg/gün intraperitoneal çinko sülfat) diyetle beslenen grup.

Grup 3 Normal diyetle beslenen grup: Yavrularından ayrıldıktan sonra, çalışmanın sonlandırılacağı zamana kadar, standart sıçan yemiyle beslenen grup.

Grup 4 Kontrol grubu: Bu grubu oluşturan sıçanlar normal diyetle beslenen ve deney gruplarıyla aynı dönem gebe kalmış ve doğum yapan annelerden rastgele olarak seçildiler. Bu grubu oluşturacak hayvanlar standart sıçan yemiyle beslendi.

Çalışmada davranış ve öğrenme testleri tamamlandıktan 24 saat sonra hayvanların tamamı sakrifiye edilerek kan ve doku örnekleri alındı.

Hayvanların hipokampus doku örneklerinde ZnT3 gen ekspresyonu gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) analizi ile, ERα ve Erβ düzeyleri ELISA yöntemiyle, serum çinko seviyeleri ICP-MS yöntemiyle tayin edildi.

Çalışmanın başlangıcındaki Grup 1, 2 ve 3'ün bilişsel parametreleri Grup 4 ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde gerilemişti ($P<0,05$). Çinko desteği özellikle PZGSü, PZIGAKGS ve KKİGAKGS parametrelerini Grup 2'de Grup 4 seviyelerini çıkartarak bilişsel performanstaki bozulmayı tersine çevirdi ($P<0,05$). Hipokampus dokusundaki en yüksek ERα ve ERβ düzeyleri çinko takviyesi yapılan Grup 2 ile Grup 4 (kontrol)'de elde edildi ($P<0,001$). Çalışmamızda en yüksek serum çinko düzeyleri çinko takviyesinin yapıldığı Grup 2'de en düşük serum çinko seviyeleri ise

Grup 1'de elde edildi (P<0,001). Hipokampus dokusundaki en yüksek ZnT3 gen ekspresyon düzeyleri çinko takviyesi yapılan Grup 2 ile Grup 4 (kontrol)'de elde edildi (P<0,001).

Çalışmamızın bulguları doğum stresi ve/veya yavrudan ayrılma stresinden bağımsız olarak anne sıçanlarda bilişsel performansta meydana gelen bozulmanın gebelik ve emzirme döneminde çinko eksik diyetle beslenmenin bir sonucu olduğunu, bilişsel performanstaki bu bozulmanın çinko takviyesiyle önlenebileceğini göstermektedir. Çinko desteğinin bilişsel performansı iyileştirici etkisi hipokampal ZnT3 gen ekspresyonu ile ERα ve ERβ akitivitesini artırarak oluşmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Bellek Performansı; Çinko Eksikliği; Çinko Takviyesi; Doğum Stresi; Sıçan.

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

The Effect of Zinc Deficiency and Supplementation on Birth Stress and Memory Performance in Rats

Fatma Sare TAŞTEPE

Department of Physiology(Medicine)

MASTER THESIS / KONYA-2021

Zinc is a crucial trace element for synaptic plasticity, learning, and memory. Zinc deficiency, both during pregnancy and after birth, impairs cognitive performance and causes memory deficits, as well as changes in attention, neuropsychological behavior, and motor development. The effects of zinc on cognition, especially in adults, are less clear. This study aims to investigate the effects of birth stress, and zinc deficiency, and supplementation on hippocampal estrogen receptor and ZnT3 gene expression, and cognitive functions in the zinc-deficient diet-fed rats during pregnancy.

The study was carried out on female Wistar rats obtained via Selcuk University Experimental Medicine Research and Application Centre. The study protocol was approved by the ethics committee of the same center. In the study, 15 female rats were fed the zinc-deficient diet and 5 female rats were fed the standard diet from the beginning of the pregnancy until the 21st day after the birth when they were to be separated from the pups. After separation, dams were divided into 4 groups as follows: Group 1; Zinc-deficient diet-fed group: This group was fed the zinc-deficient diet (0,650 ppm/g zinc) after separation from the pups. Group 2; Zinc-supplemented group: After separation from pups, in addition to the standard diet, this group received intraperitoneal zinc sulfate until the end of the study (66-70 days). Group 3; Standard diet-fed group: After separation from pups, this group was fed the standard diet. Group 4; Control group: The rats in this group were randomly selected from dams who were fed a normal diet and who conceived and gave birth at the same time as the other groups. Animals in this group were fed the standard diet. 24 h after behavioral and memory tests, all animals were sacrificed and tissue and blood samples were collected. In hippocampus samples of the animals, ZnT3 gene expression was analyzed by Real-Time PCR, ERα and ERβ levels by ELISA, and serum zinc levels by ICP-MS method.

Cognitive parameters of Group 1, 2, and 3 at the beginning of the study were significantly decreased compared to Group 4 ($p<0,05$). Zinc supplementation reversed the deficits in memory, especially by rescuing the latency for finding the platform, the time spent in the platform zone, the latency for entering the northeast quadrant. The highest hippocampal ERα and ERβ levels were in Group 2 (zinc supplemented) and Group 4 (control) ($p<0,001$). The highest serum zinc levels were in Group 2, while the lowest was in Group 1 ($p<0,001$). The highest hippocampal ZnT3 gene expression levels were in Group 2 and Group 4 ($p<0,001$).

The findings of the study suggest that that cognitive performance impairment in dams, independent of birth stress and/or separation from the pups, was a result of feeding with the zinc-deficient diet during pregnancy and lactation. That cognitive impairment could be prevented by zinc supplementation. The cognitive performance improving effect of zinc supplementation may occur via increasing hippocampal ZnT3 gene expression and ERα and ERβ activity.

Key words: birth stress; memory performance; rats; zinc deficiency; zinc supplementation.

1. GİRİŞ

1.1. Amaç

Çinko sinaptik plastisite, öğrenme ve hafıza için önemli bir eser elementtir. Çinko eksikliği, hem hamilelik sırasında hem de doğumdan sonra bilişsel performansı bozar ve hafıza açıklarına ek olarak; dikkat, aktivite, nöropsikolojik davranış ve motor gelişimde değişikliklere neden olur. Çinko takviyesinin biliş üzerindeki etkileri, özellikle yetişkinlerde, daha az açıktır.

Sinaptik çinkonun nöral plastisitede ve dolayısıyla öğrenme ve hafızadaki varsayılan rolü, çinko homeostazı sinaptik seviyede değiştirildiğinde hafıza bozukluğunu gösteren çeşitli gözlemlerle desteklenir (Contestabile ve ark 2016). Bu tür hafıza bozukluğunun besinsel çinko eksikliği koşullarında gözlemlenmenin yanı sıra (Yu ve ark 2013), hipokampustaki çinko şelasyonu (Contestabile ve ark 2016) veya çinko naklinin sinaptik olarak genetik olarak bastırılması yoluyla da elde edilebilir (Sindreu ve ark 2011). Çinko desteğinin uygulandığı deneysel çalışmalar muhtemelen ekstra sinaptik çinko fazlalığının nörotoksisitesinden dolayı daha az net sonuçlar vermektedir (Contestabile ve ark 2016). Gebelik sırasında başlayan ve yetişkinlik boyunca süren kronik çinko takviyesinin, sıçanlarda mekansal görevlerin öğrenilmesinde bozulmaya neden olduğu rapor edilmiştir (Railey ve ark 2010). Bununla birlikte, gestasyon ile başlayan ve doğum sonrası çocukluk döneminde devam eden çinko takviyesinin mekansal belleği iyileştirdiği bildirilmiştir (Piechal ve ark 2012). Ayrıca, yetişkin sıçanlarda çinko takviyesi travmatik beyin hasarına bağlı bilişsel eksiklikleri de önlemektedir (Cope ve ark 2011). Fare depresyon modelinde hipokampal sinaptik plastisite ile uzaysal hafızadaki bozulmanın, nanopartiküller çinko desteğiyle geri çevrildiği gösterilmiştir (Xi eve ark 2012). Sütten yeni kesilmiş farelerde, 3 ay süreyle yüksek doz çinko takviyesi, muhtemelen yüksek doz tedavinin toksik etkisinden dolayı hipokampal regresif değişikliklere ve hipokampal bağımlı hafıza bozukluğuna neden olmuştur (Yang ve ark 2013). Benzer şekilde Alzheimer hastalığının genetik fare modellerinde, uzun süreli çinko takviyesi, hastalığa bağlı hafıza bozukluğunu daha da kötüleştirmiştir (Linkous ve ark 2009). Bu sonuçlar, aşırı hipokampal çinko sinyallemesinin, özellikle patolojik/stresli koşullar altında, bilişsel bozulmaya yol açtığını ima eden, bilişsel aktivitenin çinko aracılı modifikasyon hipotezi ile açıklanabilir (Takeda ve ark 2017).

Hayvanlar ve insanlar üzerinde yapılan çok sayıda araştırma, beyin ve davranışta cinsiyet farklılıkları olduğunu göstermektedir (Sheppard ve ark 2019). Bu farklılıkların altında yatan itici güç karmaşık ve çok yönlü olmakla birlikte, seks steroid hormonlarındaki, özellikle östrojenlerdeki farklılıkların klinik ve deneysel öneme sahip olduğu kesindir (Sheppard ve ark 2019). Alzheimer hastalığı, otizm spektrum bozuklukları, depresyon ve şizofreni gibi beyin bozukluklarının gelişim, oluşumu ve/veya şiddeti cinsiyetler arasında farklılıklar göstermektedir (Irvine ve ark 2012, Mendrek ve Mancini-Marïe 2016, Sheppard ve ark 2019). Ayrıca, bu aynı bozuklukların birçoğu, hipokampusa bağımlı bilişsel semptomların şiddetinde cinsiyet farklılıkları göstermektedir (Sheppard ve ark 2019). Bu farklılıklar kısmen kadınlarda östrojenler tarafından etkilenmektedir (Sheppard ve ark 2019).

Östrojenler, ovaryumlar dışında beyin de dahil olmak üzere vücuttaki çeşitli dokularda sentezlenen steroid hormonlarıdır. Östrojenlerin en güçlü ve en baskın formu olan 17β-Estradiol (E2), bilişsel ve beyin fonksiyonları üzerinde de bir takım etkilere sahiptir. 17β-Estradiol konsantrasyonları optimal bir seviyenin üstünde veya altında olduğunda bilişsel fonksiyonlarda bozulmalar meydana gelmektedir (Bean ve ark 2014; Foster 2012). Hatta 17β-Estradiol sinaptik plastisiteyi ve bilişsel işlevi kontrol etmek için ön beyinde yeni bir nöromodülatör olarak önerilmektedir (Lu ve ark 2019).

Özellikle, estradiolün bilişi geliştirme yeteneği, ileri yaşla birlikte östrojen reseptörlerinin (ER'ler) ekspresyonunun azalmasıyla birlikte azalır (Bean ve ark 2014). Bu nedenle, gelecekteki araştırmalar için, yaşlanma sırasında östrojen reseptörü ekspresyonunu düzenleyen mekanizmaları belirlemek önemli olacaktır. Hipokampüste östrojen reseptörlerinin vektör aracılı ekspresyonu, yenilikçi bir araştırma yaklaşımı sağlar ve belleğin, estradiol seviyeleri ile etkileşime giren ERα ve ERβ'nın nispi ekspresyonuna bağlı olduğunu gösterir (Bean ve ark 2014; Kim ve ark 2017). Zaten yaşlı sıçanların hipokampusunda genç sıçanlara kıyasla ERα ve ERβ değerlerinde %56 ve %41'lik bir azalma vardır (Bean ve ark 2014). Bu sonuçlar, ERα ve ERβ ekspresyonunun ilerleyen yaş ile hipokampal fonksiyonun sürdürülmesi için kritik rolüne işaret eder.

Bilişsel fonksiyonların düzenlenmesinde çinko ile östrojen arasında önemli bir ilişkinin olabileceği ileri sürülmekte, özellikle östrojenin hipokampal çinko

regülasyonunu düzenlediğine dikkat çekilmektedir (Padilla-Gómez ve ark 2012). Çinko ile östrojen arasındaki en temel mekanizma, çinko ile steroid hormon reseptörleri arasındaki ilişkide görülür (Baltaci ve ark 2019; Sunar ve ark 2009). Üreme sisteminden salgılanan 17β-Estradiol spesifik reseptörlerine bağlanır. Hormon-reseptör kompleksi nukleusta bir çinko metalloenzim olan RNA polimeraza ve spesifik DNA segmentine bağlanır (Baltaci ve ark 2019). Çinko eksikliği hormon-reseptör kompleksinin DNA'ya bağlanmasını önler (Baltaci ve ark 2019; Sunar ve ark 2009). Çinko RNA polimerazın aktivitesini de doğrudan etkiler (Baltaci ve ark 2019). Bu olayda çinko eksik hayvanlarda östrojenlere olan duyarsızlığı açıklayan bir mekanizma olarak kabul edilebilir (Baltaci ve ark 2019). Bu durum sadece çinko eksikliğiyle ilgili endokrinolojik anormallikleri değil, bilişsel fonksiyonlardaki bozulmanın da en azından bir kısmını açıklar (Baltaci ve ark 2019, Contestabile ve ark 2016).

Bu çalışmanın amacı da gebelik döneminde çinko eksik diyetle beslenen sıçanlarda, doğum stresi, çinko eksikliği ve desteğinin hipokampal östrojen reseptör ekspresyonu ile bilişsel fonksiyonlar üzerindeki etkilerinin araştırılmasıdır.

1.2. Çinko Araştırmaları ve Tarihçesi

Bir eser element olan çinko yeryüzünde en bol bulunan 23. elementtir. Çinkonun bir eser element olarak araştırılmasının tarihi 150 yıldan daha eskiye dayanır. Örneğin, Aspergillus niger için gerekliliği 1869'da, bitki büyümesindeki önemi 1926'da, laboratuvar kemirgenleri için 1933'te, domuzlar için 1955'te ve insan sağlığımdaki kritik rolü 1963'te gösterildi (Prasad 2014a, 2014b). Çinkonun canlı organizmadaki temel rolü çok sayıda fizyolojik sürece dahil olmasından kaynaklanmaktadır. Bu güne kadar gerçekleştirilen çalışmalarda 300'den fazla enzim ve protein ile 2000'den fazla transkripsiyon faktörünün çinko bağımlı olduğu kabul edildi (Skalny ve ark 2021). Özellikle çinko, hücre döngüsünün düzenlenmesinde, DNA replikasyonu ve onarımında, hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında, apoptozda, lipid ve karbonhidrat metabolizması gibi yaşamın devamını ilgilendiren olaylarda kritik rol alır (Chasapis ve ark 2020) Çinkonun biyolojik etkilerinin önemli bir kısmına antioksidan ve antienflamatuar rolü aracılık eder. Çinko iyonları, redoks homeostazının kilit düzenleyicileri olarak kabul edilir (Jarosz ve ark 2017). Çinkonun çeşitli fizyolojik süreçlere dahil olması nedeniyle, bu

eser elementteki eksiklik, metabolik işlev bozukluğu ve bunun sonucunda ortaya çıkan hastalıklarla doğrudan ilişkilidir. İnsan sağlığında çinkonun önemli olduğunu ilk defa Dr. Ananda Prasad rapor etti. Dr. Prasad İran'da yaşayan 21 yaşındaki çiftçide hepatosplenomegali, anemi, cücelik ve hipogonadizm ile karakterize çinko eksikliği vakasını tanımladı ve bu vaka Prasad Sendromu olarak adlandırıldı (Prasad ve ark 1961). O zamandan beri, artan sayıda çalışma, değişen çinko durumunun çeşitli patolojik süreçler ve hastalıklardaki rolünü göstermiştir. Kısaca çinko eksikliğinin nöropsikiyatrik ve nörosensoriyel bozukluklar, cilt lezyonları, akrodermatit, hipogonadizm ve infertilite, büyüme geriliği, timik atrofi ve immün disfonksiyon ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Skalny ve ark 2021). Buna karşılık aşırı Zn alımı, bakır dengesizliğine, bulantı ve kusma gibi gastrointestinal semptomlara, lenfosit disfonksiyonuna, nörotoksisiteye ve Zn dumanının solunması durumunda solunum semptomlarına neden olabilir (Plum ve ark 2010).

1.3. Çinko

Çinko, canlı dokunun normal büyümesi ve gelişmesi için önemli bir eser elementtir (Escobedo-Monge ve ark 2021). İnsan vücudunda en çok bulunan ikinci eser element olmasına rağmen vücutta depo yeri yoktur ve günlük olarak diyetle alınması gerekir (Akdeniz ve ark 2016). Yetişkin vücudunda yaklaşık olarak 2 ila 3 g çinko bulunur. Çinkonun hücrelerin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünün korunmasında kritik rolü vardır. Organlarda, dokularda, kemiklerde, sıvılarda ve hücrelerde çinko bulunur. Birçok fizyolojik işlevin gerçekleşmesi için gerekli bir elementtir ve canlı sistemlerdeki enzim eylemlerinde önemi kritiktir (Kaur ve ark 2014).

Çinko, memeli dokularında (demirden sonra) en bol bulunan ikinci eser metaldir ve büyüme, gelişme, DNA sentezi, bağışıklık ve diğer önemli hücresel süreçler için temel bir elementtir (Wang ve Dahlström 2008).

Temel bir eser element olan çinkonun, normal büyüme ve gelişme, hücresel bütünlük, protein sentezi ve nükleik asit metabolizması dahil olmak üzere çeşitli biyolojik işlevlerde kritik rolleri bulunmaktadır. Tüm bu biyolojik işlevler hücre bölünmesi ve büyümesinde gerekli olduğundan, çinkonun fetal büyüme ve gelişme için önemli olduğuna inanılmaktadır. Hamilelik süresince çinkoya gereksinim artar,

ancak geçerli bir gösterge olmadığından, gelişmiş ülkelerde bile gebelikte çinko eksikliğinin gerçek bir tahmini yapılamamaktadır (Favier ve Hininger-Favier 2005).

Mikroorganizmalarda hücre döngüsünün her aşamasında ve DNA sentezinde çinko gereklidir. Çinkoya bağımlı enzimler; timidinkinaz, RNA polimeraz, çeşitli kaynaklardan DNA-polimeraz ve virüslerden RNA-bağımlı DNA polimeraz şeklinde gösterilmiştir. Çinko RNA polimerazın aktivitesini de düzenlediğinden dolayı RNA'nın katabolizması çinkoya bağımlı olarak görünmektedir. Çinkonun, nükleik asit metabolizmasındaki hayati rolünden dolayı protein sentezi üzerinde etkisi önemlidir (Prasad 1983).

Metal bağlayıcı protein olarak tanımlanan metallotiyoninler (Mt) metal toksisitesine kaşı korunmada önemli rol oynayan düşük molekül ağırlıklı proteinlerdir (Yazğan ve ark 2020). Metallotiyoninler dokuların çinko düzeyleri ve doku çinko dağılımının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Yazğan ve ark 2020, Yazğan ve ark 2021). metallotiyoneinler ile çinko arasındaki ilişki tek yönlü değildir. Çinko da metallothionein sentezini uyarır (Yazğan ve ark 2021). Metallotiyonin, bağırsak yolundan bakır emilimini engelleyen metal bağlayıcı bir proteindir ve çinkonun etki mekanizması, metalotiyoninin indüksiyonunu içerir. Negatif bakır dengesine, yalnızca gıda bakırının emiliminin engellenmesi değil, aynı zamanda tükürük, mide suyu ve bağırsak salgılarında önemli miktarda endojen olarak salgılanan bakırın yeniden emiliminin engellenmesine neden olmaktadır. Çinko, bakır birikmesi sonucu ortaya çıkan Wilson hastalığında, bakır seviyelerini ve toksisitesini kontrol etmede tamamen etkilidir. Çinkonun, son derece düşük toksisite seviyesine sahip olması, diğer bakteri önleyici maddelere göre çok büyük bir avantaj sağlar (Brewer 2001).

Çinkonun sinaptik esneklik, öğrenme ve bellek için önemli bir eser element olduğu kanıtlanmıştır. Çinko eksikliği, hem hamilelik sırasında hem de doğumdan sonra, bozulmuş bilişsel performans ve hafıza açıklarına ek olarak, dikkat, aktivite, nöropsikolojik davranış ve motor gelişimde değişikliklerle sonuçlanır. Özellikle yetişkinlerde, çinko takviyesinin biliş üzerindeki etkileri ile ilgili daha az netlik bulunmaktadır (Contestabileve ark 2016). Çinko homeostazı sinaptik seviyede değiştirildiği zaman, bellekte bozulmayı gösteren çeşitli gözlemlerle, sinaptik

çinkonun nöral plastisitedeki ve dolayısıyla öğrenme ve hafızadaki varsayılan rolü desteklenir (Contestabileve ark 2016).

İlk kez 1963'te, insanlarda çinko eksikliğinin varlığının kabul edilmesine karşın çinko için önerilen diyet alım değeri (RDA) ABD Ulusal Bilimler Akademisi tarafından 1974'te belirlendi. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), gelişmekte olan dünyada yaşayan yaklaşık 2 milyar kişide çinko eksikliği olabileceğini tahmin etmektedir. Toplumun, içeriğinde yüksek miktarlarda organik fosfat bileşikleri bulunan ve çinko ile birleşerek onu emilim için kullanılamaz hale getiren tahıl proteinleri tüketmesi bu durumun temel nedenidir. Büyüme geriliği, baskılanmış hücre aracılı bağışıklık, bilişsel işlevlerde bozulma, artmış oksidatif stres ve inflamatuar sitokinlerin upregülasyonu çinko eksikliğinin başlıca olumsuz klinik etkileri olarak gösterilebilir (Prasad 2017). Epidermal, gastrointestinal, santral sinir, immün, iskelet ve üreme sistemleri çinko eksikliğinden klinik olarak en fazla etkilenen organlardır (Roohani ve ark 2013).

1.4. Çinko ve Öğrenme

Biliş, bir bireyin bilgiyi algılama, düşünme, hafıza, öğrenme ve dikkat becerileri aracılığıyla işlediği düşünce süreçleri alanı olarak tanımlanmaktadır. Bilişsel gelişim, çinko eksikliğinden dikkat, aktivite, nöropsikolojik davranış ve motor gelişimdeki değişiklikler yoluyla etkilenebilir. Mekanizmalar net değildir, ancak nörojenez, nöronal göç, sinaptogenez için çinko gereklidir ve eksikliği nörotransmisyonu ve sonraki nöropsikolojik davranışları engelleyebilir (Bhatnagar ve Taneja 2001).

Fredrich Timm yaklaşık altmış yıl önce, histokimyasal bir teknik geliştirdi ve bu teknikle farklı beyin bölgelerinde zengin bir serbest çinko rezervi ortaya çıkardı (Krall ve ark 2021). Beyin dokusu Timm ile boyanarak yapılan sonraki elektron mikroskobu çalışmalarında, bu kararsız hücresel çinko havuzunun, sinaptik iletimde metalin olası bir rolünü göstererek, sinaptik butonlarda yüksek oranda konsantre olduğunu buldu. Bu ilk bulgular çinkonun nöronal işlevdeki rolüne dair onlarca yıllık araştırma için öncü oldu ve çinko tarafından tetiklenen veya düzenlenen çeşitli sinyal zincirlerini ortaya çıkardı (Krall ve ark 2021).

Çinko, merkezi sinir sisteminde kataliz, yapı ve düzenleme gibi önemli biyolojik rolleri olan bir eser elementtir ve antioksidan fonksiyonun ve bağışıklık sisteminin düzgün çalışması için gereklidir. Böylece çinko, hücre büyümesine ve hücre çoğalmasına neden olan nörofizyolojide önemli bir rol oynar. Beyin hastalığından sonra, aşırı salınan ve biriken çinko iyonları ise, postsinaptik nöronlarda nörotoksik hasara yol açar. Bununla birlikte, çinko eksikliği, nöronal ölümün artması ve azalmış öğrenme ve hafıza gibi dejenerasyon ve bilişsel gerileme bozuklukları meydana getirir. Bu bağlamda, çinko, merkezi sinir sisteminde önemli fizyolojik rolü olan biyolojik bir bileşendir, ancak majör nörolojik bozukluklarda patofizyolojik bir rol oynar (Choi ve ark 2020).

Hayvanlarda yapılan çalışmalarda, çinko eksikliğinin, hızlı beyin büyümesi sırasında veya çocukluk ve ergenlik döneminde aktiviteyi azaltma, duygusal davranışı artırma, hafızayı ve öğrenme kapasitesini bozma yoluyla bilişsel gelişimi etkilediği gösterilmiştir; fakat insan çalışmalarından elde edilen kanıtlar sınırlıdır. Gebelik ve emzirme sırasında annenin düşük çinko alımının, yeni doğanlarda daha az odaklanmış dikkat ve 6 aylık bebeklerde azalmış motor fonksiyonlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Çinko takviyesi ile düşük doğum ağırlıklı bebeklerde daha iyi motor gelişim ve daha fazla oyun oynamaya meyil, bebeklerde ve yeni yürümeye başlayan çocuklarda kuvvet ve fonksiyonel aktivitede artma görülmüştür. Daha büyük çocuklarda ise veriler tartışmalıdır, ancak çinko takviyesinin nöropsikolojik işlevleri iyileştirildiğine dair bazı kanıtlar bulunmaktadır. Çinkonun bilişsel gelişim üzerindeki etkileri ile ilgili olarak, çinko yoksunluğunun biyolojik mekanizmalarını, kritik dönemleri, ciddiyet eşiğini ve uzun vadeli etkilerini tam olarak belirlemek üzere ek çalışmalar yapılmalıdır (Bhatnagar ve Taneja 2001). Çinkonun çocukluk çağında bilişsel işlev üzerinde umut verici bir rolü vardır (Moura ve ark 2013).

Çinko eksikliğinin bilişsel gelişimde gecikmelere neden olabileceği, hem hayvan hem de insan çalışmalarından elde edilen kanıtlarla gösterilmiştir. Çinko eksikliğinde bilişsel gelişimi gösteren mekanizmalar net değildir, ancak çinko eksikliğinin çocukların nöropsikolojik işleyişinde, aktivitesinde veya motor gelişiminde eksikliklere neden olabileceği ve böylece bilişsel performansı engelleyebileceği görülmektedir (Black 1998).

Çinko, hücresel biyolojide yapısal, katalitik ve düzenleyici rolleri bulunan, yaşam boyu gerekli olan bir eser elementtir. İnsanlarda ve hayvanlarda normal beyin gelişimi ve fizyolojisi için kritik rol oynar, öyle ki çinko eksikliği veya fazlalığının davranış, anormal merkezi sinir sistemi gelişimi ve nörolojik hastalıkla ilgili değişikliklere katkıda bulunduğu görülmüştür. Bu bağlamda, çinko iyonlarının kortikal plastisitenin yanı sıra sinaptik iletimin nöromodülasyonunda da rol oynadığının gösterilmesi sürpriz değildir. Çinko, bir glutamaterjik veya gluzinerjik nöron sınıfı tarafından spesifik sinaptik veziküller içinde depolanır ve aktiviteye bağlı olarak salınır. Gluzinerjik nöronlar hemen hemen yalnızca serebral kortekste ve limbik yapılarda yer aldığı için, çinko normal bilişsel ve duygusal işlevler için kritik rol oynayabilir. Bununla birlikte, doğrudan kanıtlarda çinkonun nispeten güçlü bir nörotoksin olabileceği görülmektedir. İn vivo çinko mobilizasyonu ve salınmasına ikincil nöronal hasar, epilepsi ve iskeminin yanı sıra Alzheimer hastalığı ve amiyotrofik lateral skleroz gibi birçok nörolojik bozuklukta meydana gelir. Bundan dolayı, çinko homeostazı, merkezi sinir sisteminin normal bir şekilde işlemesi için ayrılmaz bir parçadır (Bitanihirwe ve Cunningham 2009).

Reaktif çinko, nöronal sinyallemede çok önemli bir metaldir ve büyük miktarda presinaptik veziküllerde dağıtılır. Çinkonun, sinaptik fonksiyonda da önemli rolü bulunmaktadır. Hücresel düzeyde çinko, gelişim çağında ve yetişkinlikte sinaptik aktivite ve nöronal plastisitenin bir modülatörü olarak görev yapar. Çinko homeostazında çeşitli aktarıcılar ve taşıyıcılar da yer alır. Beyindeki çinko homeostazında görev alan ana taşıyıcı ZnT3'tür. Beyindeki çinko durumunda meydana gelen değişiklikler, bozulmuş beyin gelişimi dahil olmak üzere nörolojik bozuklukları ve Alzheimer hastalığı gibi çeşitli nörodejeneratif bozuklukları ve depresyon, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı, amyotrofiklateral skleroz ve prion hastalığını da içeren duygu durum bozukluklarında rol oynar. Bunun yanı sıra çinkonun, travmatik beyin hasarı, felç ve nöbet ile ilişkili nöronal hasarın oluşmasında da rolü bulunmaktadır. Beyindeki çinko homeostazını kontrol eden mekanizmaları anlayarak, bunun gibi çeşitli nörolojik bozukluklarda önleyici ve tedavi edici stratejiler geliştirilebilir (Prakash ve ark 2015).

Eser metal çinko, yaşam süresi boyunca, erken neonatal beyin gelişiminden yetişkinlerde beyin fonksiyonunun sürdürülmesine kadar merkezi sinir sisteminde bir

biyofaktör olarak önemli roller oynamaktadır. Çinko, moleküler düzeyde transkripsiyon faktörü aktivitesi yoluyla gen ekspresyonunu düzenler ve nöronal metabolizmadaki birçok anahtar enzimin aktivitesinde görevleri vardır. Hücresel düzeyde ise çinko, gelişim çağında ve yetişkinlikte sinaptik aktivite ve nöronal plastisitenin bir modülatörü olarak görev yapar. Bu bağlamda, beyin çinko durumundaki değişiklikler, bozulmuş beyin gelişimi, Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif bozukluklar ve depresyon dahil ruh hali bozuklukları dahil olmak üzere çok çeşitli nörolojik bozukluklarda yer almaktadır. Çinko, travmatik beyin hasarı, felç ve nöbetle ilişkili nöronal hasarın oluşmasında da rol oynar (Gower-Winter ve Levenson 2012).

1.5. ZnT3

ZnT3'ün 1996 yılında keşfedilmesinden bu yana, bu proteinin, çinkonun glutamaterjik nöronların presinaptik veziküllerine taşınması ve Alzheimer hastalığında β amiloid plaklarının gelişimi sırasındaki rolüne ilişkin artan bir ilgi olmuştur. ZnT3, beyindeki farklı hücre tipleri, yağ dokusu hücreleri, pankreas adacıklarından beta hücreleri, epitel hücreleri, testis hücreleri, prostat kanseri hücreleri ve retina hücreleri gibi çeşitli hücre tiplerinde yer almaktadır. ZnT3'ün ekspresyonunu yaş, hormonlar, yağ asitleri, çinko şelasyonu ve glukoz etkilemektedir (Smidt ve Rungby 2012).

ZnT3, entorinal korteks, amigdala ve hipokampusdahil, histokimyasal olarak reaktif çinkodan zengin beyin bölgelerinde eksprese edilir. ZnT3, dentat granül hücrelerden hilar ve CA3 piramidal nöronlara uzanan çinko bakımından zengin yosunlu liflerde bol miktarda yer alır (Wenzel ve ark 1997).

ZnT3, çözünen bağlantılı taşıyıcı 30 (SLC30) çinko taşıyıcı ailesinin bir üyesi olarak kabul edilmektedir. Çinko iyonlarının sitoplazmadan sinaptik veziküllere taşınmasına aracılık eden sinir sistemi ile ilişkilidir. ZnT3'e enterik sinir sisteminde (ENS) de rastlanmıştır, ancak patolojik faktörlere verdiği tepkiler bilinmemektedir (Gonkowski ve ark 2017).

ZnT3, çinko iyonlarını sitozolden beyindeki presinaptik veziküllere taşımaktadır (Chi ve ark 2008). Beyinde ZnT3 yer alan sinaptik veziküllerde, serbest veya gevşek bağlı çinko iyonları havuzu şeklinde önemli miktarda çinko bulunur

(Wang ve Dahlström 2008). ZnT3, beynin glutamaterjik nöronlarının bir alt kümesinde sinaptik veziküller içinde yer alan çinko konsantrasyonundan sorumlu mekanizmadır (Lee ve ark 2011, McAllister ve Dyck 2017). Veziküller içindeki çinko, aktiviteye bağlı olarak sinaptik yarığa salınabilir ve burada birçok sinyal mekanizmasında işlev görebilir (McAllister ve Dyck 2017).

Memeli telensefalonunun toplam çinko içeriğinin yaklaşık %20'si, ZnT3'e bağımlı veziküler çinkodan meydana gelir. Yüksek hipokampal ZnT3 ekspresyonu, yosunlu lif filizlenmesi ve bilişsel eksiklikler ile ilişkilidir (Ni ve ark 2019).

Choi ve ark (2019)'nın yaptıkları çalışmada, ZnT3 ve veziküler çinkodan yoksun farelerde yaşlanmaya bağlı bilişsel gerileme olduğu görülmüştür. Bu bağlamda, yetişkin hipokampal nörogenez için ZnT3 ve veziküler çinkonun gerekli olduğu gösterilmiştir.

Ayrıca, Chen ve ark (2019)'nın çalışmasına göre, 4 hafta boyunca çinko eksikliği olan diyetle beslenen ratlarda hipokampal GPR39 (G-protein bağlı reseptör 39) ve ZnT3'te gözlemlenen ekspresyon değişiklikleri ile birlikte ağırlık, biliş, nöbet eşiği ve serum çinko konsantrasyonlarında da olumsuz etkiler görülmüştür.

1.6. ZnT3, Hipokampus ve Öğrenme

ZnT3 tarafından sinaptik veziküllerde depolanan çinko, daha sonra sayısız hedefi modüle etmek üzere sinaptik yarığa salınır. Bu hedeflerin beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) ve onun reseptörü, tropomiyozin reseptör kinaz B (TrkB) olabileceği in vitro deneylerle gösterilmiştir. ZnT3'ten yoksun fareler üzerinde yapılan çalışmalarda, BDNF ve TrkB seviyelerinde anormallikler görülmüştür, ancak veziküler çinkonun sağlam beyindeki BDNF ve TrkB üzerindeki etkileri bilinmemektedir (McAllister ve ark 2020).

Hipokampus ve neokortekste, her iki cinsiyette, 5 ve 12 haftalık vahşi tip ve ZnT3 nakavt (ZnT3KO) fareleri ve 8-10 haftalık farelerde BDNF mRNA ekspresyonu ve protein seviyeleri karşılaştırılarak yapılan bir çalışmada, yaş veya cinsiyetten bağımsız olarak, BDNF ve TrkB protein seviyelerinde vahşi tip ve ZnT3 nakavt fareler arasında bir farklılık olmadığı bulunmuştur. Fakat BDNF proteini ve mRNA ekspresyonunda cinsiyete özgü farklılıklar olduğu görülmüştür. BDNF

protein seviyelerinin dişi farelerde yaşla birlikte arttığı; ancak erkekler farelerde artmadığı görülmüştür. Dişilerde, ZnT3KO farelerinde, vahşi tip farelere göre büyük hipokampal BDNF mRNA ekspresyonu gözlenmiştir. Bu bağlamda, standart laboratuvar koşullarında barındırılan farelerde veziküler çinkonun eliminasyonu BDNF veya TrkB protein düzeylerini etkilememektedir, sonucuna ulaşılabilir (McAllister ve ark 2020).

ZnT3KO farelerinin, bağlamsal ayrımcılık ve uzamsal çalışma belleğinde eksiklikler olduğu ve yabani tip farelerin yosunlu lif yolundaki yerel çinko veya MAPK (Mitojenler tarafından aktive edilen protein kinaz) blokajının, bağlamsal ayrımcılığı bozduğu görülmüştür. Bunun sonucunda, ZnT3 presinaptik MAPK sinyalini modüle eden çinko homeostazı için önemlidir ve hipokampusa bağlı bellek için gereklidir, denebilir (Sindreu ve ark 2011).

ZnT3'ün hipokampus ve peririnal kortekse bağlı bellek ve davranış üzerindeki rolünü analiz etmek için ZnT3KO fareleri kullanılarak bir çalışma yapılmıştır. ZnT3KO fareleri, standart su labirentinde ilk öğrenmede anormallik gözlenmemiş, ancak ikinci bir platform konumu bulmakta zorlanmışlardır. Mutantlar, sosyal etkileşimde artma göstermiş, ancak sosyal ve nesne tanıma hafızasında eksiklikler olduğu gözlenmiştir. Bu bağlamda, ZnT3'ün, hipokampus ve peririnal kortekse bağlı olarak belirli uzamsal bellek ve davranış türlerinde rol oynadığı söylenebilir (Martel ve ark 2011).

Yapılan bir çalışmada, ZnT3'ün yetişkin hipokampal nörogenezinin korunmasında kritik işlevi olduğu ve ZN ($ZnCl_2$ artı 2NAC(n-asetilsistein)) takviyesinin hipokampal nörogenez üzerinde yararlı etkileri olduğu ve yaralanmadan sonra gelişmiş nöroproteksiyon ve onarım için terapötik bir hedef olarak hizmet edebileceği gösterilmiştir. Bahsedilen çalışma, veziküler çinkonun yetişkin hipokampal nörogenezinde kritik bir düzenleyici olarak rol aldığını düşündürmektedir (Choi ve ark 2020).

1.7. Çinko ve Üreme Sistemi

Çinko, embriyogenez ve gelişme dahil olmak üzere dişi üreme sistemi için gerekli bir elementtir ve çinko eksikliği veya fazlalığında sperm ve yumurta fizyolojisi üzerinde önemli etkiler görülebilir (Murarka ve ark 2015).

İnsanlarda sperm oluşumu ve olgunlaşması, yumurtlama ve döllenme aşamalarında çinko gereklidir. Hamilelik sırasında çinko eksikliğinin, spontan düşük, hamilelikle ilişkili toksemi, uzamış hamilelik veya erken doğum, malformasyonlar ve büyüme geriliği gibi bir takım anormalliklere neden olduğu bilinmektedir. Çinko bu etkilerini, prostaglandinlerle birlikte androjen hormonları, östrojen ve progesteron metabolizması üzerindeki çoklu etkisi ile gösteriyor olabilir. Erkek kısırlığında ve hamilelikte komplikasyonları azaltmak için çinko takviyesi faydalıdır.Ancak, bu etkileri net bir şekilde açıklayabilmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (Favier 1992).

Çinkonun, yeterli konsantrasyona bağlı olarak, erkek ve dişi üremesi üzerinde olumlu rolleri bulunmaktadır. Çinko, gebe kalma, doğum, fetal gelişim ve laktasyon evrelerindeki uygun hücre bölünmesinin gerçekleşmesine yardımcı olabilir. Sonuç olarak çinko, üreme ve gelişme fonksiyonlarında vazgeçilmez bir elementtir. Buna bağlı olarak da, üreme ve gelişme üzerindeki olumlu etkileri için çinko seviyesi yeterli olmalıdır. Ayrıca, çinko eksikliğinde, oksidatif hasarın artmasıyla beraber bu etkilerin üreme sağlığı üzerinde kötü etkileri bulunması kaçınılmazdır (Murarka ve ark 2015).

İnsanlarda yapılan çalışmalarda, hamilelik sırasında maternal çinko eksikliğinin olumsuz maternal ve fetal sonuçlara yol açabileceği görülmüştür (Shah ve Sachdev 2001, Hess ve King 2009). Maternal serum çinko düşüklüğünde, gebeliğe bağlı hipertansiyon, anormal doğum ve konjenital anomaliler görülebilmektedir. (Swanson ve King 1987). Doğum öncesi çinko takviyesinin bebeklerin nörodavranışsal gelişimi ve bağışıklık işlevi üzerinde yararlı etkilerinin olabileceği düşünülmektedir (Shah ve Sachdev 2001).

Hafif ve orta derecede çinko eksikliği oldukça yaygındır ve hamilelik sırasında maternal çinko eksikliğinde fetus üzerinde olumsuz etkiler görülebilir. Hamilelikte çinko eksikliğinin geçerli bir göstergesi olmadığı için, çinko eksikliği ile olumsuz fetal sonuçlara ilişkin çelişkili sonuçlar bulunmaktadır (Shah ve Sachdev 2006).

1.8. Östrojen ve Öğrenme İlişkisi

Östrojen, yıllarca sadece bir cinsiyet hormonu olarak kabul görmüştür; çünkü üreme için gereken davranışsal ve fizyolojik olayların düzenlenmesinde temel bir rolü vardır (Shughrue ve Merchenthaler 2000). Ancak östrojenin, başarılı bir üremenin gerçekleşmesi için oynadığı rolün yanı sıra, biliş için önemli olan beyin alanlarını da, hipokampus ve prefrontal korteks dahil etkilediği yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Daniel ve Bohacek 2010). Östrojenler, beynin bazı bölgelerinde nöroplastisiteyide etkilemektedir. Özellikle, östrojenlerin, omurga ve sinaps oluşumuna ek olarak, hipokampal oluşum sürecinde nörojenezi modüle ettiği ve buna aracılık ettiği bilinmektedir (Sheppard ve ark 2019).

Hipokampüse bağlı biliş ve nörojenezde cinsiyet farklılıkları vardır; ki bu da bu süreçlerde cinsiyet hormonlarının önemli rollerinin olduğunu düşündürmektedir. Östrojenin, özellikle yetişkin dişi kemirgenlerde ve daha az miktarda erkek bireylerde, hipokampüste belirli uzamsal ve bağlamsal bellek ve nörojenez biçimlerini modüle ettiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Duarte-Guterman ve ark 2015).

Yaşlanma sırasında bilişsel gerileme sıklıkla görülmektedir, ancak bu durum menopoz sonrasında, kadınlarda hızlanabilir. Araştırmalarda, kadınlar ve erkekler arasında beyin yapısı, işlevi ve metabolizmasında önemli oranda değişiklikler bulunmasının yanısıra, beyin yaşlanmasında da büyük miktarda cinsiyet farklılıkları olduğu kanıtlanmıştır. Östrojenlerin kültür ortamında nöronal hücreler üzerinde koruyucu etkiler gösterdiği görülmüş; ancak insanlarda nöronal hücreler üzerindeki bu koruyucu etkilerinin altında yatan mekanizma kesinolarak bilinmemektedir. Östrojenler, östrojen reseptörlerine bağlanma yoluyla ve aynı zamanda birden fazla yolla olmak üzere sinir sistemini çeşitli şekillerde etkilemektedir (Markou ve ark 2005).

Hipokampüse bağlı öğrenme ve hafıza performansı ile hipokampus morfolojisi annelik, hamilelik ve doğum sayısından etkilenir. Gebelik sırasında ve doğum sonrası dönemde dalgalanan estradiol ve kortikosteron gibi steroid hormonları, hipokampusun dentat girusundaki yetişkin nörojenezi etkiler. Bundan dolayı, hipokampal nörojenez, annelik, hamilelik ve doğum sayısından etkilenebilir

(Pawluski ve Galea 2007). Hipokampustaki yetişkin nörojenezinin işlevinin, uzamsal bellek ve depresyonla bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Galea ve ark 2013).

Yetişkin nörojenez, insanlar da dahil olmak üzere bir çok memeli türünde, yeni hücrelerin koku soğanlarına göç ettiği subventriküler bölge ve hipokampusun dentat girusu olmak üzere iki ana alanda bulunmaktadır. Hipokampustaki ve subventriküler bölgedeki nörojenez çeşitli faktörler tarafından etkilenmektedir. Cinsiyet farklılıklarının genellikle hipokampal nörojenez seviyelerinde olduğu ve bu etkilerin strese yanıt olarak, hamilelik ve emzirme dahil olmak üzere üreme ve yaşlanma ile kısmen östrus döngüsü sırasında estradiol, progesterone ve kortikosteron gibi dolaşımdaki steroid hormone seviyelerindeki farklılıkların sonucu olduğuyapılan çalışmalarda görülmüştür (Pawluskive ark 2009).

Kemirgenlerde, E2 hipokampal işlevi ve hafıza performansını iyileştirir. E2 genellikle bilişsel işlevi güçlendirici olarak etki eder. E2'nin nesne tanıma belleği üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla overektemize İsviçre fareleri üzerinde yapılan çalışmada, E2'nin rolünün ERα aktivasyonu ile bağlantılı olduğu ve bunun fosfo-ERK1'in artırılmasıyla sonuçlandığı gösterilmiştir (Pereira ve ark 2014).

Estradiol, bellek üzerindeki etkilerini hormon seviyelerine ve farklı östrojen reseptörlerinin nöral devreler içindeki etkileşimlerine bağlı olarak gerçekleştirir. Reseptöre özgü agonistler kullanılarak yapılan çalışmalarda, üç östrojen reseptörünün (ERα, ERβ ve G-protein bağlı östrojen reseptörü) de kinaz sinyallemesini hızla aktive ettiği ve bellek üzerinde doza bağlı kompleks etkileri olduğu gösterilmiştir. Reseptör nakavt fareleri ile yapılan çalışmalarda ise, estradiol seviyeleri düştükçe ERα'nın transkripsiyonu ve hafızayı koruduğu görülmüştür (Bean ve ark 2014).

ERα ve ERβ çekirdeklerde yer almanın yanı sıra hücre zarında da yer alır ve GPER1(G-protein bağlı östrojen reseptörü 1) hücre zarında da bulunur. Özellikle öğrenme ve bellekle ilişkili olan prefrontal korteks, dorsal striatum, nükleus akkumbens ve hipokampusta zarla ilişkili ER'ler görülür. Bundan dolayı, östrojenlerin bu bölgelerde gösterdikleri hızlı etkiler için bir mekanizma sağlanmış olur. Östrojenlerin dopamine bağımlı biliş üzerindeki etkileri, muhtemelen hem nükleer hem de membranla ilişkili ER'lere bağlanma kaynaklı gerçekleşir. Bu yüzden

membranla ilişkili ER'lerin lokalizasyonunun aydınlatılması, östrojenlerin dopamine bağımlı bilişsel etkilerinin daha net anlaşılmasını sağlar (Almey ve ark 2015).

ERα ve ERβ'nın transkripsiyon ve öğrenmedeki rolünü incelemek için yapılan bir çalışmada, Erβ'nın işlevlerinden birinin hipokampusta ERα aracılı transkripsiyonu düzenlemek olduğu gösterilmiştir. Elde edilen veriler, ERα ve ERβ'nın yaşlanma sırasında hipokampal işlevlerin korunmasında yer alan transkripsiyonu düzenlemek amacıyla hormonlarla etkileşime girdiğini göstermektedir (Han ve ark 2013).

Erkeklerde östrojenin öğrenme ve hafızadaki rolünün araştırıldığı bir çalışmada, ERα mRNA konsantrasyonlarının genel öğrenme motivasyonu davranışlarını olumlu yönde etkilediği görülmüştür. Bu bağlamda, ERα'nın yaşa bağlı farklılıklarda özel bir rolü olduğu düşünülür (Meyer ve Korz 2013).

Liu ve ark (2008)'nın yaptığı bir çalışmada, ERβ'nın östrojenin hipokampal sinaptik plastisite ve hafıza üzerindeki etkilerine aracılık ettiği gösterilmiştir. ERβ agonistleri, in vivo anahtar sinaptik proteinleri, PSD-95, sinaptofizin ve AMPA reseptör alt birimi GluR1 dahil, arttırmıştır. Hipokampal dilimlerde, ERβ aktivasyonu ile uzun vadeli güçlenme artmıştır. ERβ aktivasyonu ile in vivo olarak hipokampal nöronlarda, dendritik dallanma ve mantar tipi dikenlerin yoğunluğunun artması gibi morfolojik değişiklikler meydana gelmiştir. ERβ agonisti, hipokampusa bağlı hafıza görevlerinde de performansı iyileştirmiştir. Bu bağlamda, Erβ aktivasyonunun hipokampal sinaptik plastisiteyi düzenleyebileceği ve hipokampusa bağlı bilişi iyileştirebileceği gösterilmiştir.

Overiektomize dişi kemirgenlere, sistemik olarak veya doğrudan hipokampusa, estradiol veya spesifik agonistler verilerek yapılan çalışmalarda, çeşitli bilişsel görevlerde öğrenmeyi ve hafızayı geliştirdiği görülmüştür. Buna göre, akut veya kronik tedaviler bilişsel işlevleri geliştirilebilir. Aynı tedavi koşulları altında, bu değişikliklerin östrojen hafıza süreçlerini etkileme yeteneği olarak, hipokampusun CA1 bölgesindeki piramidal nöronlardaki dendritik omurga yoğunluğu ve medial prefrontal korteks artışı gösterilebilir. Östrojen tedavisi ile birlikte bu alanlarda noradrenerjik, dopaminerjik ve serotoninerjik aktivitenin de değiştiği görülmektedir. Östrojen tedavisi ile hafıza geliştirmeleri ve artmış omurga yoğunluğu dişi

kemirgenlerin yanı sıra, kısırlaştırılmış erkeklerde de gözlenmektedir (Luine ve Frankfurt 2020).

Estradiolün, sistematik bir şekilde uygulandığı zaman sosyal ve nesne tanıma hafızasını, uzamsal hafızayı ve sosyal öğrenmeyi hızla geliştirdiği yapılan çalışmalarda gözlenmiştir. Dorsal hipokampus, nesne, sosyal ve uzamsal kısa süreli belleğin östrojen hızlı kolaylaştırılmasına, medial amigdala ise, sosyal tanımanın hızlı bir şekilde kolaylaştırılmasına aracılık eder. ERα, ERβ ve GPER, göreve ve beyin bölgesine bağlı olarak değişik roller oynamaktadır. ERα ve GPER agonistlerinin, sistemik bir şekilde veya doğrudan dorsal hipokampusa uygulandığı zaman kısa süreli sosyal ve nesne tanıma ve mekansal hafızayı hızla kolaylaştırdığı; medial amigdalada ise sosyal tanımayı kolaylaştırdığı görülmüştür. Yalnızca GPER'nin ise, sistemik tedavinin ardından sosyal öğrenmeyi kolaylaştırabildiği; ayrıca, bir ERβ agonistinin, sistemik bir şekilde veya hipokampusa verildiği zaman sadece kısa süreli uzamsal hafızayı hızla geliştirdiği, ancak bunun yanı sıra medial amigdalada sosyal tanımayı kolaylaştırdığı görülmüştür. Yapılan çalışmalarda, hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) ve fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) yollarının da östrojenlerin kısa süreli bellek üzerindeki hızlı etkilerinin ardında yatan mekanizmalara dahil olduğu gösterilmiştir (Paletta ve ark 2018).

Son araştırmalarla, östrojenlerin, sosyal tanınmayı hızla kolaylaştırmak için oksitosin nöropeptidi ile etkileşime girdiği gösterilmiştir. Östrojenler ile oksitosinin ve dopamin ile asetilkolin gibi çeşitli nörotransmitterlerin üretimi ve salınımı artabilmektedir. Bu etkileşimler ve östrojenlerin kısa süreli bellek üzerindeki etki mekanizmaları ile ilgili daha fazla araştırma gerekmektedir: Ancak, östrojenlerin kısa süreli hafıza üzerindeki hızlı etkileri, çeşitli nörotransmitterlerin düzenlenmesi yoluyla ortaya çıkabilmektedir (Paletta ve ark 2018).

17β-estradiol'ün ve bir ERα agonistinin, sistemik olarak uygulandığı zaman veya dorsal hipokampusta infüze edildiğinde sosyal tanıma, nesne tanıma ve nesne yerleştirme görevlerindeki performansı arttırdığı, buna karşılık, sistemik ve dorsal hipokampal ERβ aktivasyonunun sadece uzamsal öğrenmeyi desteklediği görülmüştür.Ayrıca, 17β-estradiol, ERα ve GPER agonistlerinin, CA1 hipokampusunda dendritik omurga yoğunluğunu arttırdığı daha önceki çalışmalarla gösterilmiştir (Lymer ve ark 2017).

Yapılan çalışmalarda, östrojen tedavisinin, sağlıklı postmenopozal kadınlarda sözel bellekteki azalmaya karşı koruma sağladığı ve Alzheimer hastalığı (AD) riskini düşürdüğü görülmüştür. Menopoz sonrası yıllarda östrojen tedavisi, kadınlarda yaşamlarının sonraki bölümünde bilişsel yaşlanmaya karşı koruma sağlayabilir (Sherwin 2002).

Daha önceki çalışmalar, semptomatik postmenopozal kadınlarda östrojen tedavisinin bilişsel işlevi geliştirdiğini göstermektedir. Ancak, Kadın Sağlığı Girişimi Çalışmasının (WHIMS) sonuçları, 65 yaş üstü kadınlarda bu sonucu desteklememektedir. AD'li kadınlarda östrojenlerin rutin terapötik kullanımı AD'den korunmada rol oynayabilir. Yalnızca menopoz semptomları bulunan kadınlarda menopozdan sonraki birkaç yılda HRT (hormon replasman tedavisi) kullanımı desteklenmektedir (Markou ve ark 2005).

Östrojenin potansiyel nöroprotektif etkileri arasında beta-amiloidi düşürmek, kolinerjik fonksiyonu güçlendirmek, sinaptik plastisiteyi ve sinir süreci büyümesini desteklemek, oksidatif stresi azaltmak ve beyin glikoz taşınmasını arttırmak sayılabilir (Pinkerton ve Henderson 2005).

Estradiol, prefrontal korteks ve hipokampusdaki sinaptik devrelerin işlevinin ve esnekliğinin düzenlenmesine yardımcı olur. Nükleer östrojen reseptörleri tarafından transkripsiyonel aktivitenin düzenlenmesi ve plazma zarı ile bağlantılı östrojen reseptörleri tarafından aktive edilen hücre içi sinyalleşme kaskadları da estradiol tarafından ortaya çıkarılan mekanizmalarda aracı olarak rol oynar. Ayrıca, estradiolün, beyin kaynaklı nörotrofik faktör, insülin benzeri büyüme faktörü-1 ve Wnt gibi bilişin düzenlenmesi içinde yer alan çeşitli faktörlerin sinyallemesi ile etkileşimi de mekanizmalar arasında bulunmaktadır (Arevalo ve ark 2015).

Östrojen seviyeleri, dişinin ömrü boyunca bellek üzerinde etkilidir. Östrojen seviyelerinin artmasıyla, PFC (medial prefrontal korteks) ve hipokampustaki piramidal hücrelerde daha yüksek dendritik diken yoğunluğu ve gelişmiş hafıza fonksiyonu görülmektedir. Dendritik dikenlerin artmasını ve hafıza işlevinin gelişmesini sağlayan büyüme faktörü BDNF'dir. Östrojenlerin, PFC'de ve hipokampusta BDNF seviyelerinin artmasına neden olduğu görülmüştür (Luine ve Frankfurt 2013).

Yetişkin kadınlarda, overektomi ve estradiol replasmanı ile birlikte, östrus döngüsü boyunca, gebelikte ve yaşlılıkta tanıma belleğindeki dalgalanmalarla beraber, dolaşımdaki estradiol, BDNF seviyeleri ve PFC'deki ve hipokampustaki omurga yoğunluğu değişiklikleri ile benzer değişiklikler görüldüğü daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca, estradiol ve BDNF'in, hızlı membran etkileri yoluyla omurga plastisitesini ve CREB yoluyla daha yavaş transkripsiyonel düzenlemeyi uyardığı görülmüştür. Ek olarak estradiolün, BDNF seviyelerini, nükleer reseptörler üzerindeki etki yoluyla arttırdığı kanıtlanmıştır. Bu bağlamda, östrojenler ve BDNF, yaşa bağlı ve nörodejeneratif hafıza kaybını tedavi etmede yeni ve daha etkili stratejiler için temel teşkil edebilir; ancak östrojenlerin ve BDNF'nin bellek üzerindeki kesin etki mekanizmaları hala belirsizliğini korumaktadır (Luine ve Frankfurt 2013).

Öğrenme ve hafıza için kritik olan ERK yolu 17β-estradiol E2 tarafından aktive edilir (Fernandez ve ark 2008).

ERβ'nın aktivasyonu ve L-tipi kanallar yoluyla hücre içi Ca^{2+} akışının uyarılması ile bellek mekanizmalarının östrojen teşviki arasında ilişki olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, ERα ve Erβ'nın, östrojen nöro-korumasına aracılık etmek için, MAPK sinyalinin aktivasyonuna bağlı olacak şekilde, eşit derecede kritik rol oynadığı görülmüştür.Bununla birlikte, mevcut analizler östrojenin, muhtemelen nükleer olmayan bir sitoplazma veya zarla ilişkili ER aracılı hızlı sinyalleşme kaskadı yolu aracılığıyla nöronal hayatta kalmayı sağladığını göstermektedir (Zhao ve Brinton 2007).

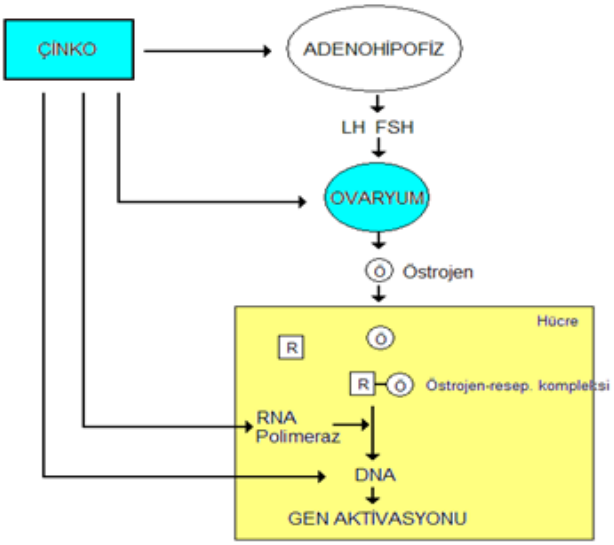
Östrojen replasmanı ile genç sıçanlarda dendritik dikenlerin sayısı ve hipokampal CA1 bölgesinde yer alan aksospinöz sinapsların yoğunluğunun arttığı görülmüş, ancak bu durum yaşlı sıçanlarda gözlenmemiştir. ERα, genç hayvanlarda CA1 piramidal hücrelerinin bazı dikenlerinde yerleşmiştir ve bu yüzden bu sürece lokal olarak dahil olabilir (Adams ve ark 2002).

Östrojenin, östrojen reseptörleri aracılığıyla transkripsiyon ve hızlı sinyal iletim basamaklarındaki membran etkileri, sonuçta transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyon durumu üzerinde etkileri olabilir. Yaşlanan fizyolojiye karşı Ca^{2+}ve G-protein kaskadları orta yaşlı hayvanlarda membran üzerinde etkilidir. Ek olarak,

östrojenin, yaşla birlikte azalan sinyal iletim basamaklarının elemanları için transkripsiyona yol açtığı görülmüştür (Foster 2005).

1.9. Çinko Östrojen İlişkisi

Çinko kadın üreme fizyolojisinde de önemli rol oynar (Baltacı ve ark 2019). Gerçekleştirilen bir çalışmada; çinko eksik diyetle beslenen dişi sıçanlarda LH ile FSH düzeylerinin anlamlı şekilde baskılandığı ortaya konulmuştur (Vallee ve Auld 1989). Çinko eksikliğinin dişilerde LH ve FSH'ın üretim ve salınımını bozarak, anormal ovaryum gelişimine neden olduğu, östrojen salgısını azalttığı, buna paralel olarak da östrus siklusunu bozduğu bildirilmiştir (Stallard ve Reeves 1997) Çinkonun dişi ve erkek üreme sistemi üzerindeki etkilerinde belki de en temel mekanizma, çinko ile hormon reseptörleri arasındaki ilişkidir (Baltacı ve ark 2019, Om ve Chung 1996). Dişi ve erkek üreme sisteminden salgılanan cinsiyet hormonları spesifik reseptörlerine bağlanır (Vallee ve Auld 1989, Dylewski ve ark 1986). Hormon-reseptör kompleksi nukleusta bir çinko metalloenzim olan RNA polimeraza ve spesifik DNA segmentine bağlanır (Dylewski ve ark 1986; Resim 1). Çinko eksikliği hormon-reseptör kompleksinin DNA'ya bağlanmasını önler. Bu durumda bu reseptörler tarafından regüle edilen genlerin aktivasyonu engellenir (Dylewski ve ark 1986). Bu olay çinko eksikliğiyle ilgili endokrinolojik anormalliklerin en azından bir kısmını açıklar (Vallee 1993, Dylewski ve ark 1986). Çinko RNA polimerazın aktivitesini de doğrudan etkiler (Dylewski ve ark 1986). Bu olayda çinko eksik hayvanlarda östrojenlere olan duyarsızlığı açıklayan bir mekanizma olarak kabul edilebilir (Vallee ve Auld 1989, Dylewski ve ark 1986).



Şekil 1.1. Çinko ve kadın üreme sistemi.

Bu çalışmanın amacı da gebelik döneminde çinko eksik diyetle beslenen sıçanlarda, doğum stresi, çinko eksikliği ve desteğinin hipokampal östrojen reseptör ekspresyonu ile bilişsel fonksiyonlar üzerindeki etkilerinin araştırılmasıdır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edilen Wistar cinsi dişi sıçanlar üzerinde aynı merkezde gerçekleştirildi. Çalışma protokolü Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Etik Kurulu tarafından 27.03.2020 tarih ve 2019-22 sayılı kararıyla onaylandı.

2.1. Hayvan Materyali ve Gruplar

Çalışmada kullanılacak hayvanların elde edilmesi için 15 adet erişkin dişi sıçan, 5 adet erişkin dişi sıçan rastgele olarak seçildi. Sıçanların çiftleşmesi ve gebelik oluşturulması harem usulü yoluyla gerçekleştirildi. Belli bir süreden sonra (10 gün) erkek sıçanlar kafeslerden ayrıldı. Dişi sıçanlar günde 2 kez (sabah saat 8:00 ve akşam 17:00) gebelik açısından kontrol edildi. Gebelik vajinal plağın (embriyonik gün 0) varlığı ile saptandı.

2.1.1. Deney Grupları

Gebeliği saptanan 15 adet dişi sıçan gebelik başlangıcından doğum sonrası yavrularından ayrılacakları 21. Güne kadar çinko eksik (28,20 mg/kg) diyetle beslendiler. Yavru sıçanlar (21 günlük) ayrıldıktan sonra anne sıçanlar aşağıdaki şekilde gruplara ayrıldı:

Grup 1 (n=5) Çinko eksik diyetle beslenen grup: Yavrularından ayrıldıktan sonra, çalışmanın sonlandırılacağı zamana kadar çinko eksik diyetle (28,20 mg/kg) beslenen anne sıçanlardan oluşturulan grup.

Grup 2 (n=5) Çinko takviyeli diyetle beslenen grup: Yavrularından ayrıldıktan sonra, standart sıçan yemine ilave olarak çalışmanın sonlandırılacağı zamana kadar (66-70 günlük) çinko takviyeli (5 mg/kg/gün intraperitoneal çinko sülfat) diyetle beslenen anne sıçanlardan oluşturulan grup.

Grup 3 (n=5) Normal diyetle beslenen grup: Yavrularından ayrıldıktan sonra, çalışmanın sonlandırılacağı zamana kadar, standart sıçan yemiyle beslenen anne sıçanlardan oluşturulan grup.

Grup 4 (n=5) kontrol grubu: Bu grubu oluşturan sıçanlar normal diyetle beslenen ve deney gruplarıyla aynı dönem gebe kalmış ve doğum yapan annelerden rastgele olarak seçildi. Bu grubu oluşturan hayvanlar standart sıçan yemiyle beslenen, anne sıçanlardan oluşturuldu.

2.2. Davranış ve Öğrenme testleri

2.2.1. Morris Su Tankı Deneyleri I. Aşama

Hayvanların uzamsal öğrenme ve hafızaları, Morris su tankı kullanılarak test edildi. Morris su tankı, 60 cm yüksekliğinde, 150 cm çapında paslanmaz çelikten yapılmış, siyah ve büyük bir dairesel havuzdur. Suyun sıcaklığı otomatik ısıtıcı sayesinde 23±1°C seviyelerinde korunabilmektedir. Su yüzeyinin 1 cm altına, çapı 8 cm olan sabit konumlu ve siyah renkli bir platform yerleştirildi. Platform sıçanın yüzme zorluğundan kaçmak için üzerine rahatça tırmanabileceği bir şekilde yapıldı. Platformun yerini gizlemek için su, toksik olmayan siyah bir boya (Mixol konsantre boya renklendirici 20 ml No:1 Siyah) ile renklendirildi.

Havuz, kuzey, güney, doğu, batı olarak 4 varsayımsal çeyrek daireye bölündü. Veriler, havuzun merkezi üzerinde tavana sabitlenmiş video izleme sistemine bağlı bir video kamera ile elde edildi. Morris su tankı testlerine başlanmadan önce tüm gruplardaki sıçanlara (21. günden sonra), su tankına ve ortama alışmaları için 2 gün süreyle günde 4 tekrar şeklinde platformsuz ön eğitim yaptırıldı (Testler, kontrol grubundaki hayvanlara da diğer gruplarla eş zamanlı olarak uygulandı). Ön eğitimler bittikten sonra (3. günden itibaren) uygulama ve operasyonlar öncesi davranış testlerine geçildi ve 4 gün süreyle günde 4 tekrar olacak şekilde veriler kaydedildi. 4 günlük bu testin ardından patform, bulunduğu yerden kaldırılarak (probe testi) 90 sn süreyle hayvanların tank içerisindeki kayıtları alınarak veriler analizler için kaydedildi.

2.2.2. Morris Su Tankı Deneyleri II. Aşama

Deney hayvanlarına gerçekleştirilen uygulamalardan sonra (66-70.gün arası) birinci aşamada olduğu gibi Morris su tankı deneyleri tekrarlanarak veriler kaydedildi. Davranış testleri bittikten sonra elde edilen veriler EthoVision XT10

Image Analysis (Noldus İnformation Tech.) software programı yardımıyla analiz edilerek, istatistik analizler kısmında belirtilen testler kullanılarak karşılaştırıldı.

2.3. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması

Çalışmada davranış ve öğrenme testleri tamamlandıktan 24 saat sonra hayvanların tamamı genel anestezi altında (Ketamine hydrochloride "Ketalar, Parke-Davis" ile xylazine "Rompun,Bayer" kombinasyonunun kas içi uygulanmasıyla) sakrifiye edilerek kan ve hipokampal doku örnekleri alınarak analiz zamanına kadar -80^0C'de muhafaza edildi.

2.4. Biyokimyasal Analizler

2.4.1. Hipokampus Dokusunda Östrojen Reseptör Alfa Analizi

Bioassay Technology Laboratory Östrojen Reseptör Alfa Elisa test kiti (katalog no: E1540Ra) kullanılarak gerçekleştirildi. Kitin duyarlılığı 0,022 ng/ml, gün içi CV'si < % 15, günler arası CV'si < % 15 idi. Tespit edilebilir aralığı 0,05 ng/ml - 20 ng/ml'dir.

Elisa kit içeriği:

1. 96 kuvetten oluşan mikroküvet

2. Yıkama solusyonu (20X)

3. Standart stok

4. Antikor

5. HRP-konjugat

6. Substrat A

7. Substrat B

8.TMB substrat

9. Stop solüsyon

10. Biotinylated Rat ERa Antibody

11. Standart diluent

Kit içeriğinin hazırlanması:

1. Yıkama tamponu: Oda sıcaklığında bekletilip görünür kristaller çözüldükten sonra 15 ml yıkama tamponu distile su ile 300 ml olacak şekilde çözdürülüp hazırlandı.

2. Standart hazır halde idi. 24 ng/ml, 12 ng/ml, 6 ng/ml, 3 ng/ml, 1,5 ng/ml, 0 pg/ml olarak 6 standart kullanıldı.

Analizin yapılışı:

1. Tüm reaktifler, standart solüsyonları ve numuneler kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi

3. Standart kuyularına 50 µl standart eklendi.

4. Numune kuyularına ise 40 µl numune eklendi ve ardından numune kuyularına 10 µl anti-ERα antikoru eklendi. Daha sonrasında numune kuyularına ve standart kuyulara 50 µl streptavidin-HRP eklenerek 37°C'de 60 dakika inkübe edildi.

5. Sonrasında plate 5 kez yıkama tamponu ile yıkandı.

6. Her kuyucuğa 50 µl substrat solüsyonu A eklendi ve ardından her kuyuya 50 µl substrat solüsyonu B eklenerek karanlıkta 37°C'de 10 dakika inkübe edildi.

7. Her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklendi.

8. Stop solüsyonunu ekledikten sonra 10 dakika içinde 450 nm'ye stop solusyon ilave edildi. 450 nm de BMG-LABTECH marka SPECTRO star Nano Elisa cihazında (Germany) okutuldu. Değerler ng/ml olarak hesaplandı.

2.4.2. Hipokampus Dokusunda Östrojen Reseptör Beta Analizi

Bioassay Technology Laboratory Östrojen Reseptör Beta Elisa test kiti (katalog no: E1121Ra) kullanılarak gerçekleştirildi. Kitin duyarlılığı 0,29 ng/ml,

gün-içi CV‘si < % 15, günler-arası CV‘si < % 15 idi. Tespit edilebilir aralığı 0,5 ng/ml - 100 ng/ml dir.

Elisa kit içeriği:

1. 96 kuvetten oluşan mikroküvet

2. Yıkama solusyonu (20X)

3. Standart stok

4. Antikor

5. HRP-konjugat

6. Substrat A

7. Substrat B

8.TMB substrat

9. Stop solüsyon

10. Biotinylated Rat ERa Antibody

11. Standart diluent

Kit içeriğinin hazırlanması:

1. Yıkama tamponu: Oda sıcaklığında bekletilip görünür kristaller çözüldükten sonra 15 ml yıkama tamponu distile su ile 300 ml olacak şekilde çözdürülüp hazırlandı.

2. Standart hazır halde idi. 64 ng/ml, 32 ng/ml, 16 ng/ml, 8 ng/ml, 4 ng/ml, 0 pg/ml olarak 6 standart kullanıldı.

Analizin yapılışı:

1. Tüm reaktifler, standart solüsyonları ve numuneler kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi

3. Standart kuyularına 50 µl standart eklendi.

4. Numune kuyularına ise 40 µl numune eklendi ve ardından numune kuyularına 10 µl anti-ERα antikoru eklendi. Daha sonrasında numune kuyularına ve standart kuyulara 50 µl streptavidin-HRP eklenerek 37°C'de 60 dakika inkübe edildi.

5. Sonrasında plate 5 kez yıkama tamponu ile yıkandı.

6. Her kuyucuğa 50 µl substrat solüsyonu A eklendi ve ardından her kuyuya 50 µl substrat solüsyonu B eklenerek karanlıkta 37°C'de 10 dakika inkübe edildi.

7. Her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklendi.

8. Stop solüsyonunu ekledikten sonra 10 dakika içinde 450 nm'ye stop solusyon ilave edildi. 450 nm de BMG-LABTECH marka SPECTRO star Nano Elisa cihazında (Germany) okutuldu. Değerler ng/ml olarak hesaplandı.

2.4.3. Serum çinko analizleri

Deney hayvanlarından elde edilen serum örneklerinde çinko seviyelerinin belirlenebilmesi alınan kan örnekleri santrifüj edilip serumları ayrıştırıldıktan sonra, plastik kapaklı tüpler içerisinde analiz zamanına kadar -80 ^{o}C'de muhafaza edildi.

Serum örnekleri, %1'lik Triton X-100 (Sigma Chemical Co: T-9284) çözeltisi ile 1/50 oranında dilue edilmek suretiyle çinko düzeylerinin tayini Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak bölümünde bulunan inductively coupled plasma emission spectrophotometry (ICP-AES; Varian Australia Pty LTD, Australia) atomik emisyon cihazında gerçekleştirildi. Sonuçlar µg/dl olarak belirlendi.

2.5. Hipokampus dokusunda RNA İzolasyonu

Real-Time-PCR yöntemi ile ZnT3 geninin ekspresyon analizinin yapılması için öncelikle total RNA izole edildi ve bunun için hazır ticari kit (Bio Basic; Kanada) kullanıldı.

Hipokampus dokusundan 25-50 mg alındı ve 1 ml lizis buffer (miRNA Extractor) ilave edilerek homojenizatör (SONOPULSmini20, BANDELİN; Almanya) yardımı ile parçalandı. Örneklerin tamamen parçalandığından emin olmak

için oda sıcaklığında 5-10 dakika inkübe edildi. Ardından 30 saniye vorteksleyerek 0,2 ml (200 µl) kloroform eklendi. Bu işlemin ardından kit kılavuzunda belirtildiği gibi 4°C'de 10 dakika boyunca 12.000 × g'de santrifüj edildi. Santrifüjleme sonunda süpernatant temiz bir 1,5 ml RNaz içermeyen santrifüj tüpüne aktarıldı, 1,5 hacimde %100 etanol ilave edildi ve birkaç kez yukarı ve aşağı pipetlenerek iyice karıştırıldı. Elde edilen çözelti Spin Kolonuna aktarıldı ve 12,000 × g'de 2 dakika santrifüj edildi ve nükleik asit molekülü kolana sabitlendi. Spin Kolona 0,5 ml RPE Solüsyonu eklendi, 30 saniye boyunca 12,000 × g'de santrifüj edildi. Bu işlem birkaç kez tekrar edildi. Yeni bir 1,5 ml santrifüj tüpüne kolon yerleştirildi. 50 µl RNaz içermeyen su eklendi ve 2 dakika bekletildi. 30 saniye boyunca 12000 g'de santrifüjlendi. Elde edilen RNA çözeltisi -20 °C'de saklandı.

Elde edilen RNA'ların miktarı ve saflığını belirlemek için nanodrop (SMA 1000, Merinton, China) kullanıldı. Bu aşamada optik dansitelerinden hareketle (OD260/280) OD260/280 oranı 1,9 ve üzerinde olan RNA'lar çalışmada kullanıldı.

Ayrıca RNA'ların kullanılabilir olup olmadığı % 1'lik agaroz jelde yürütülerek ve spesifik 18S ve 28S bantları görülerek belirlendi. Ardından cDNA sentezine geçildi ve cDNA işlemine kadar elde edilen total RNA'lar -80^{0}C'de saklandı.

2.5.1. mRNA Örneklerinden Revers Transkriptaz PCR (RT-PCR) Yöntemi ile cDNA eldesi

Elde edilen total RNA içindeki mRNA'yı cDNA'ya çevirmek için hazır ticari kit (OneScript Plus, ABM; Canada) kullanıldı ve her bir örnekten eşit miktarda RNA kullanılarak protokolde belirtilen basamaklar sırası ile uygulandı (Çizelge 1).

Öncelikle Çizelge 1.'de belirtildiği gibi RNA-Primer karışımı hazırlanarak 65°C'de 5 dakika süreyle inkübe edilerek denatüre edildi.

Çizelge 1. mRNA'dan cDNA elde etmek için uygulanan RNA-primer karışımı.

Bileşim	Miktar
Total RNA	25ng
Random Primer	1 µl
10mM dNTP mix	1 µl
RNAse içermeyen su	2,5 µl

Ardından Çizelge 2.'de belirtildiği gibi cDNA sentez karışımı hazırlandı ve her bir örnek için 10 µl bu karışımdan alınıp RNA-primer karışımı üzerine ilave edildi. Her bir tüp dikkatlice karıştırıldıktan sonra Thermal Cycler (Biorad, ABD) cihazı ile revers transkripsiyon programı çalıştırıldı. Bu program öncelikle 25°C'de 10 dakika primer bağlanması, ardından 50°C'de 50 dakika cDNA sentezi ve ardından 85°C'de 5 dakika denatürasyon ve +4°C'de bekleme basamağını içermektedir.

Çizelge 2. mRNA'dan cDNA elde etmek için uygulanan cDNA sentez karışımı

Bileşim	Miktar
RT buffer	4 µl
Rinhibitor	0,5 µl
OneScriptRT	1 µl

Elde edilen cDNA % 2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi ve qPCR gerçekleştirene kadar -20°C'de saklandı.

2.5.2. ZNT3 Geninin İfade Düzeyinin belirlenmesi

Real-Time PCR reaksiyonları hazırlanırken, standart eğrilerin çizilebilmesi amacıyla herhangi bir uygulama yapılmayan (Kontrol grubu) dokulardan elde edilen cDNA örneğinden 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 ve 1/32 oranlarında seri dilüsyonlar hazırlandı. Real-Time PCR gerçekleştirilerek standart eğriler çizildi. Ayrıca primerin uygun sıcaklıkta bağlanabilmesi için sıcaklık aralıkları denenerek standardizyon yapıldı.

Hedef genlerin mRNA düzeyinde ekspresyon analizi için kullanılan primerler üretici firmada (Sentebiolab, Türkiye) sentezi yaptırılarak elde edildi. Çalışmada kullanılan primerlerden her bir reaksiyonda yaklaşık 50 ng olacak şekilde kullanıldı (Çizelge 3).

Çizelge 3. Gerçek zamanlı PCR için kullanılan primerler

Gen	Primer dizisi	Fonksiyonu
ZNT3 ileri	5'-ACCACCTTCCTCTTCTCTATCT-3'	Hedef gen
ZNT3 geri	5'-TCCCTTACAGGCTCAAATTCC-	Hedef gen

	3’	
GAPDH ileri	5’- GGGCCAAAAGGGTCATCATC	Referans gen
	-3’′	
GAPDH geri	5’- AACCTGGTCCTCAGTGTAGC -	Referans gen
	3’	

PCR reaksiyonları için hazır ticari kit (FastStart Essential DNA Green Master, İsviçre) kullanıldı. Reaksiyonlar toplamda 20 µl hacimde uygulandı. Reaksiyon içeriği 10 µl Master mix karışımı (Enzim, dNTP, Mg, tampon ve su), 1 µl cDNA, 1 µl ileri ve 1 µl geri primerler (10 pmol/µl) ve 7 µl RNAse içermeyen su şeklide hazırlandı.

Primerlerin optimizasyonu sonrası PCR şartları; ilk denatürasyon, 95°C’de 10 dakika, denatürasyon 95°C’de 10 saniye, bağlanma 60°C’de 10 saniye ve polimerizasyon 70°C’de 10 saniye olarak gerçekleştirildi ve döngü sayısı 45 olarak yapıldı. Melting curve analizi, 95°C’de 15 saniye, 60°C’de 10 saniye, 95°C’de 10 saniye olmak üzere 1 döngü şeklinde yapıldı. Tüm reaksiyonlar CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Amerika) cihazında gerçekleştirildi.

2.6. İstatistiksel Analiz

qPCR analizi Livak ve Schmittgen (2001)’in geliştirmiş oldukları 2 -ΔΔCT yöntemi kullanılarak yapılmıştır

Veriler IBM SPSS Statistics 22.0 (IBM Corp., Armonk, New York, ABD) istatistik paket programında değerlendirildi. İki grup arasındaki karşılaştırmalar tek yönlü ANOVA ile yapılmıştır. İstatistiki olarak anlamlı sonuçlarda ANOVA’yı takiben gruplar arası anlamlı farkı karşılaştırmak için Duncan testi yapıldı. $p<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Davranış Testleri

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada davranış testlerinden çalışmanın başlangıcında Probe 1 parametreleri karşılaştırıldığında en yüksek toplam yüzme mesafesi (TYM) ve en yüksek arenaya giriş sıklığı (AGS) Grup 4'de elde edildi ($p<0,05$). Yüzme hızı (YH) ve toplam yüzme süresi (TYS) yönünden gruplar arasında önemli bir farklılık tespit edilmedi (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Çalışma Gruplarının Probe 1 Düzeylerinin Karşılaştırılması.

Gruplar	N	TYM cm	YH cm/sn	AGS5 Probe	TYS sn
Grup 1	5	1026,08±87,48B	20,43±1,45	1,00±0,00B	60,04±0,00
Grup 2	5	1013,17±108,16B	19,02±1,87	1,00±0,49B	59,76±0,18
Grup 3	5	1006,53±59,25B	19,77±0,98	1,00±0,00B	60,04±0,00
Grup 4	6	1432,06±83,58A	22,23±1,23	3,13±0,65A	59,22±0,65

A,B,C: Aynı sütunda değişik harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($P<0,05$). (A> B).

Yine Probe 1 parametreleri içerisinde bulunan platformdan geçiş sıklığı (PGS) ile platformda geçirilen süre (PGSü) yönünden Grup 4'ün değerleri diğer çalışma gruplarının tamamından önemli şekilde yüksekti ($p<0,05$). Platforma ilk gelinen ana kadar geçen süre (PIGAKGS) yönünden gruplar arasındaki mukayese yine Grup 4'ün diğer gruplara oranla platforma daha erken sürede ulaştığı tespit edildi ($p<0,05$). Platform zonuna giriş sıklığı (PZGSı) yönünden en yüksek giriş sıklığı Grup 4'de tespit edildi ($p<0,05$, Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Çalışma Gruplarının Probe 1 Düzeylerinin Karşılaştırılması.

Gruplar	N	PGS	PGSü	PIGAKGS	PZGSı

Grup 1	5	0,65±0,77B	0,20±0,14B	23,28±2,02A	1,80±1.11B
Grup 2	5	0,80±0,58B	0,24±0,23B	23,20±7,18A	1,80±1,06B
Grup 3	5	0,60±0,40B	0,22±0,26B	27,56±10,83A	1,00±1.30B
Grup 4	6	2,13±0,47A	1,15±0,16A	03,20±0,52B	3,67±0.91A

A,B,C: Aynı sütunda değişik harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir (P<0,05). (A> B).

Platform zonunda geçen süre (PZGSü), Kuzeydoğu kadranına giriş sıklığı (KKGirişS) ve Kuzeydoğu kadranında kalınan süre (KKKS) yönünden gruplar arasında anlamlı bir farklılık oluşmadı. Platform zonuna ilk gelinen ana kadar geçen süre (PZIGAKGS) ve Kuzeydoğu kadranına ilk gelinen ana kadar geçen süre (KKİGAKGS) yönünden Grup 4'ün daha kısa sürelerde ilgili alanlara ulaştığı gözlendi (p<0,05, Tablo 3.3).

Tablo 3.3. Çalışma Gruplarının Probe 1 Düzeylerinin Karşılaştırılması.

Gruplar	N	PZGSü	PZIGAKGS	KKGirişS	KKKS	KKİGAKGS
Grup 1	5	0,46±0,23	24,22±10,42A	3,60±0,92	12,26±2,26	11,45±1,86A
Grup 2	5	0,78±0,18	22,24±7,74A	3,83±0,16	13,61±1,52	12,90±0,86A
Grup 3	5	0,50±0,34	20,39±9,60A	3,40±0,92	15,54±3,14	13,28±3,02A
Grup 4	6	1,710±0,60	8,97±3,45B	4,60±0,51	21,01±5,36	1,72±0,72B

A,B,C: Aynı sütunda değişik harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir (P<0,05). (A> B).

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada davranış testlerinden Probe 2 parametreleri çalışmanın bitiminde karşılaştırıldığında en yüksek toplam yüzme mesafesi (TYM), yüzme hızı (YH) ve toplam yüzme süresi (TYS) yönünden gruplar arasında önemli

bir farklılık tespit edilmedi. En yüksek arenaya giriş sıklığı (AGS) değeri Grup 2 ve Grup 4'de elde edildi ($p<0,05$, Tablo 3.4).

Tablo 3.4. Çalışma Gruplarının Probe 2 Düzeylerinin Karşılaştırılması.

Gruplar	N	TYM cm	YH cm/sn	AGS	TYS sn
Grup 1	5	1307,88±60,91	22,10±1,18	1,00±0,0B	59,36±0,68
Grup 2	5	1237,81±198,50	20,63±3,30	3,10±0,20A	60,04±0,00
Grup 3	5	1227,65±87,56	20,46±1,45	1,00±0,00B	60,04±0,00
Grup 4	6	1573,30±78,16	26,23±1,29	3,16±0,16A	60,03±0,00

Aynı sütunda değişik harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($P<0,05$). (A> B).

Yine Probe 2 parametreleri içerisinde bulunan platformdan geçiş sıklığı (PGS) ve platform zonuna giriş sıklığı (PZGSı) yönünden gruplar arasında anlamlı bir farklılık oluşmadı. Platformda geçirilen süre (PGSü) yönünden Grup 4'ün değerleri diğer çalışma gruplarının tamamından önemli şekilde yüksekti ($p<0,05$). Platforma ilk gelinen ana kadar geçen süre (PIGAKGS) yönünden gruplar arasındaki mukayesede yine Grup 4'ün diğer gruplara oranla platforma daha erken sürede ulaştığı tespit edildi ($p<0,05$, Tablo 3.5).

Tablo 3.5. Çalışma Gruplarının Probe 2 Düzeylerinin Karşılaştırılması.

Gruplar	N	PGS	PGSü	PIGAKGS	PZGSı
Grup 1	5	2,00±0,36	0,46±0,08B	21,11±3,78B	6,80±1,20
Grup 2	5	2,60±0,74	1,11±0,46B	15,45±6,10B	6,60±1,36
Grup 3	5	2,80±0,73	0,88±0,20B	18,84±7,36B	6,40±1,74

Grup 4	6	3,40±0,87	3,31±0,27A	6,80±2,16A	6,83±1,30

Aynı sütunda değişik harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir (P<0,05) (A> B).

Platform zonunda geçen süre (PZGSü) yönünden yapılan mukayesede Grup 2 ve Grup 4'ün diğer gruplara oranla platform zonunda daha uzun süre geçirdiği tespit edildi (p<0,05). Platform zonuna ilk gelinen ana kadar geçen süre (PZIGAKGS) yönünden ise Grup 2 ve Grup 4'ün platform zonuna diğer gruplardan daha erken ulaştıkları belirlendi (p<0,05). Kuzeydoğu kadranına giriş sıklığı (KKGirişS) ve Kuzeydoğu kadranında kalınan süre (KKKS) yönünden gruplar arasında anlamlı bir farklılık oluşmadı. Kuzeydoğu kadranına ilk gelinen ana kadar geçen süre (KKİGAKGS) yönünden Grup 2 ve Grup 4'ün daha kısa sürelerde ilgili alanlara ulaştığı gözlendi (p<0,05, Tablo 3.6).

Tablo 3.6. Çalışma Gruplarının Probe 2 Düzeylerinin Karşılaştırılması.

Gruplar	N	PZGSü	PZIGAKGS	KKGirişS	KKKS	KKİGAKGS
Grup 1	5	1,06±0,09B	14,27±3,68B	5,60±0,50	22,42±2,23	6,82±3,16A
Grup 2	5	2,90±0,52A	5,75±1,23A	5,40±0,97	23,00±3,09	2,24±1,71B
Grup 3	5	1,05±0,48B	13,29±5,14B	4,80±0,20	22,06±4,39	6,55±1,94A
Grup 4	6	2,95±0,26A	5,62±1,37A	6,00±0,93	19,80±3,23	2,02±2,04B

A,B,C: Aynı sütunda değişik harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir (P<0,05). (A> B).

3.2. Biyokimyasal Parametreler

Gerçekleştirdiğimiz araştırmada hipokampus dokusundaki en yüksek ERα ve ERβ düzeyleri çinko takviyesi yapılan Grup 2 ile Grup 4 (kontrol)'de elde edildi (p<0,001). Grup 3'ün aynı değerleri Grup 2 ve 4'den düşük, Grup 1'den ise daha yüksekti (p<0.001). Çalışmamızda en düşük ERα ve ERβ düzeyleri çinko eksik diyetle beslenen Grup 1'de elde edildi (p<0,001, Tablo 3.7).

Tablo 3.7. Çalışma Gruplarının Hipokampus dokusunda ERα ve ERβ seviyeleri (ng/ml).

Gruplar (n=5)	ERα (ng/ml)	ERβ (ng/ml)
Grup 1 Çinko Eksik	1,33±0,41^{C}	13,61±1,33^{C}
Grup 2 Çinko Takviye	2,94±0,26^{A}	21,42±0,85^{A}
Grup 3 Standart Diyet	2,32±0,32^{B}	17,79±1,66^{B}
Grup 4 Kontrol	3,02±0,23^{A}	22,76±1,71^{A}

*Aynı sütunda değişik harf taşıyan ortalamalar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,001$), (A> B>C).

Çalışmamızda hipokampus dokusundaki en yüksek ZnT3 gen ekspresyon düzeyleri çinko takviyesi yapılan Grup 2 ile Grup 4 (kontrol)'de elde edildi ($p<0,001$). Çinko eksik diyetle beslenenen Grup 1 ile Grup 3'ün ZnT3 gen ekspresyon aktivitesi Grup 2 ve 4'den daha düşük olarak tespit edildi ($p<0,001$, Tablo 3.8).

Çalışma grupları serum çinko düzeyleri yönünden mukayese edildiğinde en yüksek serum çinko düzeyleri çinko takviyesinin yapıldığı Grup 2'de elde edildi ($p<0,001$). Grup 4'ün serum çinko düzeyleri Grup 2'den düşük ($p<0,001$), Grup 1 ve 3'den daha yüksekti ($p<0,001$). Çalışmamızda en düşük serum çinko düzeyleri çinko eksik diyetle beslenen Grup 1'de elde edildi ($p<0,001$,Tablo 3.8).

Tablo 3.8. Çalışma Gruplarının Hipokampal ZnT3 (2-ΔΔ CT) ve serum çinko seviyeleri (µg/dl).

Gruplar (n=5)	ZnT3 (2-ΔΔ CT)	Serum Çinko (µg/dl)
Grup 1 Çinko Eksik	0,59±0,27^{B}	75,96±12,44^{D}
Grup 2 Çinko Takviye	1,54±0,13^{A}	185,60±22,40^{A}
Grup 3 Standart Diyet	1,03±0,13^{B}	120,52±15,62^{C}
Grup 4 Kontrol	1,46±0,41^{A}	148,17±20,43^{B}

*Aynı sütunda değişik harf taşıyan ortalamalar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,001$), (A> B>C).

4. TARTIŞMA

4.1. Davranış Testlerinin Tartışılması

Erken yaşam stresinin hayvan modelleri sıklıkla, sıçan yavrularının yaşamın ilk haftalarında günde birkaç saat annelerinden ayrıldığı duygusallık ve stres ekseninde bir dizi uzun süreli nörodavranışsal değişikliğe yol açan olayları gerektirir (Graham 2018). Bu olayın temelinde anneden ayrılma vardır. Anneden ayrılan yavrulardaki stres araştırıcıların yoğun ilgisini çekerken, bu ayrılığın anne üzerindeki etkisi fazla ilgi görmemiştir (Graham 2018). Birkaç çalışma yavrunun anneden ayrılmasının anne davranışını değiştirebileceğini ve annede kaygı ve depresyon benzeri davranışları artırabileceğini rapor etmiştir (Aguggia ve ark 2013, Boccia ve ark 2007, Maniam ve Morris 2010). Bu noktadan hareketle yavrusundan ayrılan sıçanların öğrenme ve depresyon araştırmalarında model olarak kullanılabileceği önerilmiştir (Graham 2018). Bununla birlikte, doğum sonrası kaygının gelişimi, annede meydana gelen depresyon veya bilişsel fonksiyonlardaki değişiklik hemen hiç incelenmemiştir.

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada; çalışmanın başlangıcındaki davranış test parametreleri karşılaştırıldığında en yüksek toplam yüzme mesafesi (TYM) ve en yüksek arenaya giriş sıklığı (AGS), platformdan geçiş sıklığı (PGS) ile platformda geçirilen süre (PGS) yönünden Grup 4'ün değerleri diğer çalışma gruplarının tamamından önemli şekilde yüksekti ($p<0,05$). Platforma ilk gelinen ana kadar geçen süre (PIGAKGS), platform zonuna ilk gelinen ana kadar geçen süre (PZIGAKGS) ve kuzeydoğu kadranına ilk gelinen ana kadar geçen süre (KKİGAKGS) yönünden Grup 4'ün diğer gruplarla mukayese edildiğinde daha kısa sürelerde ilgili alanlara ulaştığı gözlendi. Platform zonuna giriş sıklığı (PZGSı) yönünden en yüksek giriş sıklığı Grup 4'de tespit edildi.

Dört grup altında çalışmaya alınan deney hayvanlarının ortak özelliği aynı dönemlerde doğum yapmış, doğumu takiben 21 günün sonunda emzirme süreci tamamlanarak yavrularından ayrılmış anne sıçanlardır. Çalışmamızda ilk üç grubu oluşturan hayvanlar gebelik başlangıcından itibaren çinko eksik diyetle beslenmeye başlanmış, yavrularından ayrılacakları güne kadar da çinko eksik diyetle beslenmeye devam etmişlerdir. Grup 4'ü oluşturan sıçanlar ise gebelikleri boyunca ve

yavrularından ayrılacakları güne kadar standart sıçan yemiyle beslenmişlerdir. Yukarıda sunulan davranış testleriyle ilgili bulgular bu yönüyle incelendiğinde çinko eksik diyetle beslenen sıçanların davranış parametrelerinin Grup 4'le mukayese edildiğinde önemli ölçüde bozulduğu görülmektedir. Bu bulgu bize doğum stresi ve/veya yavrulardan ayrılma stresinin değil çinko eksik diyetin anne sıçanlarda davranış parametrelerini etkilediğini göstermektedir. Çinkonun sıçanlarda bilişsel performansı artırdığı ve Alzheimer hastalığı ve benzeri olaylarda bilişsel bozulmayı iyileştirmek için makul bir terapötik müdahale olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir (Sandusky-Beltran ve ark 2017). Çinko, sinaptik plastisite, öğrenme ve hafıza için önemli bir eser elementtir. Hem hamilelik sırasında hem de doğumdan sonra çinko eksikliği bilişsel performansı bozar ve hafıza eksikliklerine ek olarak dikkat, aktivite, nöropsikolojik davranış ve motor gelişimde değişikliklere neden olur (Contestabile ve ark 2016). Fakat aşırı çinko takviyesinin (normalden iki kat daha fazla) hipokampal bağımlı hafızanın konsolidasyonunu güçlü bir şekilde bozduğunun gösterilmesi (Contestabile ve ark 2016) öğrenme davranışlarında çinko dozunun önemli bir faktör olduğunu gösterir. Yu ve ark (2016) gerçekleştirdikleri çalışmalarında; hamilelik ve emzirme döneminde hafif çinko eksikliğinin yavrularda uzamsal öğrenme ve hafıza yeteneğinin bozulmasına yol açtığını ve intravenöz çinko takviyesi yerine oral çinko takviyesinin uzamsal öğrenme ve hafıza yeteneğindeki bozulmayı daha iyi düzeltebileceğini rapor etmişlerdir. Sonuç olarak çinko eksikliğinin bilişsel performansta bozulmaya yol açtığı iyi bilinmektedir (Hu ve ark 2017). Zaten öğrenme parametreleriyle ilgili yukarıda sunulan bulgularımız, sıçanlarda doğum stresi ve/veya yavrularından ayrılma stresinden daha çok diyetteki çinko eksikliğinin bilişsel performansı bozduğunu göstermektedir.

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada davranış testlerinden Probe 2 parametreleri çalışmanın bitiminde karşılaştırıldığında, platformda geçirilen süre yönünden (PGSü) Grup 4'ün değerlerinin diğer çalışma gruplarının tamamından önemli şekilde yüksek olduğu tespit edildi. Yine platforma ilk gelinen ana kadar geçen süre (PIGAKGS) yönünden gruplar arasındaki mukayesede yine Grup 4'ün diğer gruplara oranla platforma daha erken sürede ulaştığı tespit edildi. Platform zonunda geçen süre (PZGSü) yönünden yapılan mukayesede Grup 2 ve Grup 4'ün diğer gruplara oranla platform zonunda daha uzun süre geçirdiği tespit edilirken ($p<0,05$), platform zonuna ilk gelinen ana kadar geçen süre (PZIGAKGS) ile kuzeydoğu kadranına ilk gelinen

ana kadar geçen süre (KKİGAKGS) yönünden ise Grup 2 ve Grup 4'ün platform zonuna diğer gruplardan daha erken ulaştıkları belirlendi.

Çalışmamızın bu bölümünde gebelik başlangıcından itibaren yavrularından ayrılacakları güne kadar da çinko eksik diyetle beslenen sıçanlar 3 gruba ayrılmışlar ve 70 gün boyunca grup 1 çinko eksik diyetle beslenmeye devam etmiş, grup 2'yi oluşturan hayvanlara standart sıçan yeminin yanı sıra 70 gün boyunca 5 mg/kg/gün intraperitoneal çinko sülfat takviyesi yapılmış, grup 3'ü oluşturan sıçanlar ise 70 gün boyunca standart sıçan yemiyle beslenmişlerdir. Grup 4'ü oluşturan sıçanlarda ise diyet değişikliği yapılmamış çalışmanın sonlandırılacağı zamana kadar standart sıçan yemiyle beslenmişlerdir. Yukarıda sunulan davranış testleriyle ilgili bulgular bu yönüyle incelendiğinde, daha önce çinko eksik diyetle beslenen Grup 2'yi oluşturan sıçanlara 70 gün boyunca gerçekleştirilen intraperitoneal çinko sülfat takviyesinin daha önce bozulan bilişsel parametreleri büyük ölçüde iyileştirdiği görülmektedir. Oysa daha önce çinko eksik diyetle beslenen Grup 3'ü oluşturan sıçanlara 70 gün boyunca standart sıçan yemiyle beslenmeleri bozulan bilişsel performans parametrelerinde değişikliğe yol açmadı.

Maternal çinko eksikliğinin yavrularda öğrenme ve hafıza üzerindeki etkisini araştıran bir çalışmada sütten kesme sonrası çinko takviyesinin, erken yaşam çinko eksikliğinin neden olduğu bilişsel bozulmayı iyileştirdiği gösterilmiştir (Jiang ve ark 2020). Maternal çinko yoksunluğunun yavru sıçanlarda yol açtığı hipokampal nöron apoptozu ve bilişsel fonksiyonlardaki bozulmanın oral çinko takviyesiyle düzeltilebileceği Yu ve ark (2013) tarafından rapor edilmiştir. Çinko takviyesinin obeziteye bağlı metabolik disfonksiyonu kısmen tersine çevirdiği ve kafeterya (CAF) diyetinin neden olduğu nöroinflamasyonu ve hafıza açığını iyileştirdiği bildirilmiştir (de Oliveira ve ark 2021). Beyin fonksiyonunda çinko homeostazı kritiktir. Ancak çinko alımı zaten normal olduğunda çinko takviyesinin nörolojik fonksiyon için faydalı olup olmadığı belirsizdir. Bununla birlikte çinko eksikliği durumunda, eksikliğin çinko takviyesiyle düzeltilmesi sinaptik iletimi ve dolayısıyla bilişsel performansı iyileştiren buna ilave olarak da nöroinflamasyonu azaltan sistemik faydalar sağlar.

Çalışmamızın bilişsel performans parametreleriyle ilgili bu bölümünde doğum stresi ve/veya yavrudan ayrılma stresinden bağımsız olarak anne sıçanlarda

bilişsel performansta meydana gelen bozulmanın gebelik ve emzirme döneminde çinko eksik diyetle beslenmenin bir sonucu olduğu, çinko eksikliğinde ortaya çıkan bilişsel performanstaki bozulmanın ise çinko takviyesiyle önlenebileceği gösterilmiştir. Bu bölümle ilgili vurgulanması gereken bir başka sonuç ise, çinko eksikliğinde ortaya çıkan bilişsel performanstaki bozulmanın 70 gün süreyle standart sıçan yemiyle beslenmeden sonra bile düzeltilemediğidir.

4.2. Biyokimyasal Parametrelerin Tartışılması

4.2.1. Serum Çinko Seviyelerinin Tartışılması

Çalışmamızda en yüksek serum çinko düzeyleri çinko takviyesinin yapıldığı Grup 2'de elde edildi. Grup 4'ün serum çinko düzeyleri Grup 2'den düşük ($p<0,001$), Grup 1 ve 3'den daha yüksekti. Çalışmamızda en düşük serum çinko düzeyleri çinko eksik diyetle beslenen Grup 1'de elde edildi. Serum çinko parametreleriyle ilgili en önemli husus çalışmamızda diyet uygulamalarının başarılı olduğunu gösteren verilerin elde edilmesidir. Özellikle maternal olarak oluşturulan çinko eksikliğini takiben, grup 2 sıçanlarına uygulanan 70 günlük çinko takviyesinin maternal çinko eksikliğini iyileştirdiği, ancak grup 3 sıçanlarında 70 günlük standart sıçan yemiyle beslemenin maternal çinko eksikliğini düzeltemediği görülmektedir. Bu bulgu özellikle diyette çinko eksikliği oluşturulan deneysel çalışmalarda önemli bir bulgu olarak kullanılabilir.

4.2.2. Hipokampus dokusundaki ERα ve ERβ Seviyelerinin Tartışılması

Gerçekleştirdiğimiz araştırmada hipokampus dokusundaki en yüksek ERα ve ERβ düzeyleri çinko takviyesi yapılan Grup 2 ile Grup 4 (kontrol)'de elde edildi. Grup 3'ün aynı değerleri Grup 2 ve 4'den düşük, Grup 1'den ise daha yüksekti. Çalışmamızda en düşük ERα ve ERβ düzeyleri çinko eksik diyetle beslenen Grup 1'de elde edildi.

Aromataz dahil tüm steroidojenik enzimler hipokampus dokusunda bulunur. 17β-estradiol (E2), hipokampusta nöroplastisite, nörogenez ve bilişin sinyal yollarına katkıda bulunur (Lu ve ark 2019). Hipokampusta E2 düzeylerinin erkek ve kadınlarda serumdan çok daha yüksek olduğu ve hipokampus kaynaklı E2'nin sinaps oluşumunda önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir (Marbouti ve ark 2020).

Hipokampal E2 (nöroestradiol) normal bilişsel performansta anahtar bir faktördür (Marbouti ve ark 2020). Muhtemelen bu anahtar rol, hipokampal ERα ve ERβ gen ekspresyonundaki değişikliklerle ilişkilidir (Marbouti ve ark 2020). E2'nin, öğrenme ve hafıza için gerekli olan sinaptik plastisite süreçlerinde yer alan sinyalleşme basamaklarını hızla aktive eden zardaki östrojen reseptörleri yoluyla hafızayı etkilediği düşünülmektedir (Foster 2012). Yaşlanma döneminde E2 seviyesindeki bir düşüş ERα/ERβ oranını değiştirir ve bunun sonucunda E2 yanıtında bir azalma meydana gelir (Bean ve ark 2014). Bu nedenle hormon replasman tedavisindeki östrojen dozu ERα veya ERβ'nın bilişsel işlev üzerindeki etkilerinde belirleyici olur (Bean ve ark 2014, Foster 2012). Östrojen eksikliği östrojen reseptör-alfa düzeyini azaltır. Azalan östrojen reseptör-alfa düzeyi hipokampusta apoptozu teşvik ederek öğrenme-hafıza bozukluklarına yol açar (Pandey ve ark 2020). Benzer şekilde yumurtalıkları alınmış sıçanlarda östrojen verilmesinin bozulmuş bilşsel fonkiyonları güçlendirdiği bu etkide ERα aktivasyonunun önemli rol oynadığı Pereira ve ark (2014) tarafından rapor edilmiştir. Sonuçta hipokampustaki östrojen reseptör aktivasyonu bilişsel performansla yakından ilişkilidir.

Gerçekleştirdiğimiz araştırmada çalışma gruplarının hipokampal ERα ve ERβ düzeyleri anne sıçanlarda doğum stresi ve/veya yavrularından ayrılma stresinden etkilenmedi. Ancak diyet çinko durumu hipokampal ERα ve ERβ düzeyleri üzerinde belirleyici oldu. Çalışmamızdaki en düşük hipokampal ERα ve ERβ seviyeleri çinko eksik diyetle beslenen anne sıçanlarda elde edildi. Çinko desteği ise hipokampal ERα ve ERβ seviyelerindeki baskılanmayı tersine çevirdi.

Çinko'nun, öğrenme ve hafıza dahil olmak üzere sayısız beyin fonksiyonunda önemli roller oynadığı bilinmektedir. Çinko eksikliğinin tüm dünyada, özellikle Alzheimer hastalarında yaygın olduğuna inanılmaktadır (Feng ve ark 2016). Diyet çinko eksikliğinden elde edilen kanıtlar, çinkonun beyne taşınmasının, büyüme ve olgunlaşmaya ek olarak bilişsel işlev için gerekli olduğunu göstermektedir (Sandstead ve ark 2014). Diyet çinko eksikliğinin neden olduğu beyne kronik çinko taşınması eksikliği, beyin hücre dışı sıvısındaki çinko konsantrasyonunu azaltır (Tamano ve ark 2016). Bu azalma, kan-BOS bariyeri yoluyla hipokampusa çinko taşınmasıyla bağlantılı olabilen hipokampustaki çinko konsantrasyonunda azalmaya yol açabilir ve veziküler çinko konsantrasyonunu

azaltabilir (Takeda ve Tamano 2017, Tamano ve ark 2016). Çinko eksik diyetle beslenen 0-2 aylık yavru sıçanlarda bilişsel performansın önemli derecede bozulduğu gösterilmiştir (Hu ve ark 2017). Gebelik ve emzirme döneminde anne sıçanlara oral yoldan verilen kadmiyumun, bu annelerden doğan yavruların hipokampuslarında çinko tükenmesine yol açarak bilişsel performansı bozduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada anne sıçanlara kadmiyumla beraber çinko sülfat uygulaması bu annelerden doğan yavruların hipokampuslarında kadmiyumun yol açtığı çinko tükenmesini önlemiş ve bilişsel performansın korunmasını sağlamıştır (Ben Mimouna ve ark 2018).

Çinkonun hipokampusla ilişkili olarak bilişsel fonksiyonlar üzerindeki kritik bir etkiye sahiptir. Yaptığımız Med-line taramalarda hipokampus- ERα ve ERβ-çinko- bilişsel fonksiyonlar ilişkisini kombine araştıran bir çalışmaya rastlayamadık. Ancak şurası kesindir ki; çinko steroid hormonların reseptör aktivitesine karışır (Baltaci ve ark 2019). Çinko 17β-Estradiol'ün spesifik reseptörlerine bağlanır. Hormon-reseptör kompleksi nukleusta bir çinko metalloenzimi olan RNA polimeraza ve spesifik DNA segmentine bağlanır (Baltaci ve ark 2019). Çinko eksikliği hormon-reseptör kompleksinin DNA'ya bağlanmasını önler (Baltaci ve ark 2019). Çinko RNA polimerazın aktivitesini de doğrudan etkiler (Baltaci ve ark 2019). Bu olayda çinko eksik hayvanlarda östrojenlere olan duyarsızlığı açıklayan bir mekanizma olarak kabul edilebilir (Baltaci ve ark 2019). Ancak çalışmamızda vurgulanması gereken en önemli nokta, çinko eksikliği hipokampal ERα ve ERβ aktivitesinden önce seviyelerinde baskılanmaya yol açmıştır. Bu yönüyle çalışmamızdaki çinko eksikliğiyle elde edilen hipokampal ERα ve ERβ seviyelerindeki baskılanma bu konuyla ilişkili ilk bulgu olarak takdim edilebilir.

4.2.3. Hipokampus dokusundaki ZnT3 gen ekspresyon düzeylerinin tartışılması

Çalışmamızda hipokampus dokusundaki en yüksek ZnT3 gen ekspresyon düzeyleri çinko takviyesi yapılan Grup 2 ile Grup 4 (kontrol)'de elde edildi. Çinko eksik diyetle beslenen Grup 1 ile Grup 3'ün ZnT3 gen ekspresyon seviyesi arasında anlamlı farklılık tespit edilmedi.

Yukarıdaki bulgularımıza dayanarak çalışma gruplarının hipokampal ZnT3 gen ekspresyon düzeylerinin anne sıçanlarda doğum stresi ve/veya yavrularından ayrılma stresinden etkilenmediği söylenebilir. Ancak diyet çinko durumu anne sıçanların hipokampal ZnT3 gen ekspresyon düzeyleri üzerinde belirleyici olmuştur.

Çinko, vücudun tüm hücrelerinde yapısal, enzimatik ve düzenleyici fonksiyonlara sahip önemli bir elementtir. Bazı nöronlarda çinko, çinko taşıyıcı 3 (ZnT3) tarafından sinaptik veziküllere yüklenir ve nöronal fonksiyonu modüle edebileceği sinaptik yarığa salınır. ZnT3 nakavt (KO) fareleri ZnT3'ten yoksundur ve dolayısıyla sinaptik çinkodan yoksundur (Thackray ve ark 2017). Çinko taşıyıcı 3 (ZnT3) ve veziküler çinkonun bilişsel fonksiyonlarla ilişkisinin araştırılması konusunda dikkat çekici bir ilgi vardır. ZnT3 geninden yoksun farelerin öğrenme ve hafızada yaşa bağlı eksiklikler sergilediği gösterilmiştir (Adlard ve ark 2010). Sindreu ve arkadaşları, ZnT3 gen yoksunluğunun farelerin bağlamsal ayrımcılığı ve uzamsal çalışma belleğini bozduğu bildirilmiştir (Sindreu ve ark 2011). Martel ve ark (2011) ZnT3 geni silinmiş farelerin ilk öğrenmede normal performans gösterdiğini ancak ikinci bir platform konumu bulmakta zorlandıklarını rapor etmiştir. Aynı çalışmada bu farelerin gelişmiş sosyal etkileşim sergiledikleri, ancak sosyal ve nesne tanıma belleği oluşturmada başarısız oldukları tespit edilmiştir (Martel ve ark 2011). Bu nedenle, ZnT3'ün hipokampus fonksiyonları ve bilişsel fonksiyonlarla yakın ilişkili olduğu kabul edilir. Yakın zamanda gerçekleştirilen bir çalışmada ZnT3'ün yetişkin hipokampal nörogenezinin korunmasında merkezi bir işlevi olduğu ve çinko takviyesinin hipokampal nörogenez üzerinde yararlı bir etkiye sahip olduğunu bildirilmiştir (Choi ve ark 2020). Aynı çalışmada yaralanma sonrası gelişmiş nöroproteksiyon ve onarım için ZnT3'ün terapötik bir hedef olarak hizmet edebileceği önerilmiş ve sonuç olarak ZnT3'ün fizyolojik koşullar altında yetişkin hipokampal nörogenezinin kritik bir düzenleyicisi olduğu kanaatine varılmıştır (Choi ve ark 2020). ZnT3 nakavt (KO) fareleri ZnT3'ten yoksundur ve dolayısıyla sinaptik çinkodan yoksundur. ZnT3'ten yoksun erişkin dişi fareler üzerinde gerçekleştirilen çalışmada, bu farelerin bilişsel fonksiyon testlerinin çoğunda kontrollere benzer şekilde performans gösterdiği, ancak becerili erişim testlerinde başarısız oldukları, bunun da motor öğrenme fonksiyonlarında bir bozulmaya işaret ettiği bildirilmiştir (Thackray ve ark 2017).

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada çinko eksik diyetle beslenen anne sıçanların hipokampal ZnT3 gen ekspresyonlarında kontrol grubuna göre önemli bir baskılanma olduğu görülmektedir. Ancak burada dikkat çekici ikinci bir husus, gebelik ve emzirme döneminde çinko eksik diyetle beslenip, yavrularından ayrıldıktan sonra 70 gün boyunca normal diyetle beslenen anne sıçanların da hipokampal ZnT3 gen ekspresyonlarındaki baskılanma ortadan kalkmamıştır. Oysa gebelik ve emzirme döneminde çinko eksik diyetle beslenip, yavrularından ayrıldıktan sonra 70 gün boyunca standart sıçan yemine ilave olarak ip çinko takviyesi alan sıçanların hipokampal ZnT3 gen ekspresyon düzeyleri kontrol seviyelerine ulaşmıştır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızın bulguları bir bütün olarak değerlendirildiğinde;

1. Doğum stresi ve/veya yavrudan ayrılma stresinden bağımsız olarak anne sıçanlarda gebelik ve emzirme döneminde çinko eksik diyetle beslenme bilişsel performansta bozulmaya yol açmaktadır.

2. Çinko eksikliğinde ortaya çıkan bilişsel performanstaki bozulma çinko desteğiyle önlenmektedir.

3. Gerçekleştirdiğimiz araştırmada çalışma gruplarının hipokampal ERα ve ERβ düzeyleri anne sıçanlarda doğum ve/veya yavrularından ayrılma stresinden etkilenmedi.

4. Diyet çinko durumu hipokampal ERα ve ERβ düzeyleri üzerinde belirleyici oldu. Çalışmamızdaki en düşük hipokampal ERα ve ERβ seviyeleri çinko eksik diyetle beslenen anne sıçanlarda elde edildi. Çinko desteği ise hipokampal ERα ve ERβ seviyelerindeki baskılanmayı tersine çevirdi.

5. Çinko eksik diyet anne sıçanların hipokampal ZnT3 gen ekspresyonlarını önemli ölçüde baskıladı. Buna karşın gebelik ve emzirme döneminde çinko eksik diyetle beslenip, yavrularından ayrıldıktan sonra 70 gün boyunca normal diyetle beslenen anne sıçanların hipokampal ZnT3 gen ekspresyonlarındaki baskılanma ortadan kalkmadı.

6. Çinko takviyesi ise hipokampal ZnT3 gen ekspresyon düzeylerindeki baskılanmayı ortadan kaldırdı.

7. Çalışmamız, doğum ve yavrudan ayrılma stresi odaklı araştırmalarda hipokampus- ERα ve ERβ-çinko-ZnT3- bilişsel fonksiyonlar ilişkisini kombine araştıran ilk çalışmadır.

8. Bundan sonraki gerçekleştirilebilecek çalışmalarda; aynı sıçan modelinde çinkonun değişik dozlarının uygulanması ve çinko parmak proteinlerinin bilişsel performansla ilişkisinin ortaya konulması önemli bilgilere ulaşmamızı sağlayabilir.

6. KAYNAKLAR

Adams MM, Fink SE, Shah RA, Janssen WGM, Hayashi S, Milner TA, McEwen BS, Morrison JH, 2002. Estrogen and aging affect the subcellular distribution of estrogen receptor-α in the hippocampus of female rats. J Neurosci, 22(9), 3608-14.

Adlard PA, Parncutt JM, Finkelstein DI, Bush AI, 2010. Cognitive loss in zinc transporter-3 knock-out mice: a phenocopy for the synaptic and memory deficits of Alzheimer's disease?. J Neurosci, 30, 1631-36.

Aguggia JP, Suárez MM, Rivarola MA, 2013. Early maternal separation: neurobehavioral consequences in mother rats. Behav Brain Res, 248, 25-31.

Akdeniz V, Kınık Ö, Yerlikaya O, Akan E, 2016. İnsan sağlığı ve beslenme fizyolojisi açısından çinkonun önemi. Akademik Gıda, 14(3), 307-14.

Almey A, Milner TA, Brake WG, 2015. Estrogen receptors in the central nervous system and their implication for dopamine-dependent cognition in females. Horm Behav, 74, 125-38.

Arevalo MA, Azcoitia I, Gonzalez-Burgos I, Garcia-Segura LM, 2015. Signaling mechanisms mediating the regulation of synaptic plasticity and memory by estradiol. Horm Behav, 74, 19-27.

Baltaci AK, Mogulkoc R, Baltaci SB, 2019. Review: The role of zinc in the endocrine system. Pak J Pharm Sci, 32(1), 231-9.

Bean LA, Lanov L, Foster TC, 2014. Estrogen receptors, the hippocampus, and memory. Neuroscientist, 20(5), 534-45.

Ben Mimouna S, Chemek M, Boughammoura S, Haouas Z, Messaoudi I, 2018. Protective role of zinc against the neurotoxicity induced by exposure to cadmium during gestation and lactation periods on hippocampal volume of pups tested in early adulthood. Drug Chem Toxicol, 41(4), 424-33.

Bhatnagar S, Taneja S, 2001. Zinc and cognitive development. Br J Nutr, 85(2), 139-45.

Bitanihirwe BKY, Cunningham MG, 2009. Zinc: the brain's dark horse. Synapse, 63(11), 1029-49.

Black MM, 1998. Zinc deficiency and child development. Am J Clin Nutr, 68(2), 464-69.

Boccia ML, Razzoli M, Vadlamudi SP, Trumbull W, Caleffie C, Pedersen CA, 2007. Repeated long separations from pups produce depression-like behavior in rat mothers. Psychoneuroendocrinology, 32(1), 65-71.

Brewer GJ, 2001. Zinc acetate for the treatment of Wilson's disease. Expert Opin Pharmacother, 2(9), 1473-7.

Chasapis CT, Ntoupa PA, Spiliopoulou CA, Stefanidou ME, 2020. Recent aspects of the effects of zinc on human health. Arch Toxicol, 94(5), 1443-60.

Chen NN, Zhao DJ, Sun YX, Wang DD, Ni H, 2019. Long-term effects of zinc deficiency and zinc supplementation on developmental seizure-induced brain damage and the underlying GPR39/ZnT3 and MBP expression in the hippocampus. Front Neurosci, 13, 920.

Chi ZH, Wang X, Cai JQ, Stoltenberg M, Danscher G, Wang ZY, 2008. Zinc transporter 3 immunohistochemical tracing of sprouting mossy fibres. Neurochem Int, 52(7), 1305-9.

Choi BY, Hong DK, Jeong JH, Lee BE, Koh JY, Suh SW, 2020. Zinc transporter 3 modulates cell proliferation and neuronal differentiation in the adult hippocampus. Stem Cells, 38(8), 994-1006.

Choi S, Hong DK, Choi BY, Suh SW, 2020. Zinc in the brain: friend or foe?. Int J Mol Sci, 21(23), 8941.

Contestabile A, Peña -Altamira E, Virgili M, Monti B, 2016. Zinc supplementation in rats impairs hippocampal-dependent memory consolidation and dampens post-traumatic recollection of stressful event. Eur Neuropsychopharmacol, 26(6), 1070-82.

Cope EC, Morris DR, Scrimgeour AG, VanLandingham JW, Levenson CW, 2011. Zinc supplementation provides behavioral resiliency in a rat model of traumatic brain injury. Physiol Behav, 104(5), 942-7.

Daniel JM, Bohacek J, 2010. The critical period hypothesis of estrogen effects on cognition: Insights from basic research. Biochim Biophys Acta, 1800(10), 1068-76.

de Oliveira S, Feijó GDS, Neto J, Jantsch J, Braga MF, Castro LFDS, Giovenardi M, Porawski M, Guedes RP, 2021. Zinc supplementation decreases obesity-related neuroinflammation and improves metabolic function and memory in rats. Obesity (Silver Spring), 29(1), 116-24.

Duarte-Guterman P, Yagi S, Chow C, Galea LAM, 2015. Hippocampal learning, memory, and neurogenesis: Effects of sex and estrogens across the lifespan in adults. Horm Behav, 74, 37-52.

Dylewski DP, Lytton F, Bunce GE, 1986. Dietary zinc and parturition in the rat II. Myometrial gap junctions. Biol Trace Elem Res, 9(3), 165-75.

Escobedo-Monge MF, Torres-Hinojal MC, Barrado E, Escobedo-Monge MA, Marugán-Miguelsanz JM, 2021. Zinc nutritional status in a series of children with chronic diseases: a cross-sectional study. Nutrients, 13(4), 1121.

Favier AE, 1992. The role of zinc in reproduction. Hormonal mechanisms. Biol Trace Elem Res, 32, 363-82.

Favier M, Hininger-Favier I, 2005. Zinc and pregnancy. Gynecol Obstet Fertil, 33(4), 253-8.

Feng C, Liu Y, Yuan Y, Cui W, Zheng F, Ma Y, Piao M, 2016. Isoflurane anesthesia exacerbates learning and memory impairment in zinc-deficient APP/PS1 transgenic mice. Neuropharmacology, 111, 119-29.

Fernandez SM, Lewis MC, Pechenino AS, Harburger LL, Orr PT, Gresack JE, Schafe GE, Frick KM, 2008. Estradiol-induced enhancement of object memory consolidation involves hippocampal extracellular signal-regulated kinase activation and membrane-bound estrogen receptors. J Neurosci, 28(35), 8660-67.

Foster TC, 2005. Interaction of rapid signal transduction cascades and gene expression in mediating estrogen effects on memory over the life span. Front Neuroendocrinol, 26(2), 51-64.

Foster TC, 2012. Role of estrogen receptor alpha and beta expression and signaling on cognitive function during aging. Hippocampus, 22(4), 656-69.

Galea LAM, Wainwright SR, Roes MM, Duarte-Guterman P, Chow C, Hamson DK, 2013. Sex, hormones and neurogenesis in the hippocampus: hormonal modulation of neurogenesis and potential functional implications. J Neuroendocrinol, 25(11), 1039-61.

Gonkowski S, Rowniak M, Wojtkiewicz J, 2017. Zinc transporter 3 (ZnT3) in the enteric nervous system of the porcine ileum in physiological conditions and during experimental inflammation. Int J Mol Sci, 18(2), 338.

Gower-Winter SD, Levenson CW, 2012. Zinc in the central nervous system: from molecules to behavior. Biofactors, 38(3), 186-93.

Graham BM, 2018. Postnatal stress is associated with impaired fear conditioning and extinction, and heightened hippocampal fibroblast growth factor 2, in mother rats. Horm Behav, 105, 110-14

Han X, Aenlle KK, Bean LA, Rani A, Semple-Rowland SL, Kumar A, 2013. Role of estrogen receptor α and β in preserving hippocampal function during aging. J Neurosci, 33(6), 2671-83.

Hess SY, King JC, 2009. Effects of maternal zinc supplementation on pregnancy and lactation outcomes. Food Nutr Bull, 30(1), 60-78.

Hu YD, Pang W, He CC, Lu H, Liu W, Wang ZY, Liu YQ, Huang CY, Jiang YG, 2017. The cognitive impairment induced by zinc deficiency in rats aged 0~2 months related to BDNF DNA methylation changes in the hippocampus. Nutr Neurosci, 20(9), 519-25.

Irvine K, Laws KR, Gale TM, Kondel TK, 2012. Greater cognitive deterioration in women than men with Alzheimer's disease: a meta analysis. J Clin Exp Neuropsychol, 34, 989-98.

Jarosz M, Olbert M, Wyszogrodzka G, Mlyniec K, Librowski T, 2017. Antioxidant and anti-inflammatory effects of zinc. Zinc-dependent NF-κB signaling. Inflammopharmacology, 25(1), 11-24.

Jiang YG, Wang YH, Zhang H, Wang ZY, Liu YQ, 2020. Effects of early-life zinc deficiency on learning and memory in offspring and the changes in DNA methylation patterns. Nutr Neurosci, 20, 1-10.

Kaur K, Gupta R, Saraf SA, Saraf SK, 2014. Zinc: the metal of life. Compr Rev Food Sci Food Saf, 13, 358-76.

Kim J, Frick KM, 2017. Distinct effects of estrogen receptor antagonism on object recognition and spatial memory consolidation in ovariectomized mice. Psychoneuroendocrinology, 85, 110-4.

Krall RF, Tzounopoulos T, Aizenman E, 2021. The function and regulation of zinc in the brain. Neuroscience, 457, 235-58.

Lee JY, Kim JS, Byun HR, Palmiter RD, Koh JY, 2011. Dependence of the histofluorescently reactive zinc pool on zinc transporter-3 in the normal brain. Brain Res, 1418, 12-22.

Linkous DH, Adlard PA, Wanschura PB, Conko KM, Flinn JM, 2009. The effects of enhanced zinc on spatial memory and plaque formation in transgenic mice. J Alzheimers Dis, 18(3), 565-79.

Liu F, Day M, Muñiz LC, Bitran D, Arias R, Revilla-Sanchez R, Grauer S, Zhang G, Kelley C, Pulito V, Sung A, Mervis RF, Navarra R, Hirst WD, Reinhart PH, Marquis KL, Moss SJ, Pangalos MN, Brandon NJ, 2008. Activation of estrogen receptor-β regulates hippocampal synaptic plasticity and improves memory. Nat Neurosci, 11(3), 334-43.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitativePCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods, 25(4), 402-8.

Lu Y, Sareddy GR, Wang J, Wang R, Li Y, Dong Y, Zhang Q, Liu J, O'Connor JC, Xu J, Vadlamudi RK, Brann DW, 2019. Neuron-derived estrogen regulates synaptic plasticity and memory. J Neurosci, 39(15), 2792-809.

Luine V, Frankfurt M, 2013. Interactions between estradiol, BDNF and dendritic spines in promoting memory. Neuroscience, 239, 34-45.

Luine V, Frankfurt M, 2020. Estrogenic regulation of memory: The first 50 years. Horm Behav, 121, 104711.

Lymer J, Robinson A, Winters BD, Choleris E, 2017. Rapid effects of dorsal hippocampal G-protein coupled estrogen receptor on learning in female mice. Psychoneuroendocrinology, 77, 131-40.

Maniam J, Morris MJ, 2010. Long-term postpartum anxiety and depression-like behavior in mother rats subjected to maternal separation are ameliorated by palatable high fat diet. Behav Brain Res, 208(1), 72-79.

Marbouti L, Zahmatkesh M, Riahi E, Sadr SS, 2020. Inhibition of brain 17beta-estradiol synthesis by letrozole induces cognitive decline in male and female rats. Neurobiol Learn Mem, 175, 107300.

Markou A, Duka T, Prelevic GM, 2005. Estrogens and brain function. Hormones (Athens), 4(1), 9-17.

Martel G, Hevi C, Kane-Goldsmith N, Shumyatsky GP, 2011. Zinc transporter ZnT3 is involved in memory dependent on the hippocampus and perirhinal cortex. Behav Brain Res, 223(1), 233-38.

Mendrek A, Mancini-Marïe A, 2016. Sex/gender differences in the brain and cognition in schizophrenia. Neurosci Biobehav Rev, 67, 57-78.

McAllister BB, Bihelek N, Mychasiuk R, Dyck RH, 2020. Braim-derived neurotrophic factor and TrKB levels in mice that lack vesicular zinc: effects of age and sex. Neurosci, 425, 90-100.

McAllister BB, Dyck RH, 2017. Zinc transporter 3 (ZnT3) and vesicular zinc in central nervous system function. Neurosci Biobehav Rev, 80, 329-50.

Meyer K, Korz V, 2013. Age dependent differences in the regulation of hippocampal steroid hormones and receptor genes: Relations to motivation and cognition in male rats. Horm Behav, 63, 376-84.

Moura JE, Moura ENO, Alves CX, Vale SHL, Dantas MMG, Silva AA, Almeida MG, Leite LD, Brandão-Neto J, 2013. Oral zinc supplementation may improve cognitive function in schoolchildren. Biol Trace Elem Res, 155(1), 23-8.

Murarka S, Mishra V, Joshi P, Sunil K, 2015. Role of zinc in reproductive biplogy – an overview. Austin J Reprod Med Interfil, 2(2), 1009.

Ni H, Chen SH, Li LL, Jin MF, 2019. Alterations in the neurobehavioral phenotype and ZnT3/CB-D28k expression in the cerebral cortex following lithium-pilocarpine-induced status epilepticus: the ameliorative effect of leptin. Biol Trace Elem Res, 187(1), 100-6.

Om AS, Chung KW, 1996. Dietary zinc deficiency alters 5 alpha-reduction and aromatization of testosterone and androgen and estrogen receptors in rat liver. J Nutr, 126, 842-8.

Padilla-Gómez E, Beltrán-Campos V, Montes S, Díaz-Ruíz A, Quirarte GL, Ríos C, Diaz-Cintra S, 2012. Effect of 17β-estradiol on zinc content of hippocampal mossy fibers in ovariectomized adult rats. Biometals, 25(6), 1129-39.

Paletta P, Sheppard PAS, Matta R, Ervin KSJ, Choleris E, 2018. Rapid effects of estrogens on short-term memory: Possible mechanisms. Horm Behav, 104, 88-99.

Pandey R, Shukla P, Anjum B, Gupta HP, Pal S, Arjaria N, Gupta K, Chattopadhyay N, Sinha RA, Bandyopadhyay S, 2020. Estrogen deficiency induces memory loss via altered hippocampal HB-EGF and autophagy. J Endocrinol, 244(1), 53-70.

Pawluski JL, Brummelte S, Barha CK, Crozier TM, Galea LAM, 2009. Effects of steroid hormones on neurogenesis in the hippocampus of the adult female rodent during the estrous cycle, pregnancy, lactation and aging. Front Neuroendocrinol, 30(3), 343-57.

Pawluski JL, Galea LAM, 2007. Reproductive experience alters hippocampal neurogenesis during the postpartum period in the dam. Neuroscience, 12;149(1), 53-67.

Pereira LM, Bastos CP, de Souza JMD, Ribeiro FM, Pereira GS, 2014. Estradiol enhances object recognition memory in Swiss female mice by activating hippocampal estrogen receptor α. Neurobiol Learn Mem, 114, 1-9.

Piechal A, Blecharz-Klin K, Pyrzanowska J, Widy-Tyszkiewicz E, 2012. Maternal zinc supplementation improves spatial memory in rat pups. Biol Trace Elem Res, 147(1-3), 299-308.

Pinkerton JV, Henderson VW, 2005. Estrogen and cognition, with a focus on Alzheimer's disease. Semin Reprod Med, 23(2), 172-9.

Plum LM, Rink L, Haase H, 2010. The essential toxin: impact of zinc on human health. Int J Environ Res Public Health, 7(4), 1342-65.

Prakash A, Bharti K, Majeed ABA, 2015. Zinc: indications in brain disorders. Fundam Clin Pharmacol, 29(2), 131-49.

Prasad AS, 1983. Zinc deficiency in human subjects. Prog Clin Biol Res, 129, 1-33.

Prasad AS, 2014(a). Impact of the discovery of human zinc deficiency on health. J Trace Elem Med Biol, 28(4), 357-63.

Prasad AS, 2014(b). Zinc is an antioxidant and anti-inflammatory agent: ıts role in human health. Front Nutr, 1, 14.

Prasad AS, 2017. Discovery of zinc for human health and biomarkers of zinc deficiency. Molecular, Genetic, and Nutritional Aspects of Major and Trace Minerals, 20, 241-60.

Prasad AS, Halsted JA, Nadimi M, 1961. Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia. Am J Med, 31, 532-46.

Railey AM, Micheli TL, Wanschura PB, Flinn JM, 2010. Alterations in fear and spatial memory in pre- and post-natal zinc supplemented rats: remediation by copper. Physiol Behav, 100(2), 95-100.

Roohani N, Hurrell R, Kelishadi R, Schulin R, 2013. Zinc and its importance for human health: an integrative review. J Res Med Sci, 18(2), 144-57.

Sandstead HH, Freeland-Graves JH, 2014. Dietary phytate, zinc and hidden zinc deficiency. J Trace Elem Med Biol, 28(4), 414-17.

Sandusky-Beltran LA, Manchester BL, McNay EC, 2017. Supplementation with zinc in rats enhances memory and reverses an age-dependent increase in plasma copper. Behav Brain Res, 333, 179-83.

Shah D, Sachdev HP, 2001. Effect of gestational zinc deficiency on pregnancy outcomes: summary of observation studies and zinc supplementation trials. Br J Nutr, 85(2), 101-8.

Shah D, Sachdev HPS, 2006. Zinc deficiency in pregnancy and fetal outcome. Nutr Rev, 64(1), 15-30.

Sheppard PAS, Choleris E,Galea LAM, 2019. Structural plasticity of the hippocampus in response to estrogens in female rodents. Mol Brain, 12(1), 22.

Sherwin BB, 2002. Estrogen and cognitive aging in women. Trends Pharmacol Sci, 23(11), 527-34.

Shughrue PJ, Merchenthaler I, 2000. Estrogen is more than just a "sex hormone": novel sites for estrogen action in the hippocampus and cerebral cortex. Front Neuroendocrinol, 21(1), 95-101.

Sindreu C, Palmiter RD, Storm DR, 2011. Zinc transporter ZnT-3 regulates presynaptic Erk1/2 signaling and hippocampus-dependent memory. Proc Natl Acad Sci Unit States Am, 108(8), 3366-70.

Skalny AV, Aschner M, Tinkov AA, 2021. Zinc. Adv Food Nutr Res, 96, 251-310.

Smidt K, Rungby J, 2012. ZnT3: a zinc transporter active in several organs. Biometals, 25(1), 1-8.

Sunar F, Baltaci AK, Ergene N, Mogulkoc R, 2009. Zinc deficiency and supplementation in ovariectomized rats: their effect on serum estrogen and progesterone levels and their relation to calcium and phosphorus. Pak J Pharm Sci, 22(2), 150-4.

Stallard L, Reeves PG, 1997. Zinc deficiency in adult rats reduces the relative abundance of testis-specific angiotensin-converting enzyme mRNA. J Nutr, 127(1), 25-9.

Swanson CA, King JC, 1987. Zinc and pregnancy outcome. Am J Clin Nutr, 46(5), 763-71.

Takeda A, Tamano H, 2017. The impact of synaptic Zn2+ Dynamics on cognition and its decline. Int J Mol Sci, 18(11), 2411.

Tamano H, Koike Y, Nakada H, Shakushi Y, Takeda A, 2016. Significance of synaptic cognition. J Trace Elem Med Biol, 38, 93-8.

Thackray SE, McAllister BB, Dyck RH, 2017. Behavioral characterization of female zinc transporter 3 (ZnT3) knockout mice. Behav Brain Res, 321, 36-49.

Xie Y, Wang Y, Zhang T, Ren G, Yang Z, 2012. Effects of nanoparticle zinc oxide on spatial cognition and synaptic plasticity in mice with depressive-like behaviors. J Biomed Sci, 19(1), 14.

Vallee BL, Auld DS, 1989. Short and long spacer and other features of zinc binding sites in zinc enzymes. FEBS Lett, 257, 138-40.

Wang ZY, Dahlström A, 2008. Axonal transport of zinc transporter 3 and zinc containing organelles in the rodent adrenergic system. Neurochem Res, 33(12), 2472-9.

Wenzel HJ, Cole TB, Born DE, Schwartzkroin PA, Palmiter RD, 1997. Ultrastructural localization of zinc transporter-3 (ZnT-3) to synaptic vesicle membranes within mossy fiber boutons in the hippocampus of Mouse and monkey. Proc Natl Acad Sci U S A, 94(23), 12676-81.

Yang Y, Jing XP, Zhang SP, Gu RX, Tang FX, Wang XL, Xiong Y, Qiu M, Sun XY, Ke D, Wang JZ, Liu R, 2013. High döşe zinc supplementation induces hippocampal zinc deficiency and memory impairment with inhibition of BDNF signaling. PLoS One, 8(1), e55384.

Yazğan B, Baltaci AK, Mogulkoc R, Avunduk MC, 2020. Effects of zinc supplementation on metallothionein levels in ischemic renal tissue. Biotech Histochem, 95(4), 285-96.

Yazğan B, Baltaci AK, Mogulkoc R, Avunduk MC, 2021. Zinc is a strong stimulant of metallothionein synthesis in the ischaemic testis tissue. Andrologia, 53(6), e14042.

Yu X, Chen W, Wei Z, Ren T, Yang X, Yu X, 2016. Effects of maternal mild zinc deficiency and different ways of zinc supplementation for offspring on learning and mamory. Food Nutr Res, 60, 29467.

Yu X, Jin L, Zhang X, Yu X, 2013. Effects of maternal mild zinc deficiency and zinc supplementation in offspring on spatial memory and hippocampal neuronal ultrastructural changes. Nutrition, 29(2), 457-61.

Zhao L, Brinton RD, 2007. Estrogen receptor alpha and beta diffrentially regulate intracellular Ca(2^+) Dynamics leading to ERK phosphorylation and estrogen neuroprotection in hippocampal neurons. Brain Res, 1172, 48-59.

7. EKLER

EK-B: TURNİTİN RAPORU

Sıçanlarda Doğum Stresi ve Bellek Performansı Üzerinde Çinko Eksikliği ve Desteğinin Etkisi

Yazar Fatma Sare Taştepe

Gönderim Tarihi: 16-Tem-2021 11:44AM (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1620282336
Dosya adı: FATMA_SARE_TA_TEPE_BENZERL_K_TARAMASI_-Y_KSEK_L_SANS_TEZ.docx (118.36K)
Kelime sayısı: 10536
Karakter sayısı: 73639

Sıçanlarda Doğum Stresi ve Bellek Performansı Üzerinde Çinko Eksikliği ve Desteğinin Etkisi

ORİJİNALLİK RAPORU

%6	%5	%2	%2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikerisim.selcuk.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1
2	zoofed.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
3	Submitted to Ankara University Öğrenci Ödevi	%1
4	angora.baskent.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	openaccess.inonu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
6	burkonturizm.com İnternet Kaynağı	<%1
7	www.selcukbesyo.org İnternet Kaynağı	<%1
8	Submitted to Bahcesehir University Öğrenci Ödevi	<%1
9	abakus.inonu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1

10	Submitted to Kahramanmaraş Sütçü İmam University Öğrenci Ödevi	<%1
11	acikerisim.baskent.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
12	www.doczz.it İnternet Kaynağı	<%1
13	ihslc.mehmetakif.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
14	tipdergisi.bozok.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
15	acikarsiv.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
16	Submitted to Selçuk Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
17	acikerisim.dicle.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
18	www.journalagent.com İnternet Kaynağı	<%1
19	www.jove.com İnternet Kaynağı	<%1
20	www.yajimal.com İnternet Kaynağı	<%1
21	adresinburasi.com İnternet Kaynağı	

		<%1
22	dergi.comu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
23	DEMİR, Mehmet, YİLMAZ, Umit, COLAK, Cemil, CİGREMİS, Yilmaz, OZYALİN, Fatma, TEKEDERELİ, Ibrahim, KİLİNCLİ, Ayten and SANDAL, Suleyman. "The effects of lack of melatonin in experimental rat model of Alzheimer's Disease: relationship with FEZ1 gene expression", Medicine Science Publisher, 2017. Yayın	<%1
24	acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
25	www.istanbulsaglik.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
26	www.sporbilimleri.org.tr İnternet Kaynağı	<%1

Alıntıları çıkart üzerinde
Bibliyografyayı Çıkart üzerinde
Eşleşmeleri çıkar Kapat